### **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

## ANA PAULA TIEMI TANIGUTI

# INFLUÊNCIA DA INERVAÇÃO NA DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE ACETILCOLINA NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DISTRÓFICA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Marques** 

Campinas, 2006

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

T156i	Taniguti, Ana Paula Tiemi Influência da inervação na distribuição dos receptores de acetilcolina na junção neuromuscular distrófica / Ana Paula Tiemi Taniguti Campinas, SP: [s.n.], 2006.
	Orientadora: Maria Júlia Marques. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Acetilcolina. 2. Músculos - Regeneração. 3. Junção neuromuscular. 1. Marques, Maria Júlia. 11. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. 111. Título.

Título em inglês: The spatial organization of acetylcholine receptors in dystrophic muscles is influenced by the nerve terminal.

Palavras-chave em inglês: Acetylcholine; Muscle - Regeneration; Neuromuscular junction. Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maria Júlia Marques, Selma Maria Michelin Matheus, Rosana Macher Teodori.

Data da defesa: 03/05/2006.

Campinas, 03 de maio de 2006.

#### **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Profa. Dra. Rosana Macher Teodori

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

inatura A; Assinatura

MTeodor Assinatura

Assinatura

Assinatura

Dedico...

Aos meus pais e familiares pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos.

Agradeço ...

A Deus por ter me concedido a oportunidade de realizar o mestrado e concluir com sabedoria, saúde, coragem e tranqüilidade.

"Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele, e ele tudo fará". (Salmo 37:5)

Agradecimento especial...

À Profa. Dra. Maria Júlia Marques pela orientação, amizade, confiança, respeito e amadurecimento profissional e pessoal.

#### **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo acolhimento e minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto pelos conhecimentos, respeito, incentivo e sugestões dadas durante a realização do trabalho.

À Profa. Dra. Elaine Minatel pela colaboração na execução do trabalho, pelas considerações dadas no Exame de Qualificação e pela inestimável amizade.

À Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete pelos conhecimentos, respeito, amizade e considerações dadas no Exame de Qualificação.

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari pelo respeito e considerações dadas no Exame de Qualificação.

À Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus e Profa. Dra. Rosana Macher Teodori pelas sugestões dadas durante a pré-banca e pela honra em tê-las como membros da banca examinadora.

À Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira pela amizade e pelas sugestões dadas durante a pré-banca.

Aos Srs. Norivaldo Celestini e Marco Aurélio Ribeiro pela amizade e auxílio nos procedimentos experimentais.

À Sra. Marlene Lima pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

Às Sras. Lílian Alves Senne Panagio e Ana Floriano pela atenção e auxílio durante o mestrado.

Aos Srs. Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos, Toni Donizeti dos Santos e Carlos Gonçalves pela prestatividade e convívio durante o mestrado.

A todos os docentes, funcionários, colegas e amigos que contribuíram de alguma maneira para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, FAEP-UNICAMP, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro do projeto.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original" (Albert Einstein)

## SUMÁRIO

Lista de abreviatura	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	01
1.1. Apresentação	02
1.2. Distrofia Muscular de Duchenne	04
1.3. Distrofina e complexo distrofina-glicoproteínas	06
<b>1.4.</b> Camundongo <i>mdx</i>	10
1.5. Morfologia da junção neuromuscular normal	11
1.6. Morfologia da junção neuromuscular distrófica	16
<b>1.7.</b> Objetivo	
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Grupos experimentais	20
2.2. Tratamento com cloridrato de lidocaína (xilocaína)	21
2.3. Desnervação do músculo esternomatóideo esquerdo	23
2.4. Marcação do terminal nervoso e receptores de acetilcolina	23
2.5. Análise ao microscópio confocal de varredura a laser	27
2.6. Análise histológica	27
3. Resultados	29
3.1. Tratamento com cloridrato de lidocaína (xilocaína)	
3.2. Desnervação do músculo esternomastóideo esquerdo	
<b>3.3.</b> Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina	
<b>3.4.</b> Grupo <i>mdx</i> com 01 mês de idade	32
<b>3.5.</b> Grupo <i>mdx</i> com 06 meses de idade	
<b>3.6.</b> Figuras	
4. Discussão	41
4.1. Metodologia utilizada	42
4.2. Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina	45

<b>4.3.</b> Conclusão	51
5. Referências Bibliográficas	
6. Trabalho a ser submetido à publicação	63

#### Lista de abreviaturas

- AChRs receptores de acetilcolina
- ARIA indutor da atividade do receptor de acetilcolina
- CGRP peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- **DABCO –** 1,4-diazabiciclo octano
- **DMD** distrofia muscular de Duchenne
- Grb2 receptor-ligante 2 do fator de crescimento
- **GRMD** distrofia muscular do Golden Retriever
- HFMD distrofia muscular felina ligada ao cromossomo X
- IGF1 fator de crescimento homólogo à insulina-1
- JNM junção neuromuscular
- **mdx –** distrofia muscular ligada ao cromossomo X
- MuSK- receptor tirosino-quinase
- NCAM molécula de adesão celular neuronal
- **PBS** tampão fosfato
- **Rh-BTx** alfa-bungarotoxina conjugada à rodamina
- 4-Di-2-ASP 4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpiridínio

#### Resumo

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma miopatia hereditária caracterizada pela falta de distrofina. Camundongos da linhagem *mdx*, tal como pacientes com DMD, não expressam a distrofina, desenvolvendo distrofia muscular semelhante a DMD. A junção neuromuscular distrófica apresenta alteração no padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs), provavelmente devida à falta de distrofina. Alterações semelhantes na distribuição dos receptores ocorrem em fibras musculares normais regeneradas e o terminal nervoso tem papel determinante nestas alterações. O presente trabalho teve por objetivo verificar se o terminal nervoso influencia o padrão de distribuição dos AChRs nas fibras musculares regeneradas distróficas. Animais mdx com 01 mês e 06 meses de idade tiveram o músculo esternomastóideo esquerdo desnervado e injetado com cloridrato de lidocaína. O músculo contra-lateral serviu como controle. Após 10 dias, os animais foram sacrificados, os AChRs marcados com rodamina- $\alpha$ -bungarotoxina e observados ao microscópio confocal. Músculos inervados de animais mdx com 01 mês de idade apresentaram os AChRs distribuídos em ilhas em 75,2% das JNMs observadas (n=137), enquanto animais com 06 meses de idade apresentaram 100% das JNMs (n=114) em ilhas. Na ausência da inervação, os AChRs distribuíram-se em padrão desnervado tipo braços contínuos em 79,4% das JNMs observadas (n=90) de animais com 01 mês de idade e em padrão desnervado tipo ilhas em 100% das JNMs (n=100) de animais com 06 meses de idade. Estes resultados sugerem que o terminal nervoso contribui de forma significativa para as alterações no padrão de distribuição dos AChRs de músculos distróficos inervados.

#### Abstract

Changes in the distribution of acetylcholine receptors have been reported to occur at the neuromuscular junction of *mdx* mice and may be a consequence of muscle fiber regeneration rather than the absence of dystrophin. In the present study, we examined whether the nerve terminal determines the fate of acetylcholine receptor distribution in the dystrophic muscle fibers of mdx mice. The left sternomastoid muscle of young (1 month old) and adult (6 months old) mdx mice was injected with 60 µl lidocaine hydrochloride to induce muscle degeneration-regeneration. Some mice had their sternomastoid muscle denervated at the time of lidocaine injection. After 10 days of muscle denervation, nerve terminals and acetylcholine receptors were labeled with 4Di-2-ASP and rhodamine- $\alpha$ bungarotoxin, respectively, for confocal microscopy. In young mdx mice, 75% (n=137) endplates) of the receptors were distributed in islands. The same was observed in 100%(n=114 endplates) of the adult junctions. In denervated-regenerated fibers of young mice, the receptors were distributed as branch-like aggregates in 80% of the endplates (n=90). In denervated-regenerated fibers of adult mice, the receptors were distributed in island-like aggregates in 100% of the endplates (n=100). These findings suggest that nerve-dependent mechanisms are involved in the changes in receptor distribution in young dystrophic muscles. In older dystrophic muscles other factors may play a role in their distribution.

1. INTRODUÇÃO

#### 1.1. Apresentação

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) destaca-se, dentre as distrofias musculares, por ser a mais comum e devastadora. É uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que afeta uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas (para revisão ver ENGEL et al., 1994; BLAKE et al., 2002 e BOGDANOVICH et al., 2004).

A DMD é caracterizada pela falta da distrofina, uma proteína do sarcolema importante na manutenção de sua estabilidade (HOFFMAN et al., 1987; BONILLA et al., 1988; PETROF, 1998). Desde a descoberta da distrofina como proteína-chave na gênese desta distrofia, muitos trabalhos atribuíram a sua ausência como sendo causa das alterações morfológicas encontradas nas fibras musculares e junções neuromusculares de indivíduos afetados e de animais modelo (BOGDANOVICH et al., 2004).

A linhagem de camundongos *mdx* (*X-chromosome linked muscular dystrophy*; BULFIELD et al., 1984) apresenta, tal como os humanos doentes, ausência da distrofina. Entretanto, os animais jovens desta linhagem apresentam ciclos de regeneração muscular (TORRES & DUCHEN, 1987), fato que não ocorre nos músculos de pacientes humanos.

As junções neuromusculares dos animais *mdx* apresentam alterações no componente pós-sináptico, aonde as dobras juncionais são escassas e pouco desenvolvidas (TORRES & DUCHEN, 1987). O padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina também se

encontra alterado (LYONS & SLATER, 1991) sendo a ausência da distrofina ou diminuição do complexo distrofina-glicoproteínas uma das hipóteses para explicar este fato (BANKS et al., 2005).

Entretanto, outras hipóteses para explicar as alterações na distribuição dos receptores de acetilcolina de junções distróficas sugerem que a distrofina pode não exercer papel fundamental em tais alterações (MINATEL et al., 2001; MARQUES et al., *in press*).

Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que fibras musculares normais regeneradas apresentam alterações no padrão de distribuição dos receptores colinérgicos, semelhantes àquelas observadas em fibras distróficas (MINATEL et al, 2001). Sugeriu-se que as alterações na distribuição dos receptores resultariam da degeneração e regeneração muscular, e não da falta da distrofina. Adicionalmente, os receptores de acetilcolina dos animais *mdx* não apresentam modificações no seu padrão de distribuição nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando os ciclos de degeneração e regeneração ainda não se iniciaram (MINATEL et al, 2003).

Reforçando esta hipótese, estudo utilizando músculos normais e regenerados, na ausência da inervação, demonstrou que os receptores distribuíram-se de forma normal (MARQUES et al., *in press*), diferentemente dos músculos normais regenerados e inervados e dos músculos distróficos. Sugeriu-se que as alterações no padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina encontradas em fibras regeneradas e inervadas se deva aos brotamentos intraterminais do terminal nervoso, semelhantes àqueles de músculo distrófico (SANTO NETO et al., 2003). Provavelmente, proteínas sintetizadas por fibras regeneradas induzam brotamentos do terminal nervoso, ao redor dos quais dispõem-se os receptores de acetilcolina.

#### **1.2.** Distrofia Muscular de Duchenne

A DMD foi descrita primeiramente em 1868, pelo médico Guillaume Benjamin Amand Duchenne de Boulogne, na França, como uma paralisia muscular pseudohipertrófica. Duchenne propôs critérios para diagnosticar a distrofia: fraqueza muscular que acomete inicialmente os membros inferiores; comprometimento da postura e marcha; pseudo-hipertrofia dos membros subseqüente à fraqueza muscular; caráter progressivo da doença; diminuição ou perda da contratilidade muscular por estimulação elétrica na fase mais avançada da doença e ausência de febre, distúrbios sensoriais ou disfunções intestinal ou vesical. Em 1886, Growers notou a característica hereditária da DMD e descreveu a maneira que uma criança afetada utiliza as mãos para apoiar o próprio corpo para se levantar do solo (Sinal de Growers; ENGEL et al., 1994).

Clinicamente, a DMD se manifesta entre dois e cinco anos de idade, quando são percebidos atraso no desenvolvimento motor, dificuldade em correr ou subir degraus e quedas freqüentes. A fraqueza muscular é evidente nos membros inferiores e na musculatura proximal do corpo. Aos cinco e seis anos de idade, concomitantemente à fraqueza muscular, a criança afetada apresenta pseudo-hipertrofia, principalmente nos membros inferiores. A fraqueza muscular é progressiva resultando em perda da deambulação aos 12 anos de idade, contraturas articulares e cifoescoliose (ENGEL et al, 1994). A utilização de órteses e de ventilação mecânica melhoram a qualidade de vida do doente, porém o óbito freqüentemente ocorre por volta dos 20 anos de idade (BOGDANOVICH et al., 2004).

Histologicamente, biópsias musculares de indivíduos afetados pela DMD apresentam alterações morfológicas significativas. Fibras musculares necróticas ou em degeneração com presença de células inflamatórias são comumente observadas em músculos distróficos. Estas fibras são gradualmente substituídas por tecidos conjuntivo e adiposo, evidenciados clinicamente pela pseudo-hipertrofia dos membros. Variações do diâmetro das fibras musculares são observadas a partir de um a cinco anos de idade (ENGEL et al., 1994; BLAKE et al., 2002).

A DMD é uma doença causada por mutação no gene da distrofina. A distrofina é uma proteína estrutural encontrada na face citoplasmática da membrana sarcolemal ligada aos miofilamentos da fibra muscular e a um complexo de glicoproteínas da membrana (Figura 1). O complexo distrofina-glicoproteínas desempenha papel importante na manutenção da estabilidade mecânica do sarcolema uma vez que permite a ligação do citoesqueleto às moléculas de laminina da matriz extracelular (HOFFMAN et al., 1987; PETROF, 1998). Foi sugerido que a falta da distrofina facilitaria a entrada de grandes quantidades de cálcio na fibra muscular levando à degeneração destas fibras (BERTORINI et al., 1982; MARIOL & SÉGALAT, 2001). Mais recentemente foi sugerido que as proteínas reguladoras do cálcio também podem estar envolvidas na patogênese da distrofia (PETROF, 1998; CULLIGAN et al., 2002; RUEGG et al., 2002).

O caráter progressivo da DMD e a ausência de tratamentos efetivos atraem a atenção de inúmeros estudiosos das ciências básicas e da clínica para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Dentre estas, destacam-se as terapias gênicas, para a codificação do gene da distrofina; as terapias celulares, que consistem em transplante de mioblastos ou

células-tronco em músculos distróficos e as terapias farmacológicas (BOGDANOVICH et al., 2004; para revisão ver CHAKKALAKAL et al., 2005).

#### **1.3.** Distrofina e complexo distrofina-glicoproteínas

A distrofina é uma proteína de 427 kDa ausente em indivíduos afetados pela DMD e em camundongos da linhagem *mdx* (HOFFMAN et al., 1987).

Nos humanos, o gene da distrofina localiza-se na posição 21 do braço curto do cromossomo X e consiste em 79 exons distribuídos em 2,5 milhões de pares de base. O gene da distrofina possui alta taxa de mutação  $(1x10^{-4})$ , sendo que a maioria dos casos de DMD apresenta deleção do gene (ENGEL et al., 1994; PETROF, 1998).

A transcrição do gene da distrofina é controlada por três diferentes promotores localizados no exon inicial do gene. Cada promotor transcreve moléculas de RNA mensageiro que serão traduzidas em distrofina de 427 kDa localizada nos tecidos muscular e nervoso. Isoformas de distrofina de menor peso molecular formadas por outros promotores do gene da distrofina, são expressas no rim, fígado, pulmão e células de Schwann (ENGEL et al., 1994; BLAKE et al., 2002).

O promotor da distrofina muscular é ativo em músculos liso, cardíaco e estriado esquelético (ENGEL et al., 1994). Em músculos estriados esqueléticos de indivíduos normais, a distrofina é expressa no sarcolema ao longo da fibra muscular (WESSELS et al., 1991).

A distrofina apresenta quatro domínios ou regiões que conectam as miofibrilas ao citoesqueleto subsarcolemal formado pelo complexo de glicoproteínas: o primeiro se liga à

actina citoesquelética, o segundo constituindo a maior parte da proteína é composto de repetições de aproximadamente 100 aminoácidos cada uma, o terceiro domínio rico em cisteína e o último domínio C-terminal que se liga ao complexo de glicoproteínas (ENGEL et al., 1994; BLAKE et al., 2002).

O complexo distrofina-glicoproteínas coneta as miofibrilas à matriz extracelular. A actina citoesquelética conecta-se ao complexo de glicoproteínas subsarcolemal via distrofina e este se conecta à cadeia  $\alpha 2$  da laminina-2 ( $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ ) da lâmina basal. O arranjo topográfico do complexo distrofina-glicoproteínas proporciona estabilidade ao sarcolema e é responsável pela sinalização entre os compartimentos extracelular e intracelular (ERVASTI & CAMPBELL, 1991; ENGEL et al., 1994; para revisão ver BROWN & DPHILL JR, 1997).

O complexo distrofina-glicoproteínas inclui a distrofina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -distroglicanas;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - sarcoglicanas; sarcospan;  $\alpha$ 1-,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-sintrofinas e  $\alpha$ - e  $\beta$ -distrobrevinas (Figura 1). Mutação do gene destas proteínas pode acarretar diversas distrofias musculares (ENGEL et al.; 1994, BROWN & DPHILL JR., 1997; RANDO, 2001; BLAKE et al., 2002).

7



**Figura 1**: Esquema do complexo distrofina-glicoproteínas representando a  $\alpha$ - e  $\beta$ distroglicanas;  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - sarcoglicanas; sarcospan;  $\alpha$ -,  $\beta$ 1-sintrofinas e  $\alpha$ - e  $\beta$ -distrobrevinas e a distrofina. A distrofina exerce papel importante na estabilização do sarcolema conectando actina citoesquelética à cadeia  $\alpha$ 2 da laminina-2 localizada na lâmina basal via complexo de glicoproteínas (Adaptado de RANDO, 2001).

As  $\alpha$ - e  $\beta$ -distroglicanas formam um complexo que se associa à distrofina e funciona com um receptor para a agrina, proteína secretada pelo nervo e localizada na lâmina basal juncional, importante na diferenciação da junção neuromuscular. A  $\alpha$ - distroglicana conecta-se à cadeia  $\alpha$ 2 da laminina-2 ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1 $\gamma$ 1) e à porção extracelular da  $\beta$ - distroglicana e funciona como receptor para a agrina. A  $\beta$ -distroglicana é uma proteína transmembrânica assim como o complexo de sarcoglicanas e o sarcospam aos quais se liga. Além disso, a região C-terminal da  $\beta$ -distroglicana liga-se ao domínio da distrofina rica em cisteína (ENGEL et al., 1994; BLAKE et al., 2002).

O complexo de sarcoglicanas é composto por quatro glicoproteínas transmembrânicas chamadas de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - sarcoglicanas. Este complexo é importante na transdução de sinais intracelulares e liga-se ao complexo de distroglicanas, estabilizando-o (RANDO, 2001; BLAKE et al., 2002).

A sarcospam é uma proteína transmembrânica que se liga ao complexo de sarcoglicanas. Embora a expressão da sarcospam esteja reduzida quando há deficiência de outras proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas, deficiência de sarcospam ou mutação de seu gene não resulta em doença (RANDO, 2001).

As sintrofinas incluem três isoformas denominadas  $\alpha 1$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -sintrofinas. Estas proteínas subsarcolemais se ligam à distrofina e às distrobrevinas. As sintrofinas e a distrofina interagem com a calmodulina, proteína importante para a homeostase de cálcio intracelular (RANDO, 2001; MARQUES, 2004).

As distrobrevinas são homólogas à região C-terminal da distrofina e incluem as  $\alpha$ - e  $\beta$ -distrobrevinas sendo que a  $\alpha$ -distrobrevina está envolvida na maturação da junção neuromuscular (GRADY et al., 2000; RANDO, 2001; BLAKE et al., 2002).

O complexo distrofina-glicoproteínas interage com várias moléculas de sinalização celular que incluem a calmodulina que se liga à distrofina e sintrofinas; receptor-ligante 2 do fator de crescimento (*growth factor receptor-bound 2* – Grb2) importante nas vias de transdução de sinais e que está ligado à  $\beta$ -distroglicana e o óxido nítrico sintase que interage com vários componentes do complexo, principalmente com a sintrofina. A atividade da óxido nítrico sintase leva à produção de óxido nítrico o qual modula vias de sinalização intracelular (RANDO, 2001; MARQUES, 2004).

#### 1.4. Camundongo *mdx*

O camundongo *mdx* (*X-chromosome linked muscular dystrophy*) é o animal mais utilizado como modelo da distrofia muscular de Duchenne (ENGEL et al., 1994; BLAKE et al., 2002). Foi identificado em 1984 na colônia C57BL10/ScSn apresentando níveis elevados das enzimas creatinoquinase e piruvatoquinase e degeneração muscular característica de distrofia muscular (BULFIELD et al., 1984).

Os animais da linhagem mdx apresentam, tais como os humanos doentes, mutação espontânea no cromossomo X que leva à deficiência da distrofina. Nos mdx, o gene da distrofina está localizado na região Hq Bpa do cromossomo X e são afetados pela doença animais machos e fêmeas homozigóticos, que se apresentam viáveis e férteis (BULFIELD et al., 1984; ENGEL et al., 1994).

Os camundongos *mdx* diferem dos humanos afetados pela DMD por apresentarem, quando jovens, ciclos de regeneração muscular. Ao nascimento, poucas fibras musculares são afetadas. Com três semanas de vida, a necrose muscular acentua-se abruptamente, diminuindo após dois meses de idade. Simultaneamente à degeneração muscular, há resposta regenerativa da fibra muscular evidenciada pela expressão da cadeia pesada da miosina fetal e pela presença de núcleos centrais. Após o período de necrose e regeneração, os núcleos das fibras musculares permanecem centrais e a expressão da cadeia pesada da miosina fetal diminui (BULFIELD et al., 1984; DIMARIO et al., 1991; BLAKE et al., 2002). Aos três meses de idade, 80% a 90% das fibras musculares dos membros posteriores do animal apresentam núcleos centrais (PASTORET & SEBILLE, 1995). A partir dos seis meses de idade há variação progressiva do diâmetro das fibras e deposição de colágeno e tecido adiposo em várias áreas do tecido muscular (ROIG et al., 2004).

Além do camundongo *mdx*, outros animais, destacando-se o cão da raça Golden Retriever (*Golden Retriever muscular dystrophy* - GRMD) e o gato com distrofia muscular felina ligada ao cromossomo X (*hypertrophic feline muscular dystrophy* - HFMD) também podem ser utilizados como modelos da DMD (BLAKE et al. 2002).

#### 1.5. Morfologia da junção neuromuscular normal

A junção neuromuscular (JNM) é uma sinapse química diferenciada morfológica e funcionalmente para transmitir o impulso do terminal motor para o sarcolema da fibra muscular esquelética (para revisão ver HALL & SANES, 1993).

Estruturalmente, a JNM de vertebrados é formada por três compartimentos: présináptico, extracelular e pós-sináptico (HALL & SANES, 1993; para revisão ver SANES & LICHTMAN, 1999 –Figura 2).



**Figura 2:** Esquema da junção neuromuscular vista em microscopia eletrônica de transmissão. Componentes do compartimento pré-sináptico (terminal nervoso e célula de Schwann), pós-sináptico (receptores de acetilcolina – AChRs, situados no topo das dobras juncionais do sarcolema juncional) e compartimento extra-celular (lâmina basal preenchendo as fendas sinápticas primária e secundária). (Adaptado de HALL & SANES, 1993).

O compartimento pré-sináptico é composto pelo terminal nervoso do axônio motor envolvido por processos das células de Schwann os quais protegem o terminal nervoso de lesões químicas e mecânicas (HALL & SANES, 1993; SANES & LICHTMAN, 1999).

O feixe de axônios motores envolvidos por bainha de mielina, após penetrar no músculo pelo feixe neurovascular, divide-se em ramos intramusculares que percorrem o tecido conjuntivo entre as fibras musculares. Próximo à fibra muscular o axônio motor, chamado de axônio pré-terminal, perde sua camada de mielina e passa a ser denominado de

axônio terminal. Este se arboriza em terminais nervosos que se alojam em depressões na superfície da fibra muscular, a fenda sináptica primária (HALL & SANES, 1993).

O terminal nervoso é especializado para a liberação de neurotransmissor acetilcolina. Apresenta numerosas vesículas sinápticas contendo o neurotransmissor, bem como numerosas mitocôndrias que fornecem energia para a síntese e liberação deste (HALL & SANES, 1993; SANES & LICHTMAN, 1999).

As vesículas sinápticas apresentam em média 50 a 60 nm de diâmetro, são sintetizadas pelo corpo dos neurônios motores e transportadas distalmente ao longo do axônio para o terminal nervoso (BÖÖJ et al., 1986). No terminal nervoso, as vesículas estão reunidas nas chamadas zonas ativas, local onde se fundem com a membrana pré-sináptica para liberar seu conteúdo na fenda sináptica por exocitose. Após liberação do neurotransmissor, a membrana da vesícula é reutilizada pelo processo de endocitose (HEUSER & REESE, 1981; para revisão ver HUGHES et al., 2006).

A fenda sináptica primária situa-se entre o terminal nervoso e a fibra muscular, sendo ocupada pela lâmina basal sináptica. Esta é contínua com a lâmina basal que envolve a fibra muscular e as células de Schwann e estende-se entre as dobras juncionais do sarcolema pós-sináptico, na fenda sináptica secundária (HALL & SANES, 1993; para revisão ver SANES, 2003).

A lâmina basal sináptica não difere morfologicamente da lâmina basal extrasináptica, porém contém proteínas específicas, tais como laminina-4 ( $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ ), laminina-9 ( $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ ), laminina-11 ( $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ ), colágeno IV, agrina e acetilcolinesterase, que a tornam bioquimicamente especializada e importante para o desenvolvimento e função da JNM (PATTON et al., 1997; para revisão ver SLATER, 1990; SANES & LICHTMAN, 1999, PATTON, 2003 e SANES, 2003).

Dentre as proteínas que compõem a lâmina basal sináptica destaca-se a acetilcolinesterase, glicoproteína envolvida na transmissão do impulso neuromuscular. A acetilcolina liberada pela despolarização do terminal nervoso difunde-se no compartimento extracelular e liga-se aos receptores localizados na membrana pós-sináptica. Estes abrem seus canais para permitir o influxo de íons sódio com conseqüente despolarização e contração da fibra muscular. A acetilcolinesterase hidrolisa a acetilcolina e cessa cada evento de transmissão neuromuscular permitindo aos receptores tornarem-se receptivos novamente (SANES, 2003).

O compartimento pós-sináptico inclui o sarcoplasma juncional e o sarcolema póssináptico. O sarcoplasma juncional caracteriza-se pela presença de núcleos sub-sinápticos, responsáveis pela transcrição do RNA mensageiro das sub-unidades dos receptores de acetilcolina, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, estruturas lisossomais, microtúbulos e grânulos de glicogênio (para revisão ver ENGEL, 1994).

O sarcolema pós-sináptico caracteriza-se pela presença de dobras juncionais que aumentam a superfície pós-sináptica e, portanto a eficácia da transmissão sináptica. As dobras juncionais possuem cerca de 1  $\mu$ m de profundidade e possivelmente resultam da interação mecânica do terminal nervoso sobre o sarcolema durante o desenvolvimento normal da JNM (SANES & LICHTMAN, 1999; MARQUES et al., 2000). Nas cristas das dobras juncionais concentram-se os receptores de acetilcolina na densidade de 10<sup>4</sup>

moléculas/µm<sup>2</sup>, enquanto nas depressões, os canais de sódio e as moléculas de adesão celular neuronal (*neural cell adhesion molecule -* NCAM; HALL & SANES, 1993).

Os receptores de acetilcolina (AChRs) são pentâmeros de sub-unidades homólogas que delimitam um canal iônico central responsável pela recepção e transdução do sinal do terminal nervoso (HALL & SANES, 1993).

Os AChRs de fibras musculares normais adultas localizam-se somente na região sináptica, nas cristas das dobras juncionais do sarcolema pós-sináptico. Esta localização precisa dos receptores sugere haver mecanismos que garantem a sua síntese e organização no sarcolema pós-sináptico.

A síntese dos AChRs ocorre no sarcolema pós-sináptico devida à expressão de seu gene localizado nos núcleos sub-sinápticos e à repressão dele nos núcleos extra-sinápticos. Proteínas como neurogulina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide* - CGRP) induzem a expressão do gene dos AChRs no sarcolema juncional (HALL & SANES, 1993; SANES & LICHTMAN, 1999; para revisão ver WILLMANN & FUHRER, 2002).

Os AChRs sintetizados a partir dos núcleos sub-sinápticos são ancorados no citoesqueleto da fibra muscular por intermédio da proteína rapsina, que se liga ao complexo distrofina-glicoproteínas. A estabilidade e agregação dos AChRs no sarcolema é influenciada pela agrina, proteína sintetizada pelo terminal nervoso e inserida na lâmina basal (HALL & SANES, 1993; SANES & LICHTMAN, 1999; WILLMANN & FUHRER, 2002).

Nos camundongos, a distribuição dos AChRs na membrana sarcoplasmática é remodelada durante toda a vida do animal, mas principalmente nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando ocorre o processo de eliminação sináptica. Neste período de desenvolvimento da JNM, a disposição dos AChRs passa da forma em "placas" para a forma de "pretzel" ou braços contínuos, característico de JNM adulta (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993; MARQUES et al., 2000).

#### **1.6.** Morfologia da junção neuromuscular distrófica

Os humanos afetados pela DMD apresentam alterações morfológicas da JNM similares àquelas encontradas no camundongo *mdx* (ENGEL et al., 1994).

No compartimento pré-sinaptico o terminal nervoso caracteriza-se por finas arborizações com dilatações semelhantes a botões em sua extremidade (LYONS & SLATER, 1991; SANTO NETO et al., 2003), enquanto o compartimento pós-sináptico apresenta redução na quantidade de dobras juncionais e degenerações focais da fibra muscular. Os AChRs dispõem-se em numerosas ilhas, que correspondem aos botões do terminal nervoso. A acetilcolinesterase na lâmina basal sináptica segue a mesma distribuição dos receptores (LYONS & SLATER, 1991; KONG & ANDERSON, 1999; MARQUES et al, *in press*).

As alterações morfológicas encontradas na JNM distrófica, especialmente quanto à distribuição dos AChRs, provavelmente estão relacionadas com a falta da distrofina ou diminuição do complexo ditrofina-glicoproteínas (BANKS et al., 2005).

Entretanto, trabalhos realizados em nosso laboratório sugeriram outras hipóteses para explicar as alterações na distribuição dos AChRs no camundongo distrófico. Estudos utilizando camundongos normais mostraram que fibras musculares regeneradas apresentam alterações no padrão de distribuição dos AChRs semelhantes àquelas observadas em fibras distróficas. Foi sugerido que tais alterações são conseqüências da degeneração e regeneração muscular que ocorrem no animal *mdx* (MINATEL et al., 2001). Adicionalmente, os AChRs dos camundongos distróficos não apresentam modificações no seu padrão de distribuição nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando os ciclos de degeneração-regeneração ainda não se iniciaram (MINATEL et al., 2003).

Estudo utilizando músculos normais e regenerados, em ausência do nervo, sugeriu a influência de mecanismos dependentes da inervação na distribuição dos AChRs dos animais normais (MARQUES et al, *in press*). Na fibra muscular normal e regenerada foram observados brotamentos intraterminais do terminal nervoso, semelhantes àqueles do músculo distrófico regenerado (SANTO NETO et al., 2003), ao redor dos quais agrupam-se os AChRs.

Em conjunto, estes dados sugerem que a distrofina, ou o complexo distrofinaglicoproteínas, não deve ser fundamental para a organização dos AChRs na JNM distrófica e sim o terminal nervoso. Fibras musculares em regeneração produzem fatores de brotamento axonal, tais como a NCAM (WALSH et al., 2000) e fator de crescimento homólogo à insulina-1 (*insulin-like growth factor 1* - IGF1; CARONI et al., 1994). Foi sugerido que tais fatores levariam aos brotamentos intraterminais do músculo distrófico (SANTO NETO et al., 2003). Por sua vez, os AChRs formariam aglomerados em torno destes brotamentos, adquirindo o padrão em "ilhas".

## 1.7. Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo verificar se o terminal nervoso influencia a distribuição dos receptores de acetilcolina das junções neuromusculares distróficas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1. Grupos experimentais

Foram utilizados camundongos da linhagem *mdx*, de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica-CEMIB), com 01 mês (n=08) e 06 meses de idade (n=08). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, em caixas plásticas, sob condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro), com ração e água *ad libitum*.

As idades de 01 mês e 06 meses foram escolhidas, pois consideramos que a deposição gradativa de fibras colágenas e tecido adiposo que segue os sucessivos ciclos de degeneração e regeneração muscular poderia alterar a lâmina basal sináptica e, com isso, alterar o padrão de distribuição dos AChRs, independente do nervo, uma vez que esta contém moléculas que direcionam a inserção e distribuição dos AChRs (BURDEN et al., 1979; BRENNER et al., 1992).

A morfologia e o desenvolvimento das junções neuromusculares normais (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993; MARQUES et al., 2000) e distróficas (XU & SALPETER, 1997; MINATEL et al., 2003) são amplamente estudadas utilizando-se o músculo esternomastóideo. Utilizamos este músculo devido ao seu formato laminar apropriado para ser montado inteiro em lâmina sob lamínula e observado ao microscópio confocal (MINATEL et al., 2001; PEREIRA et al., 2001; SANTO NETO et al., 2003). A seguir, faremos uma descrição resumida dos procedimentos experimentais. A descrição detalhada dos mesmos se encontra nos itens 2.2 a 2.4. O músculo esternomastóideo esquerdo foi submetido à injeção de cloridrato de lidocaína (xilocaína) ou à desnervação e injeção de cloridrato de lidocaína. O músculo contra-lateral serviu de controle. Após 10 dias, os animais foram sacrificados e os músculos coletados e pesados. Os terminais nervosos foram marcados com 4-Di-2-ASP (4-(4-dietilaminoestiril)-N-metilpiridínio iodado; *Molecular Probes*), marcador mitocondrial (MAGRASSI et al, 1987) e os receptores de acetilcolina com alfa-bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTx; *Molecular Probes*, 1:100 em PBS). Após observação dos músculos ao microscópio confocal, estes foram submetidos à técnica histológica de rotina (hematoxilina-eosina), para observação de fibras regeneradas.

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-IB/UNICAMP).

#### 2.2. Tratamento com cloridrato de lidocaína (xilocaína)

O método para indução da degeneração e regeneração das fibras musculares foi a injeção de anestésico local cloridrato de lidocaína a 2% (sem vasoconstritor, solução injetável, *Cristália*), de acordo com trabalho anterior em nosso laboratório (MINATEL et al., 2001). Embora animais *mdx* apresentem ciclos de degeneração e regeneração muscular espontâneos, injetamos xilocaína no ventre do músculo para uniformizar o processo de

regeneração e garantir que as JNMs analisadas fossem de fibras que regeneraram na ausência da inervação.

Os camundongos com 01 mês (n=8) e 06 meses (n=8) de idade foram anestesiados via intra-peritoneal com solução de cloridrato de xilazina 2% (*Vyrbaxyl, Virbac*) e cloridrato de cetamina (*Francotar, Virbac*) na proporção 1:1 e dose de 0,1 ml/30 g de peso corporal. A seguir, realizou-se incisão mediana na face ventral do pescoço do animal desde o ápice da mandíbula até a incisura esternal. A pele e a glândula salivar submandibular esquerda foram rebatidas lateralmente para a exposição do músculo esternomastóide deste antímero (Figura 3).



**Figura 3**: Vista da face ventral do pescoço do animal. A pele e a glândula submandibular esquerda foram rebatidas lateralmente, expondo o músculo esternomastóideo esquerdo (seta).

O músculo esternomastóideo esquerdo dos animais com 01 mês de idade recebeu duas injeções de 0,015 ml e o dos animais com 06 meses de idade recebeu duas injeções de 0,03 ml. As injeções foram aplicadas nos terços proximal e distal do músculo a fim de não comprometer as JNMs localizadas no terço médio do músculo. O músculo contra-lateral serviu como controle, não recebendo a injeção.
#### 2.3. Desnervação do músculo esternomastóideo esquerdo

Os animais com 01 mês (n=05) e 6 meses (n=05) submetidos à desnervação e injeção de xilocaína tiveram o nervo do músculo esternomastóideo esquerdo seccionado, tal como descrito abaixo.

O músculo foi afastado para localização do nervo, que penetra no terço médio do músculo pela face dorsal. Após a localização do nervo, retirou-se um segmento de 3 a 4 mm. O músculo contra-lateral serviu como controle. A pele foi suturada com poliéster siliconado nº 5 e os animais ficaram sob aquecimento até a recuperação. Os camundongos foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia por período de 10 dias até a data da retirada dos músculos.

## 2.4. Marcação do terminal nervoso e receptores de acetilcolina

O terminal nervoso e os receptores de acetilcolina foram marcados de acordo com protocolo de estudo anterior (MARQUES & SANTO NETO, 1998), 10 dias após o tratamento de xilocaína e desnervação.

Os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente e foi realizada uma incisão mediana na região ventral do pescoço do camundongo desde o ápice da mandíbula até a incisura esternal. As glândulas submandibulares foram afastadas lateralmente e os músculos esternomastóideos banhados *in situ* com solução 1 mM de 4Di-2-ASP por 5 minutos. Em seguida, os músculos foram lavados com tampão fosfato (PBS) e rapidamente retirados, montados inteiros em lâmina sob lamínula em PBS e observados ao microscópio

de fluorescência *Nikon Optiphot-2*. Os animais foram sacrificados com *overdose* de hidrato de cloral 10% intra-peritoneal.

O 4-Di-2-ASP é um marcador mitocondrial do terminal nervoso utilizado em estudos sobre JNM de vertebrados (MAGRASSI et al., 1987) em que o animal é mantido vivo (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993). A molécula do 4-Di-2-ASP é excitada com o comprimento de onda de 488 nm e permite visualização do terminal nervoso e dos axônios pré-terminais ao microscópio de fluorescência. Neste mesmo comprimento de onda, é possível observar estriações e núcleos sinápticos e extra-sinápticos da fibra muscular (Figura 4).

Após observação dos músculos ao microscópio de fluorescência para verificar o sucesso da desnervação, as lâminas foram desmontadas e os mesmos foram presos pelas extremidades com alfinetes entomológicos em uma cuba contendo *Sylgard* e fixados durante 10 minutos com paraformaldeído 2%. Em seguida, os músculos foram lavados com PBS por 15 minutos e pesados em balança analítica. A pesagem dos músculos foi realizada somente após a fixação destes, uma vez que a análise das JNMs marcadas com 4-Di-2-ASP deve ser realizada com o músculo a fresco. Após serem pesados, os músculos foram colocados novamente na cuba, lavados várias vezes com PBS e permaneceram em solução de glicina 0,1 M no agitador orbital durante 20 minutos, com objetivo de se inativar o fixador. Após esse período, foram lavados com PBS e incubados com colagenase 1% (tipo I; *Sigma Aldrich*) durante 20 minutos, no agitador, para facilitar a retirada do tecido conjuntivo. Depois, os músculos foram lavados com PBS e os AChRs marcados com alfabungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTx; *Molecular Probes*, 1:100 em PBS) durante 30 minutos. Após esse período, foram lavados novamente com PBS e montados inteiros em

lâmina sob lamínula, em meio de montagem para fluorescência DABCO (1,4-diazabiciclo octano; *Sigma Aldrich*).

**Figura 4:** Marcação dos terminais nervosos com 4Di-2-ASP (A, C) e dos receptores de acetilcolina com alfa-bungarotoxina conjugada a rodamina (B, D), de junções neuromusculares de animal normal (C57Bl/10) com 06 meses de idade. Podemos observar núcleos extra-sinápticos (seta), núcleos sinápticos (cabeça de seta) e estriações da fibra muscular. Em C, verificamos a presença de axônio pré-terminal (\*). Escala: 25 μm



### 2.5. Análise ao microscópio confocal de varredura a laser

Para analisar o padrão de distribuição dos AChRs, utilizou-se o sistema confocal da *Bio-Rad* (MRC 1024 UV), equipado com laser argônio-kriptônio (Ar-Kr) acoplado a um microscópio invertido de fluorescência (*Axiovert 100 Zeiss*). Foi utilizada objetiva de 40x (1.2 NA imersão água) e linha 568 nm com filtro de emissão 585/LP e filtro de barreira T1/E2 supridos pelo fabricante para excitar os receptores colinérgicos marcados com alfabungarotoxina conjugada a rodamina. O brilho e contraste foram mantidos constantes para todos os grupos. Imagens de um único plano focal ou um grupo de imagens de vários planos focais foram adquiridas com auxílio de *software* do fabricante (*Laser Sharp OS/2, BioRad*) e salvas em disco óptico.

Foram analisadas somente as JNMs das três camadas de fibras musculares mais superficiais. Para calcular o índice da área juncional foi utilizado o *software Processing* da *Bio-Rad* para mensurações digitais. O índice da área juncional foi calculado como produto do maior comprimento da JNM disposto ao longo do eixo longitudinal da fibra muscular e da maior largura da JNM disposta no eixo ortogonal da fibra muscular.

# 2.6. Análise histológica

A análise histológica dos músculos esternomastóideos foi realizada para observação de fibras musculares regeneradas. Após observação das lâminas ao microscópio confocal, as mesmas foram desmontadas e os músculos submetidos à técnica histológica de rotina (hematoxilina-eosina). Os músculos foram lavados em água corrente por duas horas, sendo em seguida desidratados em séries de etanol durante duas horas. Após essa etapa, realizouse a pré-infiltração em historesina pura e álcool (1:1) durante duas horas, a 4°C, e a infiltração com historesina pura e ativador por 12 horas, em dissecador a vácuo a 4°C. Na polimerização, os músculos foram colocados em cápsulas preenchidas com solução contendo historesina pura, ativador e endurecedor. Estas cápsulas foram colocadas em estufa a 60°C. Após 72 horas, retirou-se o material da estufa e realizaram-se cortes de 5 μm de espessura, corados com hematoxilina-eosina para observação ao microscópio de luz.

**3. RESULTADOS** 

# **3.1. Tratamento com cloridrato de lidocaína (xilocaína)**

Para verificar a presença de fibras musculares com núcleo central após tratamento com xilocaína, foi realizada análise histológica dos músculos. Os músculos submetidos à injeção de xilocaína ou desnervação e injeção de xilocaína apresentaram nas camadas mais superficiais, maioria das fibras musculares com núcleo central, o que caracteriza fibras regeneradas (Figura 5).

# 3.2. Desnervação do músculo esternomastóideo esquerdo

Para considerar o músculo desnervado, utilizamos como critérios a ausência de marcação do terminal nervoso com 4Di-2-ASP e diminuição do peso muscular, o que sugere atrofia muscular decorrente da ausência da inervação. Os músculos distróficos submetidos a desnervação apresentaram ausência da marcação do terminal nervoso e diminuição significativa de seu peso (Tabela 1).

**Tabela 1:** Peso (mg) dos músculos esternomastóideos de camundongos *mdx* com 01 mês e06 meses de idade. Os valores representam a média ± desvio padrão.

Idade	Inervado	Desnervado	
01 mês	14,6±4,7	7,42±3,2*	
	(n=11)	(n=5)	
06 meses	21,5±5,7	13,2±3,0*	
	(n=11)	(n=5)	

\* Estatisticamente significativas quando comparada à média do peso dos músculos inervados (p≤0,05. Teste *t Student*).

# 3.3. Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina

Os AChRs foram classificados em cinco categorias, de acordo com seu padrão de distribuição: placa perfurada, braços contínuos, ilhas (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993; MARQUES et al., 2000; MINATEL et al., 2001), desnervado tipo braços contínuos e desnervado tipo ilhas.

Ao nascimento, a distribuição dos AChRs de animais normais e distróficos se dá sob a forma de placas ovais ou discos, caracterizando o padrão de distribuição em placas.

Nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando ocorre o processo de eliminação sináptica, as placas gradualmente passam a apresentar perfurações (Figura 6A), até assumir o padrão em braços contínuos (Figura 6B).

No padrão de distribuição em braços contínuos (Figura 6B), a distribuição dos AChRs forma estruturas contínuas, alongadas e semelhantes à forma de "pretzel",

denominada de "braços contínuos". Nestas junções, o terminal nervoso acompanha a disposição dos receptores, e seus prolongamentos recobrem os braços contínuos dos mesmos.

No camundongo mdx, o padrão de distribuição em braços contínuos é substituído pelo padrão em ilhas (Figura 6C), a partir do 14° dia de vida, quando iniciam os ciclos de degeneração e regeneração muscular. As JNMs em ilhas foram caracterizadas por aglomerados de AChRs com área central mais escura.

Os padrões desnervado tipo braços contínuos e desnervado tipo ilhas foram observados 10 dias após a desnervação de músculos distróficos. O padrão desnervado tipo braços contínuos (Figuras 7A e 7B) foi observado na maioria das JNMs de camundongos distróficos com 01 mês de idade e foi caracterizado por grupos de AChRs cuja relação comprimento-largura assemelhou-se a dos braços contínuos.

Os músculos desnervados de camundongos *mdx* com 06 meses de idade apresentaram o padrão desnervado tipo ilhas (Figuras 7C e 7D). Este padrão de distribuição caracterizou-se por grupos de AChRs cuja relação comprimento-largura assemelhou-se a das ilhas.

# 3.4. Grupo *mdx* com 01 mês de idade

# Músculos distróficos inervados

As fibras musculares distróficas inervadas e as fibras distróficas inervadas e regeneradas apresentaram o mesmo padrão de distribuição dos AChRs, sendo predominante

o padrão em ilhas (Figura 6C). Este padrão de distribuição esteve presente em 75,2% (n=137) das JNMs observadas de músculos distróficos inervados e em 74,3% (n=100) das JNM observadas de músculos distróficos inervados e regenerados (Histograma 1).

O padrão de distribuição dos AChRs em braços contínuos (Figura 6B) esteve presente nos músculos distróficos inervados e músculos distróficos inervados e regenerados em porcentagens semelhantes (Histograma 1). O padrão em placa perfurada (Figura 6A) foi observado em menor proporção (Histograma 1).

**Histograma 1:** Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs) em músculos inervados, em músculos inervados e regenerados e em músculos desnervados e regenerados de animais distróficos com 01 mês de idade.



	Inervado	Inervado+Xilocaína	Desnervado+Xilocaína
Placa perfurada	2,2%	1,5%	10,3%*
Braços contínuos	22,6%	24,2%	10,3%*
Ilhas	75,2%	74,3%	-
Desnervado tipo	-	-	79,4% *
braços contínuos			
N° total de JNMs	137	100	90
observadas			

\* p<0,05 (Teste Qui-quadrado, X<sup>2</sup>)

Quanto ao índice da área juncional, JNMs em placa perfurada apresentaram o menor índice, em média,  $351,85\pm84,58 \ \mu\text{m}^2$ , enquanto as JNMs em ilhas, o maior índice, em média,  $1794,23\pm946,48 \ \mu\text{m}^2$  (Tabela 2).

As ilhas mediram, em média,  $4,7\pm1,3$  µm de comprimento com  $4,3\pm0,9$  µm de largura (Tabela 3), enquanto os braços,  $18,6\pm8,6$  µm de comprimento com  $4,61\pm1,1$  µm de largura (Tabela 3).

**Tabela 2**: Índice da área juncional de camundongos mdx com 01 mês de idade. Os valores representam a média ( $\mu$ m<sup>2</sup>) ± desvio padrão.

Placa	Braços	Ilhas	Desnervado tipo	Número total de
perfurada	contínuos		braços contínuos	JNMs analisadas
351,85±84,58	881,96±740,15	1794,23±946,48*	441,86±201,35**	60

\* Estatisticamente significativa se comparada com JNM em placas perfuradas e em braços contínuos (p≤0,05. Teste *t Student*)

\*\* Estatisticamente significativa se comparada com JNM em ilhas (p≤0,05. Teste *t Student*)

**Tabela 3**: Média e desvio padrão do comprimento e largura dos braços, ilhas e desnervado tipo braços contínuos observados nas JNMs de animais mdx com 01 mês de idade.

	Braços (n=60)	Ilhas (n=60)	Desnervado tipo
			braços contínuos
			( <b>n=60</b> )
Comprimento	18,6±8,6	4,7±1,3	11,8±7,5*
Largura	4,6±1,1	4,3±0,9	3,8±2,1

\* Estatisticamente significativa se comparada ao comprimento do braço e ao comprimento das ilhas ( $p \le 0.05$ . Teste *t Student*).

#### Músculos distróficos desnervados e regenerados

Entre as JNMs observadas (n=90), 79,4% apresentaram o padrão de distribuição dos AChRs desnervado tipo braços contínuos (Histograma 1, Figuras 7A e 7B). O índice da área juncional destas JNMs foi em média, 441,86±201,35  $\mu$ m<sup>2</sup> (Tabela 2) e apresentou-se menor que o das JNM em ilhas.

Os grupos de AChRs apresentaram, em média,  $11,8\pm7,5$  µm de comprimento com  $3,8\pm2,1$  µm de largura (Tabela 3). A relação comprimento-largura destes grupos de AChRs foi semelhante àquela observada nos "braços contínuos" (Tabela 3).

Quanto ao padrão em placa perfurada (Figura 6A), este representou 10,3% das JNMs analisadas (n=90), assim como o padrão em braços contínuos (Figura 6B; Histograma 1).

# 3.5. Grupo *mdx* com 06 meses de idade

# Músculos distróficos inervados

Os músculos distróficos inervados e músculos distróficos inervados e regenerados apresentaram os AChRs distribuídos em ilhas (Figura 6C) em 100% das JNMs observadas (n=114; Histograma 2).

**Histograma 2:** Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs) em músculos inervados, em músculos inervados e regenerados e em músculos desnervados e regenerados de animais distróficos com 06 meses de idade.



	Inervado	Inervado+Xilocaína	Desnervado+Xilocaína
Placa perfurada	-	-	-
Braços contínuos	-	-	-
Ilhas	100%	100%	-
Desnervado tipo	-	-	100%*
ilhas			
N° total de JNMs	114	95	100
observadas			

\* p<0,05 (Teste Qui-quadrado, X<sup>2</sup>)

O índice da área juncional das JNMs em ilhas apresentou em média, 1403,12 $\pm$ 556,5  $\mu$ m<sup>2</sup> (Tabela 4) e as ilhas mediram, em média, 4,8 $\pm$ 1,2  $\mu$ m de comprimento com 4,5 $\pm$ 1,0  $\mu$ m de largura (Tabela 5).

**Tabela 4**: Índice da área juncional de camundongos mdx com 06 meses de idade. Os valores representam a média ( $\mu$ m<sup>2</sup>) ± desvio padrão.

Ilhas	Desnervado tipo ilhas	Número total de JNMs analisadas
1403,12±556,5	1031,89±237,13*	60

\* Estatisticamente significativa se comparada com JNM em ilhas (p≤0,05. Teste t Student)

 Tabela 5: Média e desvio padrão do comprimento e largura das ilhas e desnervado tipo

 ilhas observados nas JNMs de animais *mdx* com 06 meses de idade.

	Ilhas (n=60)	Desnervado tipo ilhas (n=60)
Comprimento	4,8±1,2	6±3,8
Largura	4,5±1,0	4,6±2,5

Não houve diferença estatisticamente significativa (p>0,05.Teste t Student).

#### Músculos distróficos desnervados e regenerados

Todas as JNMs observadas (n=100) apresentaram o padrão de distribuição dos AChRs desnervado tipo ilhas (Histograma 2; Figuras 7C e 7D). O índice da área juncional destas JNMs apresentou-se reduzido se comparado ao das ilhas (Tabela 4) e ao do desnervado tipo braços contínuos (Tabela 2).

Os grupos de AChRs apresentaram relação comprimento-largura semelhantes àquela observada nas "ilhas" (Tabela 5). Diferiram-se das ilhas por não apresentarem região central mais escura.

# **3.6. Figuras**

**Figura 5:** Músculo esternomastóideo desnervado e regenerado de camundongo distrófico com 01 mês de idade. Observe presença de fibras musculares com núcleo central (seta) nas camadas superficiais do músculo. Escala: 50 µm



**Figura 6:** Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina de músculos esternomastóideos inervados de animais distróficos com 01 mês (A, B) e 06 meses de idade (C). Observar o padrão de distribuição em placa (A), em braços contínuos (B) e em ilhas (C). Escala: 11 μm (A), 17 μm (B), 36 μm (C)



**Figura 7:** Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina de músculos distróficos desnervados de camundongos com 01 mês (A, B) e 06 meses de idade (C, D). Em A e B, padrão de distribuição dos AChRs desnervado tipo braços contínuos e em C e D, padrão desnervado tipo ilhas. Escala: 10 μm (A), 6 μm (B), 19 μm (C), 16 μm (D)



4. DISCUSSÃO

# 4.1. Metodologia utilizada

O camundongo da linhagem *mdx* é o modelo experimental mais utilizado para o estudo da distrofia muscular de Duchenne (ENGEL et al., 1994; BLAKE et al., 2002). Os animais desta linhagem apresentam falta da distrofina, proteína estrutural do sarcolema importante na manutenção de sua estabilidade (BULFIELD et al., 1984).

A ausência da distrofina foi sugerida como causa das alterações morfológicas encontradas no componente pós-sináptico das JNMs distróficas, especialmente na distribuição dos AChRs (BANKS et al., 2005).

Entretanto, estudos realizados em nosso laboratório sugeriram outras hipóteses para explicar as alterações no padrão de distribuição dos AChRs dos animais distróficos. A primeira hipótese está relacionada aos ciclos de degeneração e regeneração muscular característicos de *mdx*. Estudo com animais normais verificou-se que fibras musculares regeneradas apresentaram alterações no padrão dos AChRs semelhantes àquelas de animais distróficos (MINATEL et al., 2001). Adicionalmente, os receptores de acetilcolina dos animais *mdx* não apresentam modificações no seu padrão de distribuição nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, quando os ciclos de degeneração e regeneração ainda não se iniciaram (MINATEL et al., 2003). A segunda hipótese sugere que as alterações no padrão de distribuição são influenciadas pela inervação. Estudo com fibras normais regeneradas na

ausência da inervação demonstrou que os AChRs apresentaram padrão normal de distribuição (MARQUES et al, *in press*).

O presente trabalho teve como objetivo verificar se a inervação influencia o padrão de distribuição dos AChRs na JNM distrófica. Para isso, desnervamos músculos esternomastóideos de camundongos da linhagem *mdx*.

Existem vários procedimentos que podem ser utilizados para desnervar músculos, tais como secção ou esmagamento do nervo e injeção de substâncias bloqueadoras da transmissão neuromuscular, tal como succinilcolina (SALPETER et al., 1986; MITSUI et al., 1996; SANTO NETO et al., 2003). O método utilizado neste trabalho foi remoção de um segmento do nervo do músculo esternomastóideo esquerdo, conforme realizado anteriormente em nosso laboratório (MARQUES et al, *in press*). O nervo seccionado requer maior tempo para se regenerar e reinervar o músculo, se comparado ao nervo submetido ao esmagamento (SALPETER, 1987).

Para que não houvesse a reinervação, estabelecemos protocolo de 10 dias após a desnervação para o sacrifício dos animais. Em estudo sobre a influência do nervo na meiavida dos AChRs de músculos esternomastóideos de camundongos normais, verificou-se que a reinervação ocorreu 14 a 30 dias após a secção nervosa (SALPETER et al., 1986).

Para verificar a desnervação muscular, os músculos foram pesados e marcados com 4-Di-2-ASP. A diminuição significativa do peso muscular e a ausência de marcação do terminal nervoso foram utilizados como critérios para considerar o músculo desnervado. A desnervação resulta em deficiência na síntese de actina e miosina, o que leva à atrofia muscular e diminuição de seu peso (BORISOV & CARLSON, 2000; SHAVLAKADZE et al., 2005). A marcação dos terminais nervosos com 4-Di-2-ASP foi realizada utilizando-se protocolo de estudo anterior (MARQUES & SANTO NETO, 1998). Escolhemos esta técnica de marcação por exigir tempo mínimo para ser executada se comparada a outras técnicas de marcação dos terminais nervosos, como a imunohistoquímica. O 4-Di-2-ASP é um marcador mitocondrial (MAGRASSI et. al., 1987) utilizado em estudos sobre morfologia da JNM em que o animal é mantido vivo (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993). Neste trabalho, os músculos marcados foram observados em microscópio de fluorescência imediatamente após sua remoção.

Quanto à injeção de xilocaína no ventre muscular, esta foi utilizada para induzir degeneração e regeneração das fibras musculares (MINATEL et al., 2001) e assim, garantir que as JNMs analisadas fossem de fibras que regeneraram na ausência da inervação. A injeção direta deste anestésico no ventre muscular causa hiper-contração das fibras, entrada de grande quantidade de íons cálcio do meio extracelular para o interior da célula e necrose muscular seguida pela regeneração (FOSTER et al., 1980; NONAKA et al., 1983).

A presença de fibras musculares regeneradas foi verificada através de técnicas histológicas de rotina. Cortes transversais do terço médio do músculo confirmaram presença de fibras com núcleos centrais nas camadas mais superficiais do músculo. Estas fibras, provavelmente, resultaram do processo de regeneração muscular induzido pela injeção de xilocaína, bem como dos ciclos de degeneração e regeneração muscular típicos de camundongos distróficos. Estudos realizados com músculos esternomastóideos normais e regenerados mostraram que as fibras musculares mais superficiais foram as mais vulneráveis à aplicação de xilocaína, pois a forma laminar destes músculos não facilitaria a permanência da xilocaína no interior de seu ventre (MINATEL et al., 2001).

Tendo em vista a localização da maioria das fibras musculares regeneradas nas camadas mais superficiais do músculo, optamos por observar somente as JNMs presentes nas primeiras camadas musculares (3-4 camadas). Assim, concluímos que a metodologia utilizada permitiu certificar que as JNMs analisadas neste estudo eram de fibras musculares regeneradas na ausência da inervação.

#### 4.2. Padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina

### Grupo *mdx* com 01 mês de idade

Nos músculos esternomastóideos regenerados e desnervados de camundongos com 01 mês de idade, a maioria das JNMs observadas não apresentou os AChRs agrupados em ilhas como nos músculos regenerados e inervados (74,3%; n=100). A maioria das JNMs observadas apresentou redução do índice da área e os AChRs agruparam-se formando estruturas tipo braços contínuos (79,4%; n=90), com relação entre comprimento e largura semelhante à dos braços contínuos.

Observações de nosso grupo de estudo utilizando animais normais adultos que tiveram o músculo esternomastódeo regenerado na ausência do nervo mostraram resultado semelhante. Estes músculos apresentaram redução da área juncional e AChRs dispostos em braços contínuos, ao contrário de músculos normais regenerados e inervados que apresentaram AChRs distribuídos em ilhas (MARQUES et al., *in press*).

O padrão de distribuição dos AChRs em braços contínuos é comumente observado em músculos normais e músculos distróficos inervados nas 03 primeiras semanas de vida pós-natal (MINATEL et al., 2003). O padrão de distribuição desnervado tipo braços contínuos provavelmente se deve à lâmina basal sináptica, que se apresentou semelhante àquela do período inicial de desenvolvimento pós-natal da JNM. Proteínas sintetizadas pelo terminal, tais como agrina e indutor da atividade do receptor de acetilcolina (*acetylcholine receptor inducing activity* - ARIA), que permaneceram estáveis na lâmina basal sináptica após regeneração muscular e desnervação, induziram expressão dos genes das sub-unidades dos AChRs (BURDEN et al., 1979; BRENNER et al., 1992), e possivelmente funcionaram como "memória" para os AChRs se distribuírem no padrão "desnervado tipo braços contínuos".

A agrina está localizada na fenda sináptica primária e é responsável pela expressão dos genes dos AChRs e pela ativação do receptor tirosino-quinase (*receptor tyrosine kinase* - MuSK) expresso em miotubos e fibras musculares &ANES & LICHTMAN, 1999; WILLMANN & FUHRER, 2002). A ativação do MuSK inicia reação em cascata de proteínas intracelulares associadas aos AChRs que resulta em agrupamento e ancoramento dos AChRs na membrana sarcolemal (WILLMANN & FUHRER, 2002). A ARIA assim como a agrina, também induz o aumento da transcrição dos genes das sub-unidades dos AChRs (SANES & LICHTMAN, 1999).

O padrão de distribuição dos AChRs em ilhas provavelmente se deve ao terminal nervoso. Fibras musculares normais regeneradas e fibras distróficas adultas apresentam arborização do terminal nervoso em brotamentos intraterminais (SANTO NETO et al., 2003; MARQUES et al, *in press*). Os AChRs agrupam-se em torno do brotamento e delimitam estrutura em forma de ilha com área central mais escura, ocupada pela dilatação do brotamento. Sugere-se que estímulos a estes brotamentos sejam originados pela própria fibra muscular em regeneração, possivelmente pela NCAM (WALSH et al., 2000) e fator IGF1 (CARONI et al., 1994).

Ao nascimento, o camundongo *mdx* não apresenta os AChRs distribuídos em ilhas e sim, em placas, como animais normais (MINATEL et al., 2003). O padrão de distribuição em placas indica poli-inervação da JNM (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993).

Durante as primeiras semanas de vida, cada JNM poli-inervada de camundongos normais e distróficos perde gradualmente os terminais nervosos e passa a ser monoinervada, num processo denominado de eliminação sináptica. A perda de território juncional pelos terminais nervosos está relacionada com as alterações no padrão de distribuição dos AChRs, de placas para padrão em braços contínuos (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993; SANES & LICHTMAN, 1999; MARQUES et al., 2000). No camundongo mdx, a substituição do padrão em braços contínuos pelo em ilhas ocorre normalmente a partir da 2<sup>a</sup> semana de idade, quando iniciam os primeiros ciclos de degeneração e regeneração muscular (MINATEL et al., 2003) e conseqüente arborização do terminal nervoso (SANTO NETO et al., 2003).

Neste trabalho, os padrões de distribuição dos AChRs em placa perfurada e em braços contínuos foram observados nos músculos desnervados e inervados até o 40° dia de vida do animal. A presença de AChRs dispostos em placas e braços contínuos nos animais *mdx* com 01 mês de idade reforça a sugestão de que a distrofina ou complexo distrofina-glicoproteínas não deve ser fundamental na distribuição dos AChRs em camundongos jovens, e sim o terminal nervoso e a lâmina basal sináptica.

O número de JNMs em placa perfurada foi maior nos músculos desnervados, provavelmente devido aos mesmos mecanismos que justificam a presença do padrão desnervado tipo braços contínuos nestes músculos. As JNMs em braços contínuos após a desnervação possivelmente passaram a apresentar o padrão em placa perfurada em função da lâmina basal sináptica que se apresentou semelhante a do período neonatal. Adicionalmente, devemos considerar a idade em que ocorreu a desnervação muscular, uma vez que camundongos normais que têm músculo desnervado nos primeiros dias de vida apresentam comprometimento maior das estruturas do componente pós-sináptico que animais adultos (SALPETER, 1987).

Assim, concluímos que o terminal nervoso influencia o padrão de distribuição dos AChRs nos músculos distróficos de animais com 01 mês de idade, uma vez que estes músculos, quando desnervados, apresentaram os AChRs dispostos no padrão desnervado tipo braços contínuos e não em ilhas, típico de fibras musculares normais regeneradas e fibras distróficas adultas inervadas. Este padrão de distribuição provavelmente se deve à lâmina basal sináptica que se manteve semelhante àquela do período inicial de desenvolvimento da JNM.

### Grupo *mdx* com 06 meses de idade

Os músculos desnervados de camundongos *mdx* com 06 meses de idade apresentaram redução do índice da área juncional de todas as JNMs observadas, possivelmente devido à atrofia muscular. Nestas JNMs os AChRs não se distribuíram em ilhas e sim em um padrão desnervado tipo ilha, cujos grupos de AChRs mediram em média, 6±3,8µm de comprimento com 4,6±2,5µm de largura. Embora a relação entre comprimento e largura destes grupos de AChRs fosse similar à das ilhas, estes não foram classificados como ilhas, por não apresentarem área central mais escura.

A presença de AChRs distribuídos no padrão desnervado tipo ilhas nos músculos desnervados de camundongos com 06 meses de idade, provavelmente está relacionada à gradativa deposição de colágeno entre as fibras musculares que segue os ciclos de degeneração e regeneração muscular. Estudo utilizando músculos distróficos de animais com 07 meses de idade mostrou que fibras regeneradas são envolvidas por até 10 camadas de lâmina basal (ANDERSON et al., 1987). Sugere-se que a fibrose presente no tecido muscular de camundongos *mdx* com 06 meses de idade (ROIG et al., 2004), tenha alterado estruturalmente a lâmina basal sináptica ao longo da vida do animal impedindo os AChRs de distribuírem-se em padrão desnervado tipo braços contínuos, como ocorreu nos animais com 01 mês de idade.

O padrão desnervado tipo ilhas sugere novamente a influência de proteínas sintetizadas pelo terminal nervoso, constituintes da lâmina basal sináptica, que funcionaram como "memória" para o padrão de distribuição dos AChRs (BURDEN et al., 1979;

BRENNER et al., 1992). Os AChRs de músculos desnervados de camundongos *mdx* com 06 meses de idade distribuíram-se conforme padrão em ilhas existente antes da desnervação. O padrão em ilhas é determinado pela arborização do terminal nervoso que ocorre a partir da 2ª semana de vida do animal, quando iniciam os ciclos de degeneração e regeneração muscular. Adicionalmente, os AChRs de JNMs normais adultas são estáveis e a manutenção de sua estabilidade é independente do nervo, ao contrário das JNMs jovens, que são essencialmente dependentes da inervação para manter sua estrutura, bem como a densidade e localização dos AChRs (SALPETER, 1987).

Embora consideremos que a matriz extracelular exerça papel importante na disposição dos AChRs de músculos desnervados, esta hipótese não exclui a possibilidade da distrofina ou complexo distrofina-glicoproteínas influenciar a estabilidade dos AChRs na membrana sarcolemal, visto que músculos distróficos apresentam acelerada degradação dos AChRs se comparados aos músculos normais (XU & SALPETER, 1997).

Assim, concluímos que a distribuição dos AChRs em músculos distróficos inervados provavelmente é dependente da inervação. Sugere-se que moléculas produzidas durante a regeneração muscular, como a N-CAM e IGF1, induzem brotamentos intraterminais que são responsáveis pelo padrão de distribuição dos AChRs em ilhas. Na ausência da inervação, os AChRs de animais com 06 meses de idade apresentaram o padrão de distribuição desnervado tipo ilhas, diferentemente daquele encontrado em músculos desnervados de animais com 01 mês de idade. Sugerimos que os sucessivos ciclos de degeneração e regeneração e fibrose muscular que ocorrem ao longo da vida do animal tenham alterado estruturalmente a lâmina basal sináptica impedindo os AChRs de se distribuírem em padrão desnervado tipo braços contínuos.

### 4.3. Conclusão

A lâmina basal exerce papel fundamental no desenvolvimento e função de músculos e de JNMs. Em músculos estriados esqueléticos de vertebrados a lâmina basal atua na diferenciação dos componentes pré e pós-sinápticos da JNM, funciona como suporte mecânico do sarcolema durante a contração muscular e promove adesão entre as estruturas que compõem as junções miotendínea e neuromuscular. O padrão desnervado tipo ilhas dos AChRs possivelmente refletiu a arquitetura molecular da lâmina basal sináptica, que talvez tenha se modificado com os ciclos de degeneração e regeneração do músculo distrófico, nos animais adultos.

Em conjunto, o presente estudo sugere que o conhecimento da organização molecular da lâmina basal, das suas relações com o terminal nervoso e modificações pelos ciclos de degeneração e regeneração, são de importância para melhor entendimento da formação da JNM em fibras derivadas de terapia celular, bem como das patologias que envolvem a lâmina basal muscular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J.E.; OVALLE, W.K.; BRESSLER, B.H. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the *mdx* mouse. **The Anatomical Record**, v. 219, p. 243-257, 1987.

BALICE-GORDON, R.J.; LICHTMAN, J.W. *In vivo* observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. **The Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 2, p. 834-855, 1993.

BANKS, G.B.; CHAMBERLAIN, J.S.; FROEHNER, S.C. Dystrophin is required to stabilize neuromuscular synapses independent of muscle regeneration. In: SOCIETY'S ANNUAL MEETING, 35, 2005, Washington, DC, Abstract View, Online. Programa n° 493.17.

BERTORINI, T.E.; BHATTACHARYA, S.K.; PALMIERI, G.M.A.; CHESNEY, C.M.; PIFER, D; BAKER, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**, v. 32, n. 10, p. 1008-1092, 1982.

BLAKE, D.J.; WEIR, A.; NEWEY, S.E.; DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 291-329, 2002.

BOGDANOVICH, S., PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.

BONILLA, E.; SAMIT, C.E.; MIRANDA, A.F.; HAYS, A.P.; SALVIATI, G.; DIMAURO, S.; KUNKEL, L.M.; HOFFMAN, E.P.; ROWLAND, L.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. **Cell**, v. 54, p. 447-453, 1988.

BÖÖJ, S.; LARSSON, P.-A; DAHLLÖF, A.-G.; DAHLSTRÖM, A. Axonal transport of synapsin I- and cholinergic synaptic vesicle-like material; further immunohistochemical evidence for transport of axonal cholinergic transmitter vesicles in motor neurons. Acta Physiologica Scandinavica, v. 128, p. 155-165, 1986.

BORISOV, A.B.; CARLSON, B.M. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. **The Anatomical Record**, v. 258, p. 305-318, 2000.

BRENNER, H.R.; HERCZEG, A.; SLATER, C.R. Synapse-specific expression of acetylcholine receptor genes and their products at original synaptic sites in rat soleus muscle fibers regenerating in the absence of innervation. **Development**, v. 116, p. 41-53, 1992.

BROWN, R.H.; JR, DPHIL. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. Annual Review of Medicine, v. 48, p. 457-466, 1997.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K. X-chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Processings of the National Academy of** Sciences of United States of America, v. 81, n. 4, p. 1189-1192, 1984.

BURDEN, S.J.; SARGENT, P.B.; McMAHAN, U.J. Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of nerve. **The Journal of Cell Biology**, v. 82, p. 412-425, 1979.

CARONI, P.; SCHNEIDER, C.; KIEFER, M.C.; ZAPF, J. Role of muscle insulin-like growth factors in nerve sprouting: suppression of terminal sprouting in paralysed muscle by IGF-binding protein-4. **The Journal of Cell Biology**, v. 125, p. 893-902, 1994.

CHAKKALAKAL, J.V.; THOMPSON, J.; PARKS, R.J.; JASMIN, B.J. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 880-891, 2005.

CULLIGAN, K.; BANVILLE, N; DOWLING, P.; OHLENDIECK, K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding of dystrophic *mdx* mouse. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 2, p. 435-445, 2002. DiMARIO, J.X.; UZMAN, A.; STROHMAN, R.C. Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (*mdx*) mouse skeletal muscle. **Developmental Biology**, v. 148, n. 1, p. 314-321, 1991.

ENGEL, A.G. The neuromuscular junction. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, G. **Myology**. New York: McGraw-Hill, 1994. 1129p. p.261-302. ISBN 0070195587.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology.** New York: McGraw-Hill, 1994. 1937p. p.1133-1187. ISBN 0070195595.

ERVASTI, J.M.; CAMPBELL, K.P. Membrane organization of the dystrophinglycoprotein complex. **Cell**, v. 66, p. 1121-1131, 1991.

FOSTER, A.H.; CARLSON, B.M. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. **Anesthesia and Analgesia**, v. 59, n. 10, p. 727-736, 1980.

GRADY, R.M.; ZHOU, H.; CUNNINGHAM, J.M.; HENRY, M.D.; CAMPBELL, K.P.; SANES, J.R. Maturation and maintence of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. **Neuron,** v. 25, p. 279-293, 2000. HALL, Z. W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, v. 72, p. 99-121, 1993.

HEUSER, J.E.; REESE, T.S. Structural changes after transmitter release at frog neuromuscular junction. **The Journal of Cell Biology**, v. 88, p. 564-580, 1981.

HOFFMAN, E.P.; BROWN, R.H.; KUNKEL, L.M. Dystrophin: the protein of Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**, v. 51, p. 919-928, 1987.

HUGHES, B.W.; KUSNER L.L.; KAMINSKI, H.J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. **Muscle & Nerve**, v. 33, n. 4, p. 445-461, 2006.

KONG, J.; ANDERSON, J.E. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptors aggregates. **Brain Research**, v. 839, p. 298-304, 1999.

LYONS, P.R.; SLATER, C.R. Structure and function of neuromuscular junction in young adult *mdx* mice. Journal of Neurocytology, v. 20, p. 969-981, 1991.

MAGRASSI, L.; PURVES, D.; LICHTMAN, J.W. Fluorescent probes that stain living nerve terminals. **The Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 1207-1214, 1987.

MARIOL M.C.; SÉGALAT, L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. **Current Biology**, v. 11, p. 1691-1694, 2001.

MARQUES, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 3, p. 145-152, 2004.

MARQUES, M.J.; CONCHELLO, J.A.; LICHTMAN, J.W. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 3663-3675, 2000.

MARQUES, M.J.; MENDES, Z.T.R.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers. **Journal of Neurocytology**; *in press*.

MARQUES, M.J.; SANTO NETO, H. Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. **Journal of Anatomy**, n. 192, p. 425-430, 1998.

MINATEL, E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribuition at the neuromuscular junction of regenerated muscle fiber. **Muscle & Nerve**, v. 24, p. 410-416, 2001.

MINATEL, E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice. **Muscle & Nerve**, v.28, p.561-569, 2003.
MITSUI T.; KAWAI H.; KAWAJIRI, M.; KUNISHIGE, M.; AKI, K; SAITO, S. Induction of dystrophin-associated proteins together with nicotinic acetylcholine receptors by denervation in the absence of dystrophin in skeletal muscles of *mdx* mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 802-807, 1996.

NONAKA, I.; TAKAGI, A.; ISHIURA, S.; NAKASE, H; SUGITA, H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). Acta Neuropathologica, v. 60, p. 167-174, 1983.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of Neurological Science**, v. 129, p. 97-105, 1995.

PATTON, B.L. Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. **Journal of Neurocytology**, v. 32, p. 883-903, 2003.

PATTON, B.L.; MINER, J.H.; CHIU, A.Y.; SANES, J.S. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. **The Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 6, p. 1507-1521, 1997.

PEREIRA, E.C.L.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Immunolocalisation of neuronal nitric axide synthase at the neuromuscular junction of *mdx* mice: a confocal microscopy study. **Journal of Anatomy**, v. 198, p. 663-671, 2001.

PETROF, B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 179, p. 111-123, 1998.

RANDO, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle and Nerve,** v. 24, p. 1575-1594, 2001.

ROIG, M.; ROMA, J.; FARGAS, A.; MUNELL, F. Longitudinal pathologic study of the gastrocnemius muscle group in the *mdx* mice. **Acta Neuropathologica**, v. 107, p. 27-34, 2004.

RUEGG, U.T.; MÉTRAL, V.N.; CHALLET, C.; HÉLARY, K.B.; DORCHIES, O.M.; WAGNER, S.; BUETLER, T.M. Pharmacological control of cellular calcium handling in dystrophic skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. S155-S161, 2002.

SALPETER, M.M. Vertebrate neuromuscular junction: General morphology, molecular organizationn, and fuction consequence. In:\_\_\_\_. **The vertebrate neuromuscular junction**. New York: Alan R. Liss, 1987, p.1-54.

SALPETER, M.M.; COOPER, D.L.; LEVITT-GILMOUR, T. Degradation rates of acetylcholine receptors can be modified in the postjunctional plasma membrane of the vertebrate neuromuscular junction **The Journal of Cell Biology**, v. 103, p. 1399-1403, 1986.

SANES, J.R.; LICHTMAN, J.W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. Annual Review of Neuroscience, v. 22, p. 389-442, 1999.

SANES, J.R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 278, n. 15, p. 12601-12604, 2003.

SANTO NETO, H.; MARTINS, A.J.; MINATEL, E.; MARQUES, M.J. Axonal sprouting in *mdx* mice and its relevance to cell and gene mediated therapies for Duchenne muscular dystrophy. **Neuroscience Letters**, v. 343, p. 67-69, 2003.

SHAVLAKADZE, T.; WHITE, J.D.; DAVIES, M.; HOH, J.F.Y.; GROUNDS, M.D.Insulin-like growth factor I slows the rate of denervation induced skeletal muscle atrophy.Neuromuscular Disorders, v. 15, p. 139-146, 2005.

SLATER, C.R. The basal lamina and stability of the mammalian neuromuscular junction. **Progress in Brain Research**, v. 84, p. 73-81, 1990.

TORRES, L.F.B.; DUCHEN, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**, v. 110, p. 269-299, 1987.

WALSH, F.S.; HOBBS, C.; WELLS, D.J.; SLATER, C.R.; FAZELI, S. Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic results in terminal sprouting at the

neuromuscular junction and altered structure but not function. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 244-261, 2000.

WESSELS, A.; GINJAAR, I.B.; MOORMAN, A.F.M. Different localization of dystrophin in developing and adult human skeletal muscle. **Muscle and Nerve**, v. 14, p. 1-7, 1991.

WILLMANN, R.; FUHRER, C. Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptor revisited. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1296-1316, 2002.

XU, R.; SALPETER, M.M. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic *mdx* mice degrade as after denervation. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8194-8200, 1997.

6. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

The spatial organization of acetylcholine receptors in dystrophic muscles is influenced by the nerve terminal

By Maria Julia Marques, Ana Paula Tiemi Taniguti, Elaine Minatel and Humberto Santo Neto

Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo - 13084-971, Brazil

Running title: Nerve terminal and AChR distribution in *mdx* junctions

All correspondence should be addressed to:

Dr. Maria Julia Marques

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P. 6109 Campinas, SP - 13083-970, Brazil.

fax: 55-19-3289-3124

phone: 55-19-3788-6395

email: marques@unicamp.br

Key words: acetylcholine receptors, mdx mice, muscle fiber regeneration, neuromuscular junction remodeling.

## ABSTRACT

Changes in the distribution of acetylcholine receptors have been reported to occur at the neuromuscular junction of *mdx* mice and may be a consequence of muscle fiber regeneration rather than the absence of dystrophin. In the present study, we examined whether the nerve terminal determines the fate of acetylcholine receptor distribution in the dystrophic muscle fibers of mdx mice. The left sternomastoid muscle of young (1 month old) and adult (6 months old) mdx mice was injected with 60 µl lidocaine hydrochloride to induce muscle degeneration-regeneration. Some mice had their sternomastoid muscle denervated at the time of lidocaine injection. After 10 days of muscle denervation, nerve terminals and acetylcholine receptors were labeled with 4Di-2-ASP and rhodamine- $\alpha$ bungarotoxin, respectively, for confocal microscopy. In young mdx mice, 75% (n=137 endplates) of the receptors were distributed in islands. The same was observed in 100% (n=114 endplates) of the adult junctions. In denervated-regenerated fibers of young mice, the receptors were distributed as branch-like aggregates in 80% of the endplates (n=90). In denervated-regenerated fibers of adult mice, the receptors were distributed in island-like aggregates in 100% of the endplates (n=100). These findings suggest that nerve-dependent mechanisms are involved in the changes in receptor distribution in young dystrophic muscles. In older dystrophic muscles other factors may play a role in their distribution.

Introduction

*Mdx* mutant mice are characterized by a marked deficiency in dystrophin (Hoffman et al., 1987; Sicinski et al., 1989). These mice also show acute muscle fiber necrosis followed by regeneration (Tanabe et al., 1986), and therefore provide a model for studying the mechanisms underlying muscle fiber degeneration and regeneration and the effects of a lack of dystrophin on muscle fiber components.

Significant structural abnormalities are observed at the neuromuscular junctions of *mdx* mice, mainly at the postsynaptic site, with a reduction in the number and depth of postsynaptic folds (Torres and Duchen, 1987). Acetylcholine receptors (AChRs) as well as acetylcholinesterase are present in numerous small spots. These changes were found exclusively at the neuromuscular junctions of regenerated muscle fibers (Lyons and Slater, 1991), suggesting that muscle regeneration rather than dystrophin deficiency is responsible for remodeling of the postsynaptic components (Minatel et al., 2001). Controversies exist regarding the effects of muscle regeneration and lack of dystrophin on the assembly of postsynaptic molecules. Recently, dystrophin has been demonstrated to provide structural stabilization of adult neuromuscular junctions, irrespective of muscle fiber regeneration (Banks et al., 2005).

We have previously shown that the nerve terminal determines changes in AChR distribution in normal regenerated muscle fibers (Marques et al., 2006b, in press). In the present study, we examined whether the nerve terminal would also dictate the distribution of AChRs in denervated-regenerated fibers of young and adult mdx mice. Our results indicate that nerve terminals play a role in the patterning of receptor distribution.

## Materials and Methods

#### Animals

Young (1 month old; n=8) and adult (6 months old; n=8) *mdx* mice were obtained from a breeding colony maintained by our institutional animal care facility. The mice were housed according to institutional guidelines and had access to food and water *ad libitum*. The animal experiments described here were approved by the institutional Ethics Committee on Animal Experimentation and were done in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA).

## Intramuscular injection of lidocaine hydrochloride

*Mdx* mice show spontaneous cycles of muscle fiber degeneration-regeneration that occur at different time points for each fiber. To induce a uniform wave of regenerated fibers mainly in the superficial fibers of the dystrophic sternomastoid (STN) muscle, we used the local anesthetic lidocaine hydrochloride as described before for normal muscles (Minatel et al., 2001). Local anesthetics induce muscle fiber necrosis by permitting extracellular fluid to enter the sarcoplasm, leading to extensive  $Ca^{2+}$  ion accumulation, myofibrillar hypercontraction and necrosis (Zink and Graf, 2004). Myonecrosis is followed by rapid fiber regeneration, since satellite cells are preserved and vascular supply and connective tissue are unaffected (Nonaka et al., 1983). The STN muscle was used because it is a thin flat muscle suitable for whole-mount preparations and for viewing by confocal microscopy and since much is known about the distribution of AChRs in this muscle (Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Marques and Santo Neto, 1998; Marques et al., 2000).

The mice (08 young and 08 adult) were anesthetized with a mixture (1:1) of

ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis) and thiazine hydrochloride (Rompun, Bayer) at a dose of 0.02 g/ml. The ventral surface of the neck was shaved and a midline incision was made from the apex of the mandible to the sternal notch. The left STN muscle was exposed by lateral reflection of the salivary glands and received two intramuscular injections of lidocaine hydrochloride (30  $\mu$ l each). The contralateral side served as control. The skin was closed with interrupted Ethicon 5.0 sutures and the wound was carefully cleaned.

### Muscle denervation

At the same time of lidocaine hydrochloride injection, the left STN muscle of 5 young and 5 adult *mdx* mice was denervated by excising a 3-4 mm segment of the nerve to the STN muscle. The skin was sutured with interrupted Ethicon 5.0 sutures and the wound was carefully cleaned. After 10 days, the muscles were processed for staining of AChRs and nerve terminals. No nerve terminal staining was detected in these animals. After confocal observation, the same muscles were stained with hematoxylin-eosin (HE) to assess muscle regeneration.

## Confocal microscopy

#### Nerve terminal

The success of muscle denervation was assessed by nerve terminal labeling with 4-Di-2-ASP as described elsewhere (Marques and Santo Neto, 1998). Briefly, 10 days after denervation, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine hydrochloride (Ketalar) and thiazine hydrochloride (Rompun) as described above. The neck of the animals was opened by a midline incision from the apex to the sternal notch. Both STN muscles were exposed by lateral reflection of the salivary glands. The muscles were bathed *in situ* in a 1 mM solution of 4-Di-2-ASP (Molecular Probes, Eugene, OR) for 3-4 min. The muscles were quickly removed and the animals were euthanized with an overdose of the anesthetic solution. The muscles were mounted on a slide in phosphate-buffered saline (PBS), covered with a coverslip and examined with the BioRad MRC 1024 system coupled to an Axiovert 100 Zeiss inverted microscope using a 40x 1.4NA water objective for confocal examination. The excitation source was an Ar-Kr laser at a wavelength of 488 nm. Full frame 512 x 512 pixel images of nerve terminals from controls were collected (Fig. 4) and stored on magnetic optical discs. No nerve terminal labeling was seen in denervated STN.

## Acetylcholine receptor

The right and left STN muscles were then placed on a Sylgard dish washed with PBS and fixed for 30 min with cold fixative (4% formaldehyde in PBS). The muscles were weighed and incubated with 1  $\mu$ g/ml rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin (Molecular Probes) for 30 min at room temperature. After washing with PBS, the muscles were mounted in DABCO (mounting medium for fluorescence microscopy, Sigma) and then observed under the confocal microscope. A wavelength of 568 nm (Ar-Kr laser) was used to excite the rhodamine-labeled receptors. A 40X 1.4 NA water immersion Zeiss microscope objective was used for confocal imaging. An index of the junctional area was calculated as the

product of the maximum length of the junction in the long axis of the muscle fiber and the maximum width of the junction in the orthogonal axis (Marques et al., 2000) using the BioRad processing software for digital measurement. The length and width of junctional branches and spots were calculated using the BioRad processing software and comparisons between groups were made using the Student *t*-test.

#### Light microscopy

After confocal observation, the STN muscles were removed from the slides and stained with HE to evaluate muscle fiber regeneration. Briefly, the STN muscles were fixed overnight in 10% formaldehyde, dehydrated in an ethanol series and embedded in paraffin. Cross-sections (5  $\mu$ m thick) were stained with HE and examined under a Nikon-Optiphot-2 light microscope connected to a Hamamatsu videocamera and a Sony monitor.

### Results

## Lidocaine injections and muscle denervation

By day 10 after lidocaine injection, regeneration was predominant in the superficial layers of the STN muscle fibers of *mdx* mice and there were no signs of ongoing necrosis (Fig. 5). In cross-sections, most of the fibers in young and adult *mdx* superficial fibers showed dense and still centrally located nuclei (Fig. 5). As expected, innervated muscles showed nerve terminals labeled with 4-Di-2-ASP covering the branches of AChRs (Fig. 4). By day 10 of muscle denervation, no nerve terminal labeling with 4-Di-2-ASP was seen and the weight of denervated muscles was reduced by 56.7 % (Table 1).

Junctions from innervated mdx muscle fibers were qualitatively assigned to three categories according to the shape of the junctional AChR aggregates: perforated plaques (Fig. 6A), pretzel or branched pattern (Fig. 6B), and island pattern (Fig. 6C). The perforated plaque pattern is classically described for the postnatal endplates (Balice Gordon & Lichtman, 1990; Marques et al., 2000) as oval or round areas of receptors containing dark holes. The pretzel pattern is classically described for the adult normal junction (Balice Gordon and Lichtman, 1990; Marques et al., 2000) and consists of elongated, smoothly fluorescent branches forming continuous channels that run in several orientations along the muscle fiber. Branches were longer than wider, measuring  $18.6 \pm 8.6 \,\mu\text{m}$  in length and 4.6 $\pm$  1.1 µm in width (Table 2). The island pattern was characterized by round fluorescent areas with a brighter outline and a dark center. The islands showed approximately the same dimensions in the two axes, measuring  $4.7 \pm 1.3 \ \mu\text{m}$  in length and  $4.3 \pm 0.9 \ \mu\text{m}$  in width (Table 2), and have been described before for the *mdx* junctions (Lyons and Slater, 1991) of regenerated fibers after a crush lesion (Rich and Lichtman, 1989b) and after short-term injection of lidocaine (Minatel et al., 2001).

In denervated muscles, AChR distribution resembled the branched and island patterns. For these muscles, we used quantitative parameters to classify the pattern of AChR distribution as "denervated branch-like" and "denervated island-like" (Fig. 7). The denervated branch-like pattern consisted of receptor aggregates resembling the branches, but with a fragmented appearance. As the regular branches, they were also longer than wider, measuring 11.8  $\pm$ ?7.5 µm in length and 3.8  $\pm$  2.1 µm in width (Table 2) and were

present in up to 60% of the junctional area. The denervated island-like pattern was characterized by fragmented islands of receptors, with no dark center and with dimensions similar to the innervated islands ( $6.0 \pm 3.8 \ \mu m$  in length and  $4.6 \pm 2.5 \ \mu m$  in width; Table 2), and was present in more than 80% of the junctional area.

In young innervated mdx muscle fibers, the island pattern of receptors predominated (78% of the endplates), followed by the branched pattern (20%), and few junctions were classified as perforated plaques (2%). In young denervated mdx fibers, the branch-like pattern was observed in 80% of the junctions. There was a significant increase in the number of perforated plaques and the island pattern was not observed 10 days after denervation (Table 3).

In adult innervated-mdx muscle fibers, 100% of the junctions examined showed the island pattern of distribution. By day 10 after denervation, the island-like pattern predominated in all junctions. Perforated plaques and branches were not seen (Table 3).

## Discussion

We found that AChRs in denervated-regenerated muscle fibers of young *mdx* mice were mainly distributed in a branch-like pattern. Islands of receptors, which are typical in innervated dystrophic muscles at this age, were not seen. Moreover, there was a significant increase in perforated plaques compared to control mice. These results show that the nerve terminal determined the spatial organization of AChRs in young dystrophic fibers of *mdx* mice. The formation of mature neuromuscular junctions is characterized by the clustering and neuronal alignment of AChRs. The initial AChR clustering occurs independently of innervation and is mainly dictated by molecules of the basal lamina. Next, AChRs align with the processes of nerve terminals through the action of neural agrin (McMahan, 1990; Bruneau et al., 2005; Misgeld et al., 2005). Both stages of AChR assembly occur in a muscle basement membrane area which is rich in  $\alpha$ 2-laminins, nidogens, non-neural agrin, perlecan, and type IV collagen (Smirnov et al., 2005). In the *mdx* mouse, the pattern of AChR distribution changes during the first two weeks after birth from an oval plaque to a branched form at 14 days of age (Minatel et al., 2003), similar to what is seen in normal mice (Steinbach, 1981; Balice Gordon and Lichtman, 1993; Marques et al., 2000). A few receptor islands are first seen around 21 days after birth in *mdx* mice (Minatel et al., 2003).

Since muscle fiber regeneration occurs inside the original basal lamina tube and lidocaine does not change the molecular composition of muscle basal lamina (Santo Neto et al., 2004), during regeneration of the dystrophic fiber in the absence of nerves, in young mice, the original clues left by nerve terminals during development may dictate the assembly of AChRs, leading to the branched type and some perforated plaques. This is also in agreement with previous studies on myotubes in culture showing that the pretzel shape of the AChR is also attained without the influence of nerves (Kummer et al., 2004).

The extracellular matrix contains interacting ligands which act through MuSKdependent pathways (Lin et al., 2001) that seem to be important for the promotion and stabilization of AChR clusters (Smirnov et al., 2005). Laminin and fibronectin have been shown to induce complex pretzel-like clusters similar to those observed during postnatal developmenl in the absence of nerves (Kummer et al., 2004), although the importance of nerve-derived factors for synaptic organization, such as acetylcholine and agrin, cannot be ruled out (Misgeld et al., 2005). Extracellular matrix components provide a rich array of ligands that interact with adjacent cell surface molecules such as dystroglycan and integrins (Jacobson et al., 2001). Dystroglycans are components of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) and the absence of dystrophin in *mdx* mice is accompained by a decrease in the molecules of the DGC (Ervasti et al., 1990).

In adult regenerated-denervated *mdx* junctions, AChRs were mainly distributed in an island-type pattern and no branches or perforated plaques were seen. Due to the larger number of muscle fiber degeneration-regeneration cycles that older dystrophic fibers had undergone compared to young *mdx* mice, nerve terminals kept their complex organization for a longer period of time. In *mdx* mice, the pattern of nerve terminal distribution is complex (Lyons and Slater, 1991) and is represented by intraterminal sprouts (Santo Neto et al., 2003). According to the new pattern of nerve distribution assumed by the dystrophic junction, the developmental clues left in the basal lamina by the nerve terminal changed overtime. This may initially direct the AChRs to aggregate at particular sites underneath the nerve terminal boutons, inducing receptor remodeling.

Conversely, the nerve terminal branching may possibly be patterned by the regenerated muscle fibers, since it is known that during muscle reinnervation after a nerve lesion, the branching pattern of nerve terminals is determined by postsynaptic morphology (Sanes et al., 1978; Rich and Lichtman, 1989a). If that is the case in the dystrophic muscle, then, changes in the pattern of AChR distribution would lead to the changes in nerve terminal arquitecture seen in mdx mice (Lyons and Slater, 1991; Santo Neto et al., 2003).

However, similar changes in nerve terminal distribution are found in normal regenerated muscles (Marques et al., 2006b; Minatel et al., 2001), sugesting that factors other than the lack of dystrophin are involved. One possibility would be that the junctional basal lamina is affected by the degeneration/regeneration events, with duplication of its layers (Anderson et al., 1987), modifing the original molecular clues for receptor distribution.

Although the importance of dystrophin and the DGC cannot be underestimated (Kong and Anderson, 1999; Banks et al., 2003; Banks et al., 2005), the present results do not support a major role of the DGC in AChR distribution, in agreement with other *in vivo* studies showing a normal pattern of AChR distribution during development of dystrophic junctions (Minatel et al., 2003) and no changes in receptor distribution in adult dystrophic muscles that do not display muscle fiber degeneration-regeneration (Marques et al. a, c unpublished data).

In conclusion, our results show that the nerve terminal influences the spatial organization of AChR in dystrophic muscles. The molecular clues left in the basal lamina during development seem to re-organize in response to muscle degeneration-regeneration, dictating a new assembly of the post- and presynaptic components of the adult dystrophic synapse. Although we cannot rule out that dystrophin and the DGC are important for neuromuscular synapse maturation and stabilization (Banks et al., 2005), the ability of the extracellular matrix to change in response to muscle degeneration-regeneration may provide a useful avenue to explore the mechanisms of neuromuscular junction assembly in cell mediated therapies for dystrophinopaties and for the understanding of basal lamina-related muscle diseases.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant Nos. 95/6110-2, 01/08853-5 and 01/00570-4). H.S.N. and M.J.M. are the recipients of fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 300061/99-4 and 301053/91-0). A.P.T.T. is the recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Anderson JE, Ovalle WK, Bressler BH. 1987. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the mdx mouse. Anat Rec 219:243-257.

Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1990. In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. J Neurosci 10:894-908.

Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. 1993. In vivo observation of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. J Neurosci 13:834-855.

Banks GB, Chamberlain JS, Froehner SC. 2005. Dystrophin is required to stabilize neuromuscular synapses independent of muscle regeneration. In: Society's Annual Meeting, 35, Washington, DC. Abstract view. Online. Program No. 493.17.

Banks GB, Fuhrer C, Adams ME, Froehner SC. 2003. The postsynaptic submembrane machinery at the neuromuscular junction: requirement for rapsyn and utrophin/dystrophin-associated complex. J Neurocytol 32:709-726.

Bruneau EG, Macpherson PC, Goldman D, Hume RI, Akaaboune M. 2005. The effect of agrin and laminin on acetylcholine receptor dynamics in vitro. Dev Biol 288:248-258.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell K. 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. Nature 345:315-319.

Hoffman EP, Brown RHJR, Kunkel LM. 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51:919-928.

Jacobson C, Cote PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S. 2001. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. J Cell Biol 152:435-450.

Kong J, Anderson JE. 1999. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. Brain Res 839:298-304.

Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF. 2001. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. Nature 410:1057-1064.

Lyons PR, Slater CR. 1991. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. J Neurocytol 20:969-981.

Kummer TT, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR. 2004. Nerve-independent formation of a topologically complex postsynaptic apparatus. J Cell Biol 164:1077-1087.

Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. 2000. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. J Neurosci 20:3663-3675.

Marques MJ, Ferreti R, Vomero VU, Minatel E, Santo Neto H. 2006a. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. Submitted.

Marques MJ, Mendes ZTR, Minatel E, Santo Neto H. 2006b. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers. J Neurocytol, in press.

Marques MJ, Pertille A, Carvalho CLT, Santo Neto H. 2006c. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction: remodeling due to muscle regeneration. Neuromuscul Disord. Submitted.

Marques MJ, Santo Neto H. 1998. Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. J Anat 192:425-430.

McMahan U.J. 1990. The agrin hypothesis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 55:407-418.

Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ. 2001. Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers. Muscle Nerve 24:410-416.

Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ. 2003. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. Muscle Nerve 28:561-569.

Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, Sanes J. 2005. Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. Proc Natl Acad Sci USA 102:11088-11093.

Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, Nakase H, Sugita H. 1983. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). Acta Neuropathol 60:167-174.

Rich M, Lichtman JW. 1989a. In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. J Neurosci 9:1781-1805.

Rich M, Lichtman JW. 1989b. Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers. Neuron 3:677-688.

Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ. 1978. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. J Cell Biol 78:176-198.

Santo Neto H., Martins AJ, Minatel E, Marques MJ. 2003. Axonal sprouting in mdx mice and its relevance to cell and gene mediated therapies for Duchenne muscular dystrophy. Neurosci Lett 343:67-69.

Santo Neto H, Pertille A, Teodori RM, Somazz MC, Marques MJ. 2004. Primary nerve repair by muscle autographs prepared with local anesthetic. Microsurgery 24:188-193.

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science 244:1578-1580.

Smirnov SP, Barzaghi P, Mckee KK, Ruegg MA, Yurchenco PD. 2005. Conjugation of LG domains of agrins and perlecan to polymerizing laminin-2 promotes acetylcholine receptor clustering. J Biol Chem 280:41449-41457.

Steinbach JH. 1981. Developmental changes in acetylcholine receptor aggregates at rat skeletal neuromuscular junctions. Dev Biol 84:267-276.

Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. 1986. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. Acta Neuropathol 69:91-95.

Torres LF, Duchen LW. 1987. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. Brain 110:269-299.

Zink W, Graf BM. 2004. Local anesthetic myotoxicity. Reg Anesth Pain Med 29:333-340.

#### FIGURE LEGENDS

Figure 4. Labeling of nerve terminals with 4-Di-2-ASP (A) and of acetylcholine receptors with rhodamine- $\alpha$ -bungarotoxin (B) in C57Bl/10 mice (*mdx* control, 6 months old). In this muscle, nerve terminals and receptors were labeled at the same time to allow the observation of nerve terminal branches in direct apposition to the acetylcholine receptor branches. The nerve terminal is easily seen with this technique. Note muscle striations and nuclei (arrows). Scale bar, 25  $\mu$ m.

Figure 5. Cross-section of innervated-regenerated sternomastoid muscle. Regenerated muscle fibers with central nuclei (arrow). HE. Scale bar, 50 µm.

Figure 6. Pattern of acetylcholine receptor distribution in innervated mdx muscle fibers. In A, perforated plaque seen in young mice (1 month old). Branches are seen in B in young and adult (6 months old) animals. C, Islands present in young and adult mdx mice. Scale bar: 11 µm in A, 17 µm in B, and 36 µm in C.

Figure 7. Pattern of acetylcholine receptor distribution in denervated-regenerated mdx muscle fibers. In A, branch-like pattern of young mice (1 month old). Note the presence of continuous branches that were longer than wider (arrow) on most of the endplate surface. The island type (arrow) is seen in D, in adult mice (6 months old). Note the bright spots of receptors that lack the central dark area and bright outline (compare with Figure 6C). Scale bar: 10  $\mu$ m in A, 6  $\mu$ m in B, 19  $\mu$ m in C, and 16  $\mu$ m in D.

# TABLES

Table 1. Weight (mg) of innervated (control) and denervated sternomastoid muscle from young (1 month old) and adult (6 months old) mdx mice.

	Control	Denervated
Young	14,6±4,7 (n=11)	7,42±3,2* (n=5)
Adult	21,5±5,7 (n=11)	13,2±3,0* (n=5)

Values represent the mean  $\pm$  SD. The total number of muscles analyzed is given in parentheses. \*Significantly different from control (*P* < 0.05, Student *t*-test).

Table 2. Length and width of acetylcholine receptor branches and islands in innervated-regenerated (branch young and island young/adult) and denervated-regenerated (branch-like junctions of young (1 month old) and adult (6 months old) *mdx* mice.

	Branch (n=60)	Isla (n=	and :60)	Branch-like (n=60)	Island-like (n=60)
	young	young	adult	young	adult
Length	18,6±8,6	4,7±1,3	4,8±1,2	11,8±7,5*	6±3,8**
Width	4,6±1,1	4,3±0,9	4,5±1,0	3,8±2,1	4,6±2,5

Values represent the mean  $\pm$  SD.

\*Significantly different from branch-young (innervated), island and island-like (P < 0.05, Student *t*-test). \*\*Significantly different from branch-young (innervated), and branch-like (denervated-regenerated) (P < 0.05, Student *t*-test).

Table 3. Percentage of the pattern of acetylcholine receptor distribution in control (right STN), innervated-regenerated and denervated-regenerated muscles from young (1 month old) and adult (6 months old) mdx mice.

	Control		Innervated/regenerated		Denervated/regenerated	
	young	adult	young	adult	young	adult
Plaque	2,2	-	1,5	-	10,3*	-
Branch	22,6	-	24,2	-	10,3*	-
Island	75,2	100	74,3	100	-	-
Branch-like	-	-	-	-	79,4	-
Island-like	-	-	-	-	-	100
Total nmjs	137	114	100	95	90	100

\* Significantly different from control and innervated-regenerated (P < 0.05,  $X^2$  test).