

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ELAINE CRISTINA LEITE PEREIRA

**O ÓXIDO NÍTRICO NA PLASTICIDADE DAS
CÉLULAS DE SCHWANN TERMINAIS E DOS
TERMINAIS NERVOSOS DA JUNÇÃO
NEUROMUSCULAR**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Marques

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

P414o **Pereira, Elaine Cristina Leite**
O óxido nítrico na plasticidade das células de Schwann terminais e dos terminais nervosos da junção neuromuscular / Elaine Cristina Leite Pereira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Maria Júlia Marques
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Célula de Schwann. 2. Junção neuromuscular. 3. Óxido nítrico.
4. Terminal nervoso. I. Marques, Maria Júlia.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 03 de Fevereiro de 2005

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Júlia Marques (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Assinatura

Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Jair de Campos Soares

Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Assinatura

Para minha mãe que bravamente possibilitou minha formação

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Maria Júlia Marques pela valiosa orientação, confiança, respeito e incentivo durante toda a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto, pelo respeito, incentivo e pelas sugestões dadas durante a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Elaine Minatel, pela colaboração na execução dos experimentos e pela inestimável amizade construída ao longo desses anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pelo empréstimo de L-arginina triciada ($[^3\text{H}]$ L-arginina) para realização de experimentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes que gentilmente cedeu as instalações do laboratório de farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM/UNICAMP) para realização de parte deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Simone A. Teixeira pela colaboração na realização dos experimentos farmacológicos deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Evanisi Teresa Palomari e à Prof^a Dr^a Shirlei Maria Recco Pimentel, pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, à Prof^a Dr^a Selma Maria Michelin Matheus e à Prof^a Dr^a Tania de Fátima Salvini pelas correções e sugestões na pré-banca, permitindo a lapidação deste trabalho.

Aos Srs. Marco Aurélio Ribeiro de Paula e Norivaldo Celestino, pela disposição em auxiliar os procedimentos experimentais.

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

Às Sras. Lilian Alves Senne Panagio, Lourdes Pinheiro e Ana Floriano Rodrigues, pela atenção que dispensaram durante a execução da tese.

À todos os colegas e funcionários do departamento de Anatomia que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado, viabilizando sua execução.

À CAPES, FAEP-UNICAMP E FAPESP pela financiamento do projeto, o que tornou possível o início e finalização deste trabalho.

“A maior felicidade do Homem como ser pensante, é saber explorar o que se pode conhecer e reverenciar em silêncio o que não se pode conhecer”

GOETHE, Máximas e Reflexões

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Apresentação.....	15
1.2. Objetivos.....	18
1.3. Patofisiologia da Distrofia Muscular de Duchenne.....	19
1.3.1. Abordagens Terapêuticas.....	21
1.4. Morfologia da junção neuromuscular.....	22
1.4.1. Compartimento pré-sináptico e estruturas associadas.....	23
1.4.2. Brotamentos axonais.....	24
1.4.3. Células de Schwann terminais.....	27
1.4.4. Compartimento pós-sináptico.....	28
1.4.5. Compartimento extracelular.....	30
1.5. Óxido Nítrico.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1. Animais.....	34
2.2. Grupos Experimentais.....	34
2.2.1. Avaliação da atividade da NOS.....	34
2.2.2. Inibição da produção da nNOS.....	37
2.2.3. Esmagamento do nervo do músculo esternomastóide.....	37
2.3. Marcação dos Terminais Nervosos e dos Receptores de Acetilcolina.....	40
2.4. Marcação das células de Schwann terminais e dos Receptores de Acetilcolina.....	41
3. RESULTADOS.....	42
3.1. Avaliação Farmacológica.....	43
3.2. Terminais Nervosos.....	45
3.2.1. Camundongos Não Tratados com L-NAME.....	45
Controles.....	45
Esmagamento.....	45
3.2.2. Camundongos Tratados com L-NAME.....	50
Controles.....	50
Esmagamento.....	50
3.3. Células de Schwann Terminais.....	53
3.3.1. Camundongos não tratados com L-NAME.....	53
Controles.....	53
Esmagados.....	53
3.3.2. Camundongos tratados com L-NAME.....	54
Controles.....	54
Esmagados.....	54

	9
Análise estatística.....	59
4.DISSCUSSÃO.....	61
4.1. Terminal Nervoso.....	62
4.2. Células de Schwann Terminais.....	67
4.3.Considerações Finais.....	69
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA MUSCLE & NERVE.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

NO – Óxido nítrico

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

DMD – Distrofia muscular de Duchenne

MDX – Distrofia muscular ligada ao cromossomo X

SC – Célula de Schwann terminal

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

DAG - Glicoproteína associada à distrofina

DAP – Proteína associada à distrofina

GRMD – Distrofia muscular do Golden retriever

FXMD – Distrofia muscular felina ligada ao cromossomo X

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CNTF – Fator neurotrófico ciliar

GAP-43 – Proteína associada ao crescimento

NCAM – Molécula de adesão celular neuronal

IGF – Fator de crescimento similar à insulina

AChRs – Receptores de acetilcolina

ARIA – Indutor de atividade de acetilcolina

MASC – Componente específico ligado aos miotúbulos

MuSK – Quinase específica dos músculos

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

L-NAME - L ω -nitro-L-arginina metil éster

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

EGTA – Ácido tetracético etileno glicol-bis[β -aminoetil éter] N,N,N',N'

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

PBS – Tampão fosfato

IgG - Imunoglobulina

FITC - Fluoresceína

RESUMO

Músculos distróficos apresentam alterações no complexo distrofina-glicoproteínas, bem como ausência da enzima óxido nítrico sintase neuronal, associada a alterações na estrutura da junção neuromuscular. No presente trabalho, estudamos as respostas dos terminais nervosos e das células de Schwann terminais após lesão nervosa, na ausência de óxido nítrico (NO). Nove dias após lesão nervosa por esmagamento, 24% das junções controle (n=200) apresentaram brotamentos ultraterminais. Na ausência de NO, o mesmo foi observado em 28.5% das junções (n=217; $p>0.05$ comparado aos controles; X^2). Quatorze dias após a lesão nervosa, todas as células de Schwann terminais observadas formaram uma rede de processos citoplasmáticos, que se estendiam para fora do sítio sináptico. Em ausência do NO, as células de Schwann terminais não apresentaram processos fora da região juncional. Estes resultados mostram que o NO está envolvido na resposta das células de Schwann terminais à lesão nervosa. Isto sugere que a sinalização molecular entre os componentes pré-sinápticos da junção neuromuscular pode estar prejudicada nos músculos distróficos, o que poderia influenciar a inervação e sobrevivência das novas fibras musculares obtidas por terapias celulares.

Palavras-Chave: distrofia, L-NAME, brotamento nervoso, junção neuromuscular, óxido nítrico, célula de Schwann terminal

ABSTRACT

Dystrophic muscles show alterations in the dystrophin-glycoprotein complex and a lack of neuronal nitric oxide (NO) synthase, associated with structural changes in neuromuscular junction. In this study, we examined the nerve terminal and Schwann cell responses after a crush lesion in NO-deficient mice. Nine days after nerve crush, 24% of the control junctions (n=200) showed ultraterminal sprouts. In the absence of NO, this frequency was 28.5% (n=217; $p>0.05$ compared to the controls; X^2 test). Fourteen days after nerve lesion, all of the Schwann cells showed an extensive network of processes away from the synaptic site, whereas in the absence of NO, Schwann cells processes failed to extend away from the endplate. These results show that NO is involved in the Schwann cell response to nerve injury. They also suggest that presynaptic molecular signaling may be impaired in dystrophic muscles, and that this could influence the innervation and survival of newly formed myofibers generated by cell-mediated therapies.

Key words: dystrophy, L-NAME, nerve terminal sprouting, neuromuscular junction, nitric oxide, terminal Schwann cell.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Apresentação

As distrofias musculares compreendem um grupo heterogêneo de patologias geneticamente determinadas, caracterizadas por alterações degenerativas progressivas das fibras musculares, cuja principal manifestação é a fraqueza muscular progressiva (SCHMALBRUCH, 1982). A disfunção genética mais comum encontrada em crianças é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X (locus Xp21), que acomete uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas (BIGGAR et al., 2002). A doença afeta primariamente músculos esqueléticos e cardíacos e os primeiros sinais da doença aparecem em torno de 2 a 3 anos de idade, evoluindo com perda progressiva da musculatura, aumento do tecido conjuntivo fibroso intersticial e substituição das fibras musculares por tecido adiposo (SEIXAS et al., 1997). A maioria das crianças perde a capacidade de deambular no início da segunda década de vida, culminando com a insuficiência cárdio-respiratória entre 20 e 30 anos (BIGGAR et al., 2002).

Embora tenham se passado 150 anos desde a descoberta da doença, ela permanece incurável. Entretanto, os avanços da medicina e das técnicas de reabilitação, fornecem suporte para os problemas secundários, como fraqueza muscular e insuficiência respiratória, melhorando a qualidade de vida e prolongando a sobrevida destes pacientes (BOGDANOVICH et al., 2004).

A falta da distrofina ainda é considerada como o principal fator responsável pela patofisiologia da doença. Entretanto, estudos indicam que outras moléculas também

ausentes nos músculos distróficos podem estar envolvidos na patogênese da DMD. O óxido nítrico (NO), molécula mensageira gasosa que desempenha amplo papel na regulação dos sistemas biológicos (para revisão veja BREDT & SNYDER, 1994; GODFREY & SCHWARTE, 2003), é um candidato em potencial (SNYDER, 1995; BRENMAN et al., 1995). Essa hipótese é baseada no fato da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), enzima responsável pela produção do NO nos músculos, estar diminuída no sarcolema de pacientes com DMD e em camundongos da linhagem *mdx* (CHANG et al., 1996, GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram a presença da nNOS no compartimento pré-sináptico da junção neuromuscular de camundongos normais, sendo sugerido que a nNOS estaria localizada nas células de Schwann terminais (SCs) da junção neuromuscular. Foi observado também que a expressão da nNOS na junção neuromuscular distrófica estava diminuída, tal como observado no sarcolema extrajuncional (PEREIRA et al., 2001). O acúmulo da nNOS nos sítios sinápticos dos músculos esqueléticos sugere funções do NO na sinalização neuromuscular (GODFREY & SCHWARTE, 2003). Ainda há poucas informações na literatura sobre os mecanismos que regulam a atividade desta enzima na junção neuromuscular e sobre sua função. Diversos autores sugerem uma seqüência de eventos análoga ao do sistema nervoso central para produção do NO na junção neuromuscular, onde o NO poderia servir como um mensageiro retrógrado, provavelmente com ação mediada pelo GMPc, podendo estar envolvido na eliminação da poliinervação muscular que ocorre durante o desenvolvimento (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN,

1999; GODFREY & SCHWARTE, 2003).

As células de Schwann terminais têm recebido atenção especial no que diz respeito ao seu papel na função sináptica, na regeneração e remodelação das junções neuromusculares. Essas funções das SCs parecem estar envolvidas com suas interações recíprocas com os terminais nervosos (KOIRALA et al., 2000; KOIRALA et al., 2003). Estudos sugerem que substâncias gasosas liberadas pelas SCs possam induzir o brotamento dos terminais motores em resposta à lesão, visando a reinervação dos sítios sinápticos (SON et al., 1996; ENGLISH, 2003; TAM & GORDON, 2003a).

A presença de ciclos de degeneração-regeneração em pacientes com DMD e camundongos *mdx* implica na necessidade de remodelação contínua dos terminais nervosos para reinervação muscular (VERZÈ et al., 1996). Neste sentido, a ausência do NO pode interferir neste processo de remodelação neural, contribuindo para a evolução da doença, pela diminuição da possibilidade de inervação e sobrevivência das fibras musculares regeneradas. Por outro lado, alterações nos brotamentos dos componentes juncionais podem comprometer a formação das junções neuromusculares em fibras musculares geradas a partir de terapias celulares, como o transplante de mioblastos, sendo um fator que reforça a importância do conhecimento das funções do óxido nítrico na região pré-sináptica.

1.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi verificar se o óxido nítrico interfere nas respostas do terminal nervoso e das células de Schwann terminais após lesão nervosa.

Para tanto, estudamos o número de junções neuromusculares que apresentavam brotamentos e o padrão de distribuição das células de Schwann terminais em ausência do óxido nítrico após lesão nervosa.

1.3. Patofisiologia da Distrofia Muscular de Duchenne

O fator primário responsável pela patogênese da DMD parece ser a falta da distrofina, uma proteína estrutural da membrana sarcoplasmática (TINSLEY et al., 1994) localizada na face citoplasmática do sarcolema de músculos normais. A distrofina está associada a um complexo de glicoproteínas chamado de glicoproteínas associadas à distrofina (Dystrophin associated glycoproteins; DAGs) ou simplesmente proteínas associadas à distrofina (Dystrophin associated proteins; DAPs) (GILLIS, 1999). Ainda não são conhecidas todas as funções da distrofina (DUBOWITZ, 2000). Originalmente sugeriu-se que a ausência da distrofina observada na DMD, leva a instabilidade da membrana (MENKE & JOCKUSH, 1991), facilitando a entrada de íons cálcio para a fibra muscular (TURNER et al., 1991). O excesso de cálcio causa hipercontração e ativação de proteases endógenas e fosfolipases, levando a necrose da fibra muscular (CARPENTER & KARPATI, 1979; WELLER et al., 1990; STEDMAN et al., 1991; DICK & VRBOVA, 1993; MARIOL & SÉGALAT, 2001).

Apesar de evidências sugerirem a participação de outras moléculas, como a nNOS na patofisiologia da DMD, camundongos mutantes sem distrofina e nNOS apresentam alterações patológicas similares à causada exclusivamente pela mutação do gene da distrofina. Adicionalmente, defeitos apenas no gene que produz a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em camundongos, não produz a distrofia muscular, sugerindo que para expressão das características da distrofia muscular, é necessário uma associação de fatores (CHAO et al., 1998). A nNOS pode ter outros efeitos biológicos nos músculos, não

relacionados com a patogênese, tal como produção do NO para ação antiinflamatória, pois camundongos *mdx* transgênicos que expressam nNOS apresentam redução do processo inflamatório e das características histopatológicas de lesão muscular (WEHLING et al., 2001).

A descoberta do gene responsável pela codificação da distrofina, ou seja, o gene da DMD (HOFFMAN, et al., 1987; KOENIG et al., 1987), foi seguida pela caracterização de distrofias musculares geneticamente homólogas à humana em modelos experimentais, tais como o camundongo *mdx* (X-linked muscular dystrophy; BULFIELD, 1984), cães da raça Golden Retriever (GRMD - golden retriever muscular dystrophy; COOPER et al., 1988) e gatos com distrofia muscular (FXMD – feline X-linked muscular dystrophy; CARPENTER et al., 1989). Estes modelos experimentais, em especial os camundongos da linhagem *mdx*, por apresentarem distrofia mais branda e pelos menores custos para sua manutenção, contribuem para o entendimento da patofisiologia da doença humana e para o desenvolvimento de terapias experimentais (HOFFMAN & DRESSMAN, 2001).

1.3.1. Abordagens Terapêuticas

As estratégias terapêuticas para DMD podem ser classificadas em três grupos: (1) terapias genéticas; (2) terapias celulares, que incluem o transplante de mioblastos e células-tronco; e (3) terapias farmacológicas. As terapias genéticas e celulares parecem ser mais vantajosas, pois podem vir a corrigir os problemas primários e secundários associados à falta da distrofina nas fases iniciais da doença (BOGDANOVICH et al., 2004).

Dentre as terapias genéticas, a administração de antisense oligonucleotídeo vêm conseguindo causar mutações no gene da distrofina, restaurando a expressão da proteína em muitos músculos de camundongos *mdx*, apresentando-se como um tratamento em potencial, pois repõe a distrofina no sarcolema distrófico (LU et al., 2005).

As terapias celulares vêm enfrentado diversas dificuldades biológicas e técnicas. Dentre elas, destacam-se a pouca dispersão das células injetadas, a rejeição imunológica (FLETCHER et al., 2000) e a deficiência de expressão de distrofina nas fibras musculares que receberam o implante de mioblastos (MUELLER et al., 2002).

A remodelação neural é necessária para prover inervação das fibras musculares no processo de degeneração-regeneração dos músculos distróficos (VÈRZE et al., 1996). Assim, é possível que havendo uma reduzida inervação das fibras musculares transplantadas, o sucesso desta terapêutica seja comprometido (VÈRZE et al., 1996; SANTO NETO et al., 2003). Uma inervação eficiente depende da capacidade dos terminais nervosos intactos brotarem e serem guiados pelas SCs até a região juncional das fibras musculares (KOIRALA et al., 2003; ENGLISH, 2003).

1.4. Morfologia da junção neuromuscular

A junção neuromuscular dos vertebrados vem sendo há várias décadas um modelo para estudo da estrutura, função, desenvolvimento e plasticidade das sinapses devido a sua morfologia simples e de fácil acessibilidade (SALPETER, 1987; KOIRALA et al., 2003).

A manutenção, funcionamento e regeneração funcional dos músculos esqueléticos dependem da integridade desta sinapse química, aumentando a importância do conhecimento da organização estrutural, arquitetura molecular e funções da junção neuromuscular (SANES & LICHTMAN, 1999; KOIRALA et al., 2003).

A junção neuromuscular dos vertebrados é composta por três compartimentos celulares intimamente justapostos (Fig. 1): compartimento pré-sináptico; compartimento pós-sináptico; e compartimento extracelular, situado entre os compartimentos pré e pós-sinápticos (HALL E SANES, 1993).

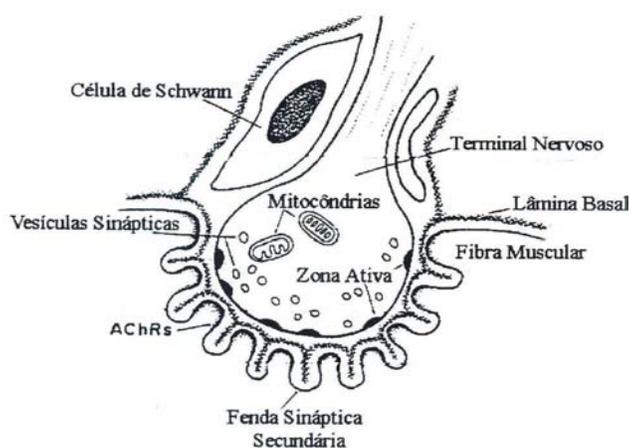


Figura 1. Esquema da junção neuromuscular. Na figura são mostrados os elementos dos três compartimentos sinápticos. A célula de Schwann e terminal nervoso representam o compartimento pré-sináptico, o sarcolema da fibra muscular com as fendas sinápticas secundárias, o pós-sináptico e a lâmina basal entre pré e pós-sináptico, representa o compartimento extracelular Adaptado de Pereira et al., *J. Anatomy*, 198, p.663-671, 2001.

1.4.1. Compartimento pré-sináptico e estruturas associadas

As fibras musculares esqueléticas são inervadas por motoneurônios cujos corpos celulares estão na coluna anterior da medula espinal e nos núcleos dos nervos cranianos no tronco encefálico. Após a formação dos plexos nervosos, os axônios se dirigem aos músculos alvo, penetrando pelo hilo neurovascular. A seguir, dividem-se em numerosos feixes intramusculares. Após caminharem entre as fibras musculares os axônios motores abandonam o feixe intramuscular passando a se chamar axônios pré-terminais. Próximo ao contato com a fibra muscular os axônios perdem a bainha de mielina e se ramificam em finas arborizações com as terminações levemente dilatadas, chamadas botões terminais ou terminais nervosos (BOWDEN & DUCHEN, 1976; Para revisão veja RUFF, 2003). Os terminais nervosos são recobertos por três a cinco células gliais (KOIRALA et al., 2003) e se acomodam em depressões na superfície das fibras musculares denominadas fendas sinápticas primárias (RUFF, 2003).

A estrutura do terminal nervoso reflete sua função de estocagem e liberação de neurotransmissor, pois é preenchido por 300.000 ou mais vesículas sinápticas. Estas vesículas medem em torno de 50 nm e cada vesícula contém cerca de 1000 a 50.000 moléculas do neurotransmissor acetilcolina (WEINER & TAYLOR, 1985). Muitas vesículas estão alinhadas próximas de placas densas na superfície interna da membrana pré-sináptica do terminal nervoso, chamadas zonas ativas. As zonas ativas são os locais onde as vesículas se fundem com a membrana do terminal nervoso para liberação do neurotransmissor (RUFF, 2003). As membranas das vesículas são reabsorvidas pela

superfície pré-sináptica para formação de novas vesículas (HEUSER & REESE, 1981). Durante este processo de endocitose, é possível observar formas intermediárias das vesículas, chamadas vesículas revestidas (HEUSER & REESE, 1981). No terminal nervoso também são encontradas, porém em menor número, vesículas elétron-densas que contém neuropeptídeos, tal como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MATTEOLI et al., 1990). O terminal nervoso também possui numerosas mitocôndrias para suprir a energia necessária para síntese, estocagem e liberação de neurotransmissores (HALL & SANES, 1993).

Em contraste com o terminal nervoso, o axônio pré-terminal não apresenta zonas ativas, contém poucas vesículas e mitocôndrias, sendo preenchido por filamentos do citoesqueleto (HALL & SANES, 1993). No entanto, possui função de transporte das moléculas sinalizadoras produzidas pelo corpo celular dos motoneurônios até o terminal nervoso, onde serão estocadas e liberadas (Para revisão veja SLATER, 2003).

1.4.2. Brotamentos axonais

Os neurônios do Sistema Nervoso Periférico são capazes de se regenerar após lesão visando a reinervação do órgão alvo (SULAIMAN et al., 2004).

Brotamentos são expansões dos axônios intramusculares e dos terminais nervosos em resposta à diferentes estímulos lesivos, formando novas terminações nervosas para reinervação das fibras musculares (PURVES & LICHTMAN, 1985; TAM & GORDON, 2003a). Assim, finos prolongamentos crescem a partir do axônio ou terminal nervoso

intacto na ausência de transmissão sináptica na junção neuromuscular (TAM & GORDON, 2003a). Os brotamentos somente são possíveis quando restam pelo menos 20 % das unidades motoras funcionais após uma lesão (RAFUSE & GORDON, 1996).

Os brotamentos axonais tem função regenerativa compensatória, onde os neurônios sobreviventes à lesão ou trauma aumentam o tamanho de suas unidades motoras para reinervar as fibras musculares desnervadas (TAM & GORDON, 2003a).

Freqüentemente são usados modelos para provocar os brotamentos axonais. As formas mais usadas de indução de brotamentos são a desnervação parcial (HOFFMAN, 1950; BROWN & HOLLAND, 1979; LOVE et al., 2003; TAM & GORDON, 2003b) e a paralisia muscular (BROWN & IRONTON, 1977; HOLLAND & BROWN, 1980; PAMPHELETT, 1989), porém a lesão muscular também pode induzir brotamentos axonais (WERNIG et al., 1991).

A desnervação parcial pode ser conseguida pela secção parcial de troncos nervosos dos nervos espinais (HOFFMAN, 1950; BROWN & IRONTON, 1977; TAM et al., 2001; TAM & GORDON, 2003b) ou pelo esmagamento ou secção do nervo à aproximadamente 2 mm antes de seu ponto de entrada no músculo (RICH & LICHTMAN, 1989; SON & THOMPSON, 1995a,b; REYNOLDS & WOOLF, 1992; LOVE et al., 2003).

Os brotamentos axonais induzidos por paralisia muscular podem ocorrer por bloqueio pré-sináptico da neurotransmissão com toxina botulínica (PAMPHELETT, 1989), por bloqueio da transmissão neural por tetrodoxina (BROWN & HOLLAND, 1979) e pelo bloqueio pós-sináptico com α -bungarotoxina (HOLLAND & BROWN, 1980).

De acordo com a literatura, são considerados brotamentos axonais, as finas ramificações que emergem da arborização terminal, com ou sem um cone de crescimento e que se projetam para fora da área dos receptores de acetilcolina (THOMAS et al., 2000). O cone de crescimento é uma estrutura que se forma na extremidade do axônio em crescimento, sendo especializado na condução deste axônio até seu alvo. O direcionamento ocorre através de movimentos de filopódios, os quais contém actina e microtúbulos, e do reconhecimento de fatores neurotróficos e de componentes da matriz extracelular (MING et al., 2001; DICKSON, 2002).

Os brotamentos axonais podem ser classificados de acordo com o local de origem em quatro tipos: 1) Brotamento nodal, quando emerge de um nó de Ranvier; 2) Brotamento pré-terminal ou extraterminal, quando emerge distalmente ao último nó de Ranvier; 3) Brotamento intraterminal, quando emerge diretamente do terminal motor entre os segmentos da arborização terminal ou no segmento final livre e 4) Brotamento ultraterminal quando emerge de qualquer local do terminal nervoso, mas se projeta para fora do sítio sináptico inervado originalmente (HOFFMAN, 1950; THOMAS et al., 2000). Brotamentos do tipo ultraterminal e pré-terminal são geralmente referidos apenas como brotamentos terminais. Um único axônio pode originar mais de um tipo de brotamento ou ainda numerosos brotamentos do mesmo tipo (TAM & GORDON, 2003a).

Várias moléculas parecem ser importantes na regulação do processo de brotamento axonal, tais como o fator neurotrófico ciliar (CNTF; SIEGEL et al., 2000), a molécula de adesão celular neuronal (N-CAM; WALSH et al., 2000), o peptídeo relacionado ao gene da

calcitonina (CGRP; TARABAL et al, 1996), a proteína associada ao crescimento (GAP-43; VERZÈ et al., 1996) e neurotrofinas como o fator de crescimento glial (GGF2; TRACHEMBERG & THOMPSON, 1996, 1997).

1.4.3. Células de Schwann terminais

Os estudos das junções neuromusculares dos vertebrados no início do século XIX já identificavam grupos de núcleos celulares sobre os terminais nervosos diferentes dos núcleos das fibras musculares (Para revisão veja KOIRALA et al., 2003). A proximidade das células de Schwann terminais (SCs) ou células de Schwann perisinápticas (PSC) com a sinapse induziu numerosas hipóteses sobre o papel dessas células na formação, maturação, manutenção e função da sinapse (Para revisão veja AULD & ROBITAILLE, 2003; KOIRALA et al., 2003).

A relação anatômica entre as SCs e os elementos pré e pós-sinápticos fornecem proteção ao terminal nervoso contra lesões químicas e mecânicas (HALL & SANES, 1993). Algumas características sugerem que elas desempenhem outras funções na junção neuromuscular, pois participam da remodelação axonal (REYNOLDS & WOOLF, 1992), exibem transporte de cálcio em resposta a despolarizações no axônio, evidenciando que são sensíveis a sinais elétricos (JAHRONI et al., 1992; REIST & SMITH, 1992). E também adquirem a habilidade de sintetizar e secretar acetilcolina após desnervação e são capazes de transmitir sinais elétricos ao músculo (BIRKS et al., 1960; BROCKES et al., 1984; Para revisão veja AULD & ROBITAILLE, 2003). Durante o desenvolvimento normal, quando

ainda não houve a inervação e, em todos os casos em que ocorre perda da inervação por lesão neural ou muscular, as células de Schwann terminais proliferam e estendem seus processos citoplasmáticos desempenhando papel de guia dos brotamentos axonais (SON & THOMPSON, 1995a,b; TRACHTENBERG & THOMPSON, 1997; REYNOLDS & WOOLF, 1992; SON et al., 1996). Além disso, após desnervação da fibra muscular, as SCs aumentam a expressão de proteínas que funcionam como fatores de adesão e de crescimento axonal (SANES & LICHTMAN, 1999; LOVE et al., 2003; AULD & ROBITAILLE, 2003).

1.4.4. Compartimento pós-sináptico

O compartimento pós-sináptico é composto pelo sarcolema imediatamente justaposto do terminal nervoso. O sarcolema pós-sináptico é pregueado, contendo dobras juncionais. As dobras juncionais têm cerca de 1 μm de profundidade e o espaço contido dentro das dobras é chamado de fenda sináptica secundária. Logo abaixo da membrana pós-sináptica há um aglomerado de núcleos subsinápticos que são morfologicamente diferentes dos não sinápticos, pois são maiores e seus genes transcrevem proteínas encontradas apenas na membrana sarcoplasmática sináptica (HALL & SANES, 1993).

As aberturas das dobras juncionais estão em direta aposição com as zonas ativas. Na dobra juncional existem duas regiões distintas: o ápice, onde os receptores de acetilcolina (AChRs) estão agrupados em uma densidade de aproximadamente $10^4/\mu\text{m}^2$ e o fundo das dobras, onde estão os canais de sódio responsáveis pela geração do potencial de

ação (RUFF, 2003). Os AChRs são pentâmeros dispostos em torno de canais iônicos que se abrem quando a acetilcolina liga-se a eles, sendo responsáveis pela recepção e transdução de sinais químicos (HALL & SANES, 1993).

Os AChRs e canais de sódio são ancorados por proteínas do citoesqueleto que podem ter funções regulatórias e de suporte, como a F-actina que está ligada à distrofina. No topo das dobras juncionais também existem proteínas que servem de ligação entre o sarcolema e o citoesqueleto da fibra muscular, mantendo a estrutura das dobras juncionais. Entre estas está a distrofina e proteínas associadas, que se ligam ao complexo de proteínas transmembrânicas e unem o citoesqueleto abaixo do sarcolema à membrana basal (RUFF, 2003).

Há vários complexos de proteínas ligados ao citoesqueleto da junção neuromuscular que parecem estar envolvidos no seu desenvolvimento e organização estrutural. Muitas dessas proteínas estão localizadas no sarcolema pós-sináptico. Dentre elas estão os canais de sódio voltagem sensíveis, integrinas, utrofina, desmina, espectrina, actina, a molécula de adesão celular neuronal (NCAM), a qual é exclusivamente encontrada na junção neuromuscular adulta, exceto quando ela se encontra em processo de regeneração (HALL & SANES, 1993). Além destas, o indutor de atividade de acetilcolina (ARIA), que é um fator neuronal envolvido no acúmulo específico de AChRs na junção, também é encontrado no compartimento pós-sináptico (GRINNEL, 1995).

1.4.5. Compartimento extracelular

O espaço estreito de cerca de 70 nm compreendido entre o terminal nervoso e o sarcolema pós-sináptico é chamado fenda sináptica primária. A membrana basal está contida nesta fenda, estendendo-se para dentro das dobras juncionais nas fendas sinápticas secundárias. Ao microscópio eletrônico, a membrana basal aparece como uma estrutura fina e difusa com 10 a 15 μm de espessura. A fibra muscular e o terminal nervoso estão conectados por finos processos do citoesqueleto da membrana basal. A membrana basal é contínua com a membrana basal da fibra muscular e se funde com a membrana basal das SCs (HALL & SANES, 1993).

Embora a membrana basal sináptica seja indistinguível morfológicamente da extrasináptica, a sináptica é bioquimicamente especializada, pois sua matriz extracelular contém um complexo de proteínas que regulam a síntese e a concentração das proteínas pós-sinápticas, como a acetilcolinesterase que inativa o neurotransmissor acetilcolina. Outras proteínas destacam-se, tais como o colágeno III e IV, diversas formas de laminina que ligam α -dístroglicanas à membrana do terminal nervoso, mantendo a adesão do nervo ao músculo. A agrina, integrinas, componente específico ligado aos miotúbulos (MASC), quinase específica dos músculos (MuSK), rapsina, ARIA e heparan sulfato também fazem parte de complexos que ligam a lâmina basal ao sarcolema pós-sináptico. A rapsina, MuSK, MASC e agrina estão especificamente associados à formação e manutenção dos AChRs (HALL & SANES, 1993; RUFF, 2003).

1.5. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor gasoso que regula diversos aspectos da função muscular e provavelmente está envolvido em lesões e patologias dos músculos esqueléticos (STAMLER & MEISSNER, 2001). Ele reage rapidamente com oxigênio, ânions superóxidos e vários componentes celulares. Os efeitos do NO são diretos e ocorrem próximos ao seu local de produção devido à inexistência de estruturas especializadas em seu armazenamento (ARMELLE & STAMLER, 1995; JIA et al., 1996).

A biosíntese do NO é mediada pela família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS; EC 1.14.13.39). Essas enzimas formam NO no meio intracelular pela oxidação do grupo guanidina da L-arginina, num processo que consome cinco elétrons, resultando na formação de citrulina e NO em quantidades equivalentes, de forma Ca^{++} /calmodulina dependente (SCHUMAN & MADISON, 1994; KAMINSKI & ANDRADE, 2001). Como o NO é um gás, não podendo ser estocado ou inativado após sua liberação (BREDT & SNYDER, 1994), o indicador de atividade da NOS e da síntese de NO é a produção de citrulina.

Algumas moléculas análogas à L-arginina, tais como a L ω -Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME) e 7-Nitro indazol, inibem a síntese de NO, pois bloqueiam a ação catalítica da NOS (OLLERSTAM et al., 1997; KAMINSKI & ANDRADE, 2001). Vários estudos utilizam a inibição da produção do NO, devido à dificuldade de bloquear sua ação (OLLERSTAM et al., 1997; WEHLING et al., 2001).

Os músculos esqueléticos expressam três conhecidas isoformas de NOS, sendo a isoforma neuronal (nNOS) predominante (KAMINSKI & ANDRADE, 2001). A α 1-sintrofina, proteína associada à distrofina, liga a nNOS ao sarcolema através de interações do tipo PDZ (KRAMARCY & SEALOCK, 2000).

A nNOS está concentrada na superfície pós-sináptica de mamíferos, no fundo das fendas sinápticas secundárias (GODFREY & SCHWARTE, 2003), no sarcolema extrajuncional (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999) e no compartimento pré-sináptico nas células de Schwann terminais de rãs (DESCARRIES et al., 1998) e de camundongos (PEREIRA et al., 2001).

Dentre as funções que o NO pode desempenhar na junção neuromuscular, as evidências sugerem que ele atue na regulação e sinalização sináptica, sendo um candidato à sinalizador retrógrado da diferenciação, regeneração e manutenção do terminal nervoso (THOMAS & ROBITAILLE, 2001; GODFREY & SCHWARTE, 2003).

O NO pode também estar envolvido na regulação da liberação de neurotransmissores pré-sinápticos, pois a administração de doadores de NO à embriões e rãs adultas diminuiu a frequência de liberação espontânea de acetilcolina dos terminais nervosos (THOMAS & ROBITAILLE, 2001).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados 26 camundongos adultos de ambos os sexos com idade de 3 a 5 meses da linhagem C57BL/10-Uni. Os animais foram mantidos em Biotério próprio do Departamento de Anatomia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP-SP), e acomodados em caixas plásticas padrão, com condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) e livre acesso à ração e água.

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA- IB/Unicamp).

2.2. Grupos Experimentais

2.2.1. Avaliação da atividade da NOS

Para estudarmos o possível papel do óxido nítrico na indução dos brotamentos dos terminais nervosos, camundongos normais tiveram a produção do NO inibida pelo inibidor irreversível da nNOS, L ω -Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME, Sigma N5751).

Camundongos da linhagem C57BL/10 (n=3) foram tratados com L-NAME durante 20 dias para realização do teste farmacológico que avaliou o bloqueio da atividade da óxido nítrico sintase. Camundongos da mesma linhagem (n=3), sem nenhum tipo de tratamento serviram como controle.

Pilotos com diferentes dosagens de L-NAME foram realizados até chegar à concentração de 150 mg/kg/dia, a qual foi avaliada e considerada ideal para utilização neste trabalho. Definimos nosso protocolo de inibição pois as dosagens encontradas na literatura eram para outros modelos experimentais, como coelhos e ratos.

Para confirmação da inibição da produção de NO, quantificamos a produção de citrulina no tecido cerebral dos animais tratados. Estes experimentos foram realizados em parceria com o Departamento de Farmacologia da FCM/Unicamp. Para quantificar a inibição, os encéfalos de camundongos da linhagem C57BL/10 tratados e controles sem tratamento, foram retirados após sacrifício com Alotano e imediatamente homogeneizados e processados.

A determinação da atividade da NOS foi baseada na conversão da [³H]L-arginina para [³H]L-citrulina, a qual continha o isótopo radioativo que permitiu a determinação da sua produção. O método utilizado para medir a atividade da enzima no presente trabalho foi descrito originalmente por FÖRSTERMANN et al., 1990 e modificado por FARIA et al., 1996. Cada cérebro foi rapidamente retirado, pesado e homogeneizado em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) contendo 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoridro (PMSF) e 1 mM de L-citrulina. Cinquenta microlitros do homogenato foram incubados na presença de 1 mM de NADPH, 2 mM de CaCl₂ e 10 μM de L-arginina contendo 100.000 dpm de [2,3,4,5-³H]L-arginina mono hidrocloreto (Amersham) em um volume final de 100 μl a temperatura ambiente (25 - 27°C) durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF e L-

citrulina). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5.4 contendo 1mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5 min a 10.000 rpm) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0.6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em frascos de cintilação. As colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados aos anteriores. Após a adição de 10 ml de líquido de cintilação (tolueno / Triton X-100 / PPO / POPOP) a radioatividade foi medida durante 1 min em espectrômetro de cintilação.

Para cada amostra, foram realizados em paralelo controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do CaCl_2 e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS) e na adição de 1 mM de L-NAME (inibição específica para as NOS).

As contagens foram corrigidas por subtração do “branco” (o homogenato de tecido é adicionado após o tampão HEPES) e da contagem do tubo que continha L-NAME. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes tubos não são aplicados sobre as colunas com resina de troca iônica) pela fórmula:

$$\text{pmol L-citrulina/min} = 1000 \times \{(\text{cpm amostra} - \text{cpm branco}) - \text{cpm L-NAME}\} / \text{cpm totais} / 30$$

Onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (em min).

O conteúdo de proteínas total foi determinado pelo método de BRADFORD (1976)

(Kit Bio Rad) e a atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

2.2.2. Inibição da produção da nNOS

Os animais tratados foram divididos em dois grupos (para marcação do terminal nervoso e da célula de Schwann). Estes animais foram tratados com L-NAME por duas semanas antes do procedimento cirúrgico e continuaram a receber o inibidor durante o período pós-operatório.

Como o L-NAME é hidrossolúvel, o inibidor foi colocado na água do bebedouro dos camundongos. A água com o inibidor foi quantificada para os animais beberem por cinco dias, sendo reposta ao fim de cinco dias ou quando necessário.

Para chegarmos à quantidade de água ideal foram realizados pilotos com dez animais divididos em duas caixas. Durante duas semanas foi controlado o consumo hídrico diário de cada caixa, a qual era dividida pelo número de animais. A partir do consumo diário de água dos camundongos, calculávamos o peso em miligramas de L-NAME que correspondia à 150 mg/Kg/dia, de acordo com o peso médio dos animais da caixa. Em média, cada camundongo consumiu 5 ml de água/dia, à temperatura de 25 a 30°C.

2.2.3 Esmagamento do nervo do músculo esternomastóide

Camundongos da linhagem C57BL/10 tratados (n=10) e não tratados com L-NAME

(n=10) sofreram lesão por esmagamento do nervo do músculo esternomastóide (STN) esquerdo e os terminais nervosos e as células de Schwann terminais foram imunomarcados para análise do padrão morfológico. Os músculos STNs do lado direito serviram como controle.

A observação e contagem dos brotamentos dos terminais nervosos foi realizada nove (9) dias após a cirurgia, tempo em que ocorre o pico de brotamentos após uma única lesão por esmagamento (RICH & LICHTMAN, 1989).

A análise do padrão de distribuição das células de Schwann terminais foi realizada 14 dias após o esmagamento do músculo STN esquerdo, pois a complexa rede citoplasmática que cobre a superfície do terminal nervoso após a lesão por esmagamento foi observada originalmente por REYNOLDS & WOOLF, 1992 aproximadamente duas semanas pós-lesão.

Os animais foram tratados com L-NAME durante as duas semanas que antecederam o procedimento cirúrgico. Após a cirurgia, todos os camundongos receberam o analgésico dipirona sódica na água dos bebedouros (50 gotas/l) durante 24 horas e o tratamento com L-NAME quando aplicável continuou até o dia do sacrifício.

Para realizarmos o procedimento de esmagamento, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de cloridrato de cetamina (Francotar®; Virbac) e cloridrato de xylazina (Virbaxyl®; Virbac) na proporção de 1:1 e dose de 0.1 ml/26 g de peso corporal. A seguir, a pele da região ventral do pescoço foi aberta por uma incisão longitudinal na linha mediana, desde o ápice da mandíbula até a incisura esternal. A

glândula submandibular esquerda foi exposta e rebatida lateralmente para exposição do músculo esternomastóide deste lado (Fig 2), uma vez que o nervo do músculo esternomastóide penetra no músculo pela face dorsal na região média do músculo. Após localizar o nervo, realizamos a desnervação parcial aproximadamente 2 mm antes dele penetrar no músculo, esmagando-o uma única vez durante 60 segundos (RICH & LICHTMAN, 1989) utilizando pinça oftalmológica.

Após a lesão, a ferida foi suturada com linha cirúrgica 5.0 (Ethicon) e nove ou quatorze dias após o esmagamento, os músculos foram retirados e os terminais nervosos e células de Schwann terminais marcados seguindo os protocolos que seguem.

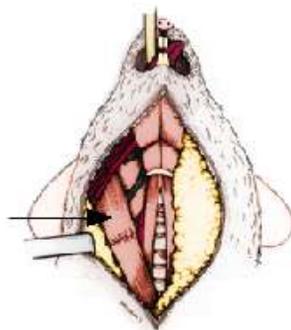


Figura 2. Vista da face ventral do pescoço de camundongo. Observa-se a glândula submandibular esquerda não rebatida e o músculo esternomastóide direito (seta) exposto.

2.3. Marcação dos Terminais Nervosos e dos Receptores de Acetilcolina

Os camundongos foram pesados e anestesiados com hidrato de cloral 10 % intra-peritonealmente na dose de 0.2 ml/20 g de peso corporal para perfusão via cardíaca com 20 ml de tampão fosfato (PBS, pH 7.5), seguida por 20 ml de fixador paraformaldeído 2%. Após fixação *in situ* com paraformaldeído 2 % por 15 minutos, os músculos foram lavados com PBS, retirados cuidadosamente e presos pelas extremidades proximal e distal com alfinetes entomológicos em cubas de incubação contendo Sylgard, em PBS. Os músculos foram incubados com glicina 0.1 M por 20 minutos em agitador orbital (Fanem 255-B) em temperatura ambiente, para inativação do fixador. A seguir, os músculos foram incubados com colagenase tipo I (1 mg/ml – Sigma C-0130) por 10 minutos em agitador, à temperatura ambiente, para que o tecido conjuntivo preso ao músculo se soltasse. Após serem lavados com PBS, os músculos eram incubados com α -bungarotoxina conjugada à rodamina (Rh-BTx – Molecular Probes T1175, 1:100 em PBS) por 30 minutos, à temperatura ambiente, no agitador, para marcação dos receptores de acetilcolina (AChRs). Após várias lavagens com PBS, os músculos eram incubados com Triton X-100 1 % (Sigma T9284) durante 1 hora em agitador, para permeabilização do tecido. A seguir, os músculos ficaram 24 horas em solução bloqueadora no agitador, com objetivo de bloquear ligações inespecíficas do anticorpo primário. Os músculos foram então incubados por 24 horas com anticorpo primário anti-neurofilamento (Anti-neurofilament 200, Sigma N-5389, 1:100 em solução bloqueadora), à 4°C. Após sucessivas lavadas com PBS (20 ml, 7-8 vezes durante 30 minutos), foi colocado o anticorpo secundário anti-mouse-IgG-FITC (Sigma F-

0257, 1µl:100µl em solução bloqueadora), durante 3 horas, no agitador, à temperatura ambiente. Os músculos foram então lavados com PBS e montados inteiros em lâmina e lamínula em meio especial de montagem para fluorescência (DABCO - Sigma) e observados utilizando um sistema confocal da Bio-Rad (MRC 1024UV), equipado com laser Argônio-Kriptônio (Ar-Kr) e Ultra-Violeta (UV), acoplado a um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 100 Zeiss).

2.4. Marcação das células de Schwann terminais e dos Receptores de Acetilcolina

Para realização desta marcação seguimos os mesmos procedimentos da marcação dos terminais nervosos, com anticorpos primário e secundário diferentes.

O anticorpo primário foi o anti-S100 (Sigma, S2644, 1:100 em solução bloqueadora) que se liga à proteína S100 encontrada no citoplasma das células de Schwann. O anticorpo secundário usado foi o anti-rabbit-IgG-FITC (Sigma, F0382, 1:100 em solução bloqueadora).

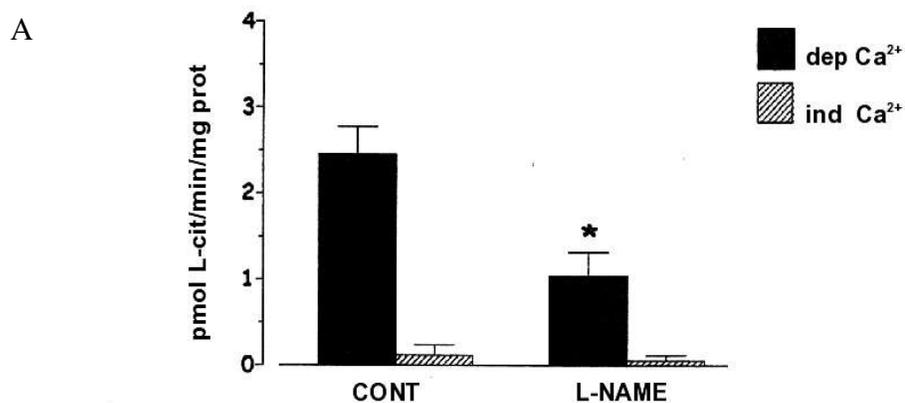
Controles dos anticorpos primários são rotineiramente realizados em nosso laboratório. Para testar a especificidade dos anticorpos primários anti-neurofilamento e anti-S100, foram seguidos os mesmos procedimentos de obtenção e processamento do material, exceto pelo fato de não terem sido incubados com anticorpo primário. O material foi mantido em solução bloqueadora nesta etapa. Não foram observadas estruturas marcadas, indicando que a marcação dos anticorpos é específica.

3. RESULTADOS

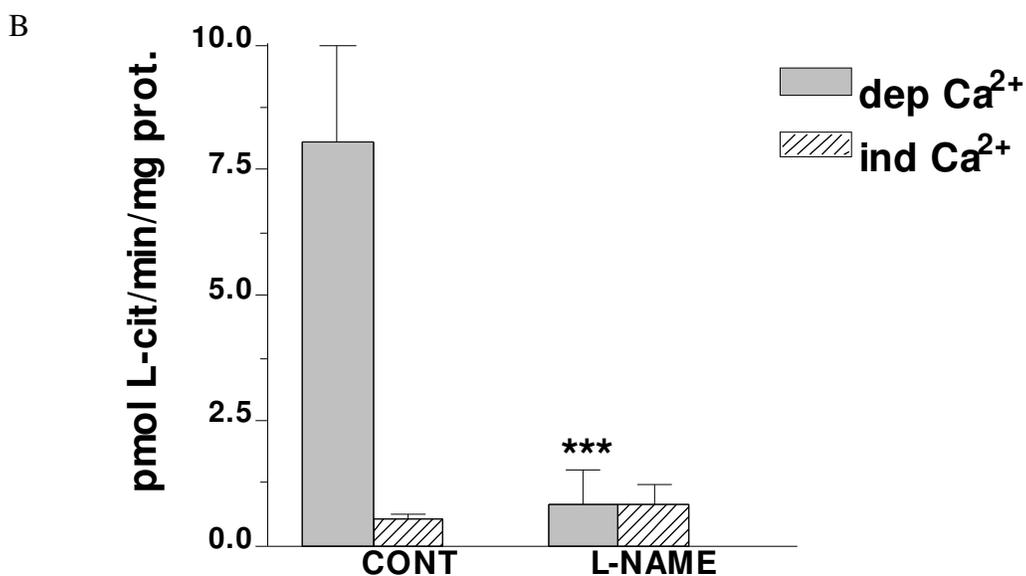
3.1. Avaliação Farmacológica

Nos primeiros grupos tratados com L-NAME, foi usada uma dose de 50mg/Kg/camundongo/dia. Essa dose se mostrou ineficiente na inibição total da produção de NO (Fig. 3A). Verificamos que apenas 50% da atividade dependente de Ca^{2+} foi inibida e por isso os grupos tratados com essa dosagem foram descartados e iniciamos testes com outras dosagens.

O tratamento com a dose de 150mg/Kg/dia promoveu inibição de 90% da atividade da NOS dependente de Ca^{2+} (Fig. 3B) quando comparada ao grupo controle ($8,08 \pm 1.89$ vs $0,83 \pm 0,71$ pmol L-cit/min/mg prot, respectivamente). Nenhuma alteração na atividade da NOS independente de Ca^{2+} foi observada entre os grupos controle ($0,55 \pm 0.11$ pmol L-cit/min/mg prot) e L-NAME ($0,81 \pm 0,41$ pmol L-cit/min/mg prot).



* $p < 0,05$ vs CONTROLE (ANOVA)



***p < 0.01 vs CONTROLE (ANOVA)

Figura 3. Os gráficos A e B mostram a atividade de NOS no grupo controle e no tratado com L-NAME. A coluna Ca²⁺ dependente (dep Ca²⁺) mostra a produção de citrulina que continha o isótopo radioativo [³H]. A coluna Ca²⁺.independente (ind Ca²⁺), indica que quando o cálcio foi omitido não houve conversão de [³H]L-arginina para [³H]L-citrulina. Cada coluna representa Média ± DP de 3 experimentos.

3.2. Terminais Nervosos

3.2.1. Camundongos Não Tratados com L-NAME

Controles

Utilizando os recursos da microscopia confocal, realizamos cortes ópticos e observamos o padrão de distribuição do terminal nervoso nos músculos esternomastóide do lado direito, os quais não sofreram esmagamento (n=5).

A maioria das junções observadas neste grupo (192 do total de 195) apresentaram padrão de distribuição normal. O terminal nervoso estava em perfeita aposição ao sarcolema pós-sináptico, recobrando todos os braços dos receptores de acetilcolina (Fig. 4). Os receptores de acetilcolina também apresentaram padrão de distribuição normal, estando em braços contínuos. Foram observados brotamentos em apenas três junções (1,5 %, tabela 1).

Esmagamento

Nos músculos STN esquerdo que tiveram o nervo esmagado (n=5) foram observadas 200 JNM, das quais 48 (24 %, tabela 1) apresentaram finas ramificações emergindo da arborização terminal e se projetando para fora do sítio sináptico inervado originalmente, sendo identificados como brotamentos terminais (Fig. 5). Não foram observados outros tipos de brotamentos.

Figura 4. Marcação dos terminais nervosos (verde) e AChRs (vermelho) em junções neuromusculares de músculos de animais controle não tratados.

Em A, observamos o axônio pré-terminal se bifurcando e os terminais nervosos se sobrepondo por toda extensão dos braços dos AChRs.

Em B, o mesmo padrão de distribuição do terminal nervoso sobre os braços dos AChRs é vista em outra junção neuromuscular.

Barra: em μm

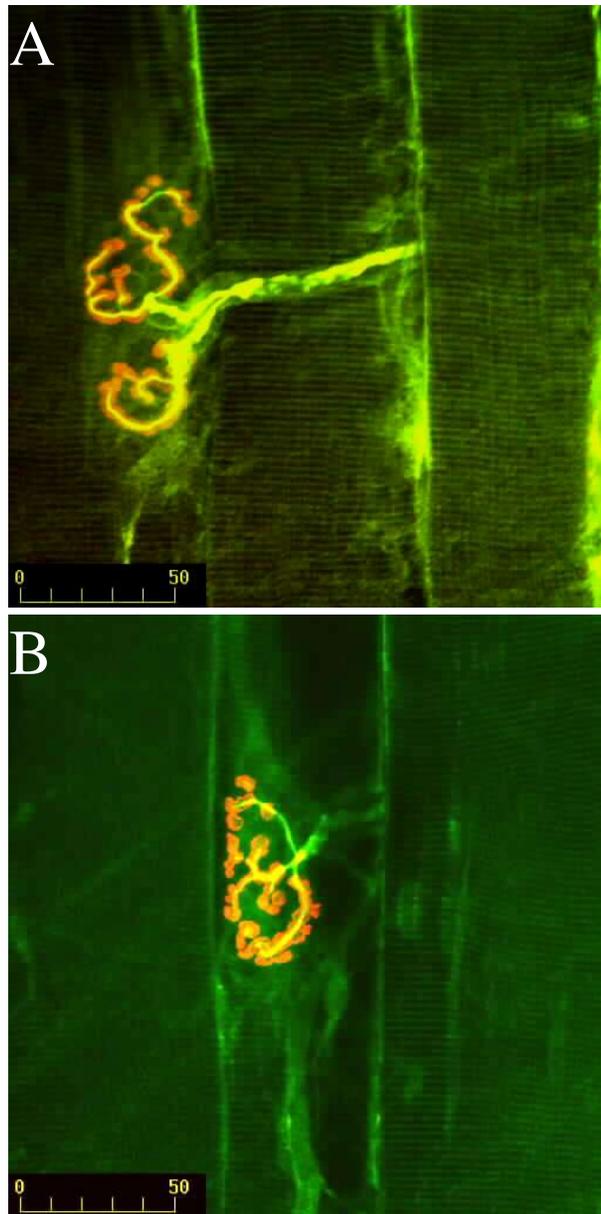


Figura 4

Figura 5. Marcação dos terminais nervosos (verde) e AChRs (vermelho) em junções neuromusculares de músculos de animais não tratados, 9 dias após lesão nervosa.

Em A, brotamentos terminais (setas), caracterizados por finas arborizações que se projetam para fora da região dos AChRs, ligando duas junções neuromusculares.

Em B, um único brotamento (seta) é visto, se projetando para fora do sítio sináptico.

Barra: em μm

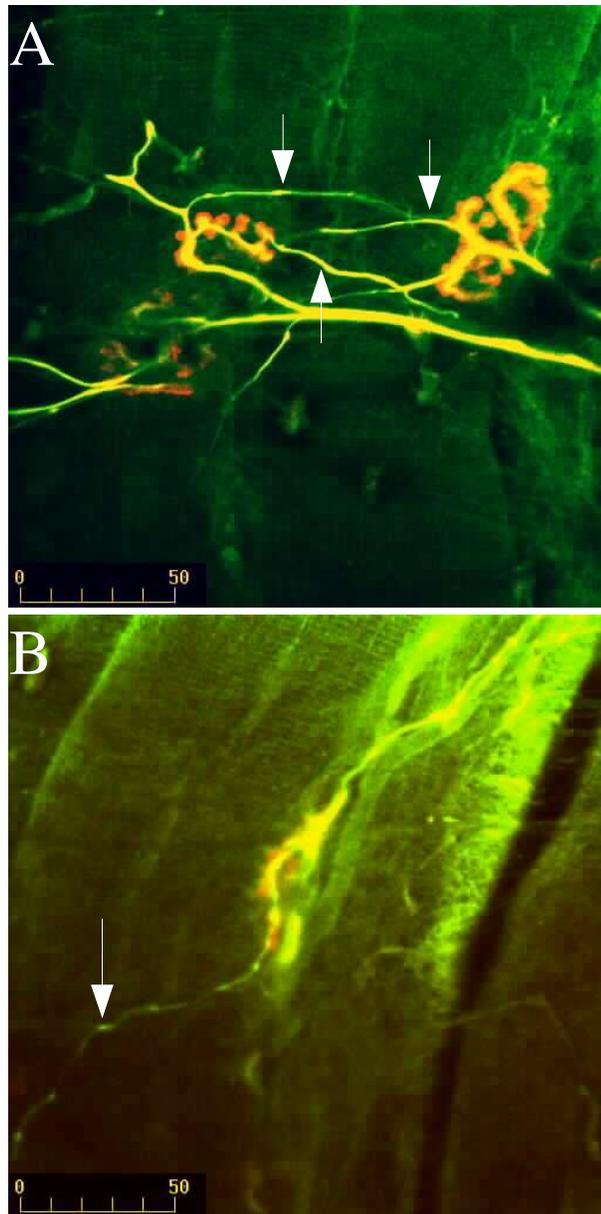


Figura 5

3.2.2. Camundongos Tratados com L-NAME

Controles

Nos músculos controles tratados (n=5), apenas quatro das 207 junções observadas apresentaram brotamentos terminais (1,9 %, tabela 1). As junções não apresentaram qualquer alteração morfológica, exibindo padrão similar aos controles não tratados já descritos, com uma perfeita sobreposição entre o terminal nervoso e os receptores de acetilcolina.

Esmagamento

Nos músculos STNs dos animais tratados que tiveram seu nervo esmagado (n=5), 217 junções foram observadas, sendo que 62 (28,5 %, tabela 1) apresentaram pelo menos um brotamento (Fig. 6). Somente foram observados brotamentos do tipo terminal neste grupo experimental.

Figura 6. Marcação dos terminais nervosos (verde) e AChRs (vermelho) em junções neuromusculares de músculos de animais tratados, 9 dias após lesão nervosa.

Em A e B notam-se brotamentos terminais (setas) se projetando para fora dos sítios sinápticos e ligando duas junções neuromusculares (A).

Barra: em μm

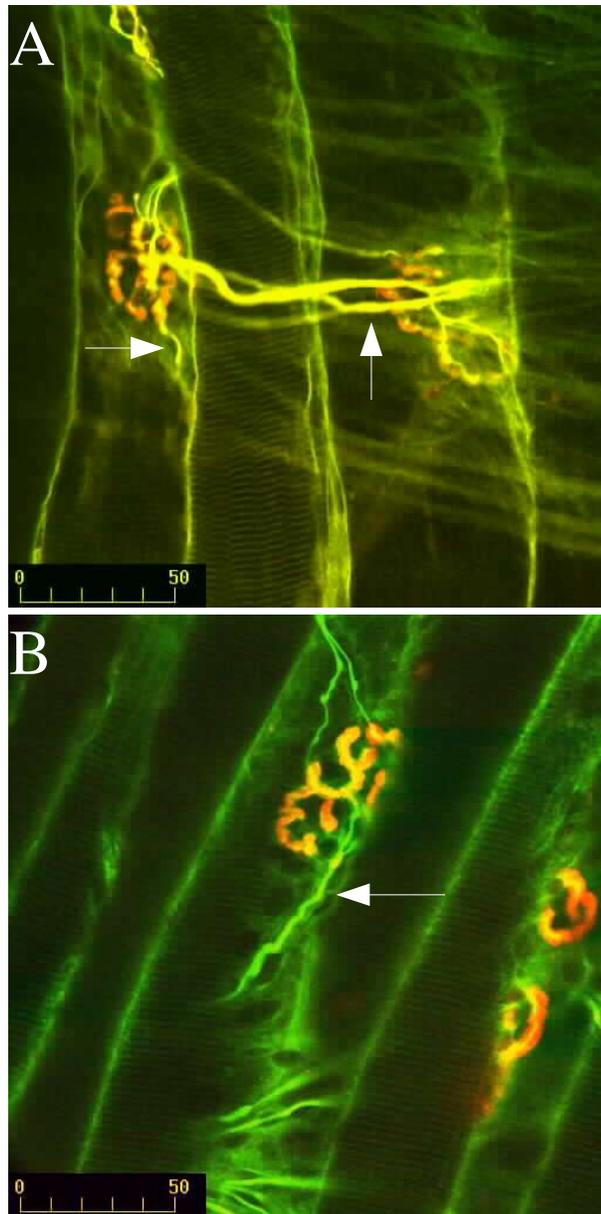


Figura 6

3.3. Células de Schwann Terminais

3.3.1. Camundongos não tratados com L-NAME

Controles

Os terminais nervosos da junção neuromuscular adulta são recobertos pelas células de Schwann terminais (SCs). Os processos citoplasmáticos das SCs podem ser vistos se aproximando da região juncional e seus núcleos aparecem como áreas arredondadas sem marcação sobre a região sináptica (Fig. 7A).

Nos músculos do lado direito não esmagados (n=5) foram observadas 100 JNM, sendo que 41 (41 %, tabela 1) estavam positivas para marcação das SCs com anti-S-100. Neste grupo as SC colocalizavam perfeitamente com os AChRs, recobrando a região do terminal nervoso, apresentando uma distribuição normal (Fig. 7A).

Esmagados

Quando ocorre perda da inervação por lesão neural ou muscular, as células de Schwann terminais proliferam e estendem seus processos citoplasmáticos desempenhando papel de guia dos brotamentos axonais (SON & THOMPSON, 1995a,b; TRACHTENBERG & THOMPSON, 1997; REYNOLDS & WOOLF, 1992; SON et al., 1996) que vão reinervar os sítios juncionais desnervados.

Nos músculos que tiveram o nervo esmagado (n=5) foram observadas 100 JNM das quais 78 (78 %, tabela 1) estavam positivas para marcação das SCs com anti-S-100. As

células de Schwann nestes músculos apresentaram intensa proliferação dos seus processos citoplasmáticos, os quais se projetavam para fora da área juncional e em alguns casos formavam pontes entre duas junções (Fig 8).

3.3.2. Camundongos tratados com L-NAME

Controles

Nos músculos contralaterais não esmagados (n=5) foram observadas 124 JNM, das quais 22 (17,7%, tabela 1) estavam positivas para SCs com anti-S100. Nestes músculos as SCs recobriam a área dos AChRs, apresentando colocalização normal das estruturas pré e pós-sinápticas.

Esmagados

Nos músculos esmagados (n=5) foram observadas 122 JNM, das quais 61 (50 %, tabela 1) foram positivas para marcação com anti-S100. O padrão morfológico apresentado em 100% das junções positivas foi similar ao exibido pelos músculos controle tratados e não tratados (Fig 7B). Neste grupo não houve proliferação dos processos citoplasmáticos das SCs para fora da área juncional como seria esperado 14 dias após desnervação parcial (REYNOLDS & WOOLF, 1992; SON et al., 1996; O'MALLEY et al., 1999; LOVE et al., 2003; TAM & GORDON, 2003b).

Figura 7. Marcação das células de Schwann terminais (verde) e AChRs (vermelho).

Em A, observamos células de Schwann terminais (SCs) de músculo controle não tratado. A seta indica processos citoplasmáticos das SCs se aproximando da região juncional. É possível observar núcleos das SCs (asteriscos).

Em B, células de Schwann terminais, 14 dias após a lesão nervosa em animais tratados. É possível observar duas junções neuromusculares, nas quais as SCs se aproximam dos sítios sinápticos (setas). Núcleos de SCs são observados (asteriscos). Notar que os processos citoplasmáticos não ultrapassam a região juncional. Na junção à direita, observa-se claramente o sítio sináptico alaranjado, indicando a sobreposição da marcação das SCs e dos AChRs.

Barra: em μm

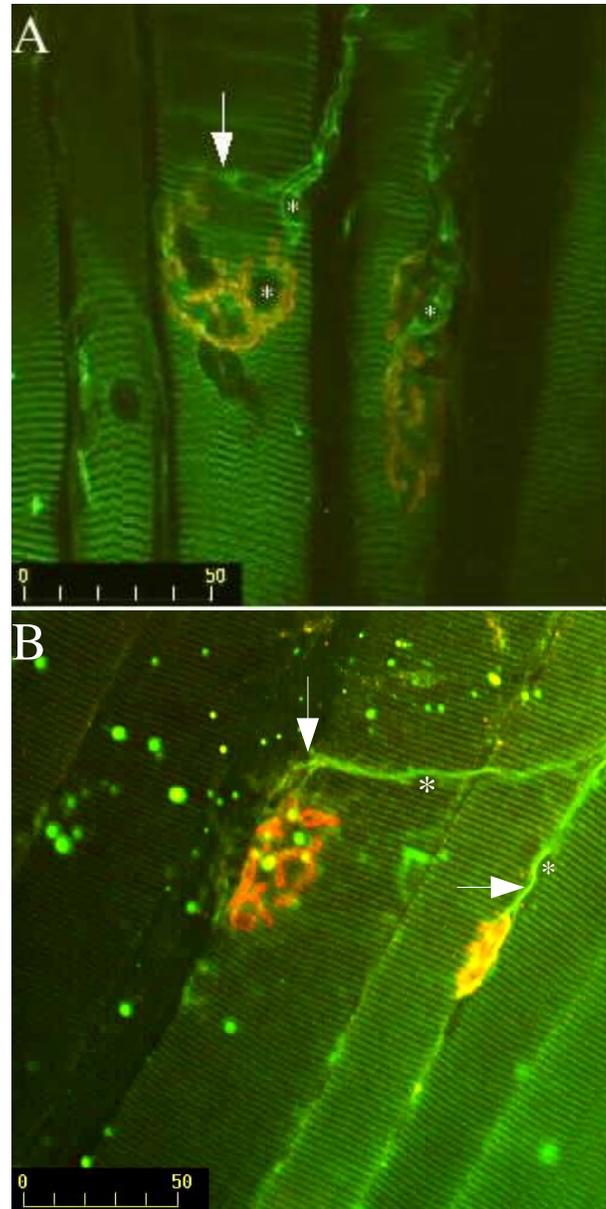


Figura 7

Figura 8. Marcação das células de Schwann terminais (verde) e AChRs (vermelho) em junções neuromusculares de músculos de animais não tratados, 14 dias após lesão nervosa.

Em A, nota-se aumento da complexidade dos processos citoplasmáticos das SCs (setas), os quais não se restringem apenas ao sítio sináptico.

Em B, observamos prolongamentos das SCs (setas) se projetando para fora da região juncional e formando uma ponte entre duas junções neuromusculares.

Em C, observamos a rede de processos citoplasmáticos (setas), fora da região dos AChRs.

Barra: em μm

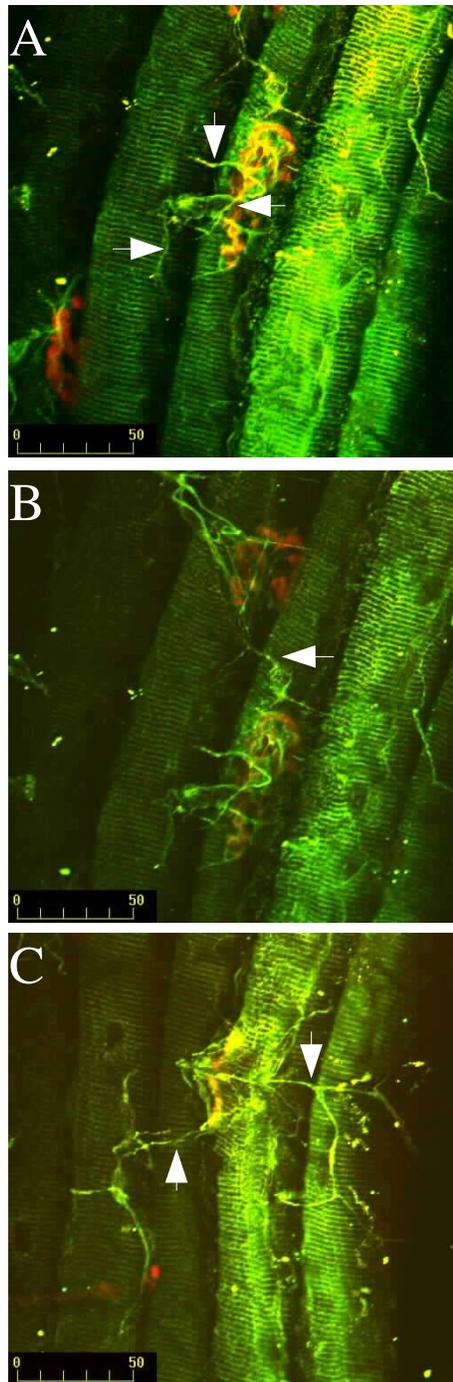


Figura 8

Análise estatística

A análise estatística (Qui-quadrado, X^2) mostrou que não houve diferença significativa ($p>0,05$) no número de junções com brotamentos entre os músculos esmagados tratados e os esmagados não tratados. Do mesmo modo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos brotamentos entre os músculos contralaterais tratados e não tratados.

Nossos resultados sugerem que a inibição da produção do NO pelo L-NAME não alterou a capacidade de brotamento dos terminais nervosos.

Houve diferença significativa ($p<0,05$, teste x^2) entre o número de junções positivas para célula de Schwann terminal dos músculos esmagados tratados e não tratados e entre os controles tratados e não tratados (Tabela 1).

Nossos resultados sugerem que em ausência de NO as células de Schwann terminais não respondem à lesão nervosa.

Tabela 1. Brotamentos dos terminais nervosos e processos de células de Schwann terminais para fora da região juncional em camundongos tratados e não tratados com L-NAME.

	Não tratados com L-NAME		Tratados com L-NAME	
	<i>Controle</i>	<i>Esmagado</i>	<i>Controle</i>	<i>Esmagado</i>
Brotamentos dos terminais	1.5% (195)	24% (200)	1.4% (207)	28.5% (217)
Marcação com S100 positiva	41% (100)	78% (100)	17.7% (124)*	50% (122)*
Processos das células de Schwann	0% (100)	100% (78)	0% (22)	0% (61)*

Os valores representam % de junções neuromusculares (total de junções). *Valores significativamente diferentes de seu grupo correspondente não tratado com L-NAME; $p < 0.05$, X^2 .

4.DISSCUSSÃO

4.1. Terminal Nervoso

No presente trabalho estudamos a importância do óxido nítrico (NO) para as respostas dos terminais nervosos e das células de Schwann terminais (SCs) após lesão nervosa.

Nossos resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) no número de junções neuromusculares que apresentaram brotamentos terminais entre os grupos tratados com L-NAME e não tratados após esmagamento do nervo. Nos animais não tratados, cerca de 24% das junções neuromusculares exibiram pelo menos um brotamento terminal, estando de acordo com os achados de outros autores (RICH & LICHTMAN, 1989; WALSH et al, 2000). No grupo que teve a produção do NO inibida, houve discreto aumento na resposta dos terminais nervosos em brotar (28,5%), no entanto, a análise estatística, mostrou que este resultado não difere dos animais não tratados.

De acordo com o local de origem, os brotamentos axonais podem ser classificados em quatro tipos: brotamento nodal; brotamento pré-terminal ou extraterminal; brotamento intraterminal e brotamento ultraterminal (Veja Cap. Introdução). A predominância de brotamentos terminais ou ultraterminais encontrada em nosso trabalho está de acordo com o descrito por outros estudos. DIXON & HARRIS (1999) observaram que 5 a 7 dias após paralisia muscular com β -bungarotoxina, 31% das junções neuromusculares apresentavam brotamentos, sendo que 27% eram brotamentos ultraterminais. Provavelmente, este tipo de brotamento seja mais eficaz para a promoção da reinervação, nos casos de lesões musculares ou nervosas extensas.

Diversos trabalhos indicam que o NO pode induzir o colapso dos cones de crescimento neuronais, inibindo os brotamentos dos neurônios no sistema nervoso central (HESS et al., 1993), além de evitar a poliinervação das fibras musculares durante o desenvolvimento, prevenindo a formação de sinapses extrajuncionais (SCHUMAN & MADISON, 1994; WANG et al., 1995; GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999; GODFREY & SCHWARTE, 2003). Estudo desenvolvido por TEWS et al., 1997 mostrou que em músculos desnervados há redução de nNOS no sarcolema, diminuindo conseqüentemente a síntese de NO em músculos desnervados. Assim, a inibição da produção do NO em nossos animais pelo L-NAME, pode ter sido um fator a mais que facilitou o processo de reinervação das junções neuromusculares por atração dos brotamentos terminais.

Os terminais nervosos de camundongos *mdx*, apesar de apresentarem diminuição na expressão da nNOS na região pré-sináptica (PEREIRA et al., 2001), mantém sua capacidade em brotar em resposta à lesões nervosas por esmagamento. Os tipos de brotamentos observados em camundongos *mdx* são predominantemente extraterminais e nodais (SANTO NETO et al., 2003). Como a lesão no músculo distrófico é extensa, os terminais intactos devem brotar para inervar as junções vizinhas, devendo deixar seu sítio sináptico, o que pode tornar estes tipos de brotamentos pouco eficazes para promover a reinervação, uma vez que eles não ultrapassam o sítio juncional original (VERZÈ et al., 1996).

Existem evidências que outras moléculas presentes na região juncional estejam

envolvidas na regulação da resposta dos terminais nervosos em brotar. Dentre elas destacam-se o fator neurotrófico ciliar (CNTF), a molécula neuronal de adesão celular (NCAM), fatores de crescimento similares à insulina (IGF), a proteína associada ao crescimento (growth associated protein, GAP-43) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (ENGLISH, 2003).

O CNTF age como um fator protetor contra a morte celular de motoneurônios neonatais axotomizados, sendo ativado após a lesão (SENDTNER et al., 1992). A produção de camundongos transgênicos nulos para o gene que codifica o CNTF mostrou que os terminais nervosos não brotam após desnervação parcial ou paralisia com toxina botulínica, entretanto, a resposta é conseguida com administração exógena do CNTF (SIEGEL et al., 2000). Outros trabalhos demonstraram que a administração de CNTF não só induz brotamentos terminais como estimula a expressão de CGRP nos terminais nervosos (TARABAL et al., 1996).

O CGRP é um neuropeptídeo de baixo peso molecular, sintetizado no corpo dos motoneurônios e transportado até o terminal nervoso, onde é armazenado em vesículas elétron-densas. Inicialmente acreditava-se que o CGRP fosse um agente anti-brotamento (TSUJIMOTO & KUNO, 1988). Contudo, estudos recentes mostraram que animais transgênicos que expressam altos níveis do peptídeo apresentam intensos brotamentos em resposta à desnervação (LU et al., 1999). Outros autores estão de acordo com a função neurotrófica do CGRP, sugerindo que sua presença no compartimento pré-sináptico forma um sinal anterógrado para os músculos que geram sinais retrógrados para o terminal

nervoso (SALA et al., 1995).

Várias moléculas de adesão celular, incluindo a NCAM estão envolvidas na regulação da diferenciação do terminal nervoso durante o desenvolvimento, podendo modular o processo de crescimento axonal, a sinaptogênese e a maturação das junções neuromusculares (WALSH et al., 2000). Durante o desenvolvimento a NCAM é expressa na superfície dos mioblastos, dos miotúbulos e axônios dos motoneurônios e seus respectivos cones de crescimento (WALSH & DOHERTY, 1991). No músculo adulto, a NCAM é exclusivamente localizada no compartimento pós-sináptico da JNM (COVAULT & SANES, 1986). No entanto, se ocorrer um bloqueio na transmissão neuromuscular ou desnervação, a reinervação é acompanhada pela reexpressão da NCAM na superfície muscular (COVAULT & SANES, 1986; KNUDSEN 1990).

A proteína associada ao crescimento (GAP-43) está presente em neurônios do sistema nervoso central e periférico durante a sinaptogênese e após lesão neural (SKENE, 1989). Adicionalmente, a GAP-43 foi identificada nas células de Schwann terminais também após lesão nervosa (WOOLF et al., 1992). Estudos subsequentes demonstraram que nos camundongos *mdx* a GAP-43 está presente somente no terminal nervoso. VERZÈ et al. (1996) demonstraram que os terminais nervosos positivos para GAP-43 estavam localizado nas áreas de degeneração-regeneração e apresentavam intensa ramificação de sua porção terminal, com processos finos e longos que se projetavam para fora do sítio juncional sem qualquer orientação no espaço.

A função indutora de brotamento de outras moléculas derivadas dos músculos como

o IGF-2 e neurotrofinas 4 e 5 são conhecidas, porém caminhos sinalizadores paralelos podem ativar mais de um fator neurotrófico, resultando na formação de brotamentos terminais (ENGLISH, 2003).

Em conclusão, nossos dados mostraram que em ausência do NO, os terminais nervosos mantêm sua capacidade para brotar após uma lesão nervosa. Estes resultados sugerem que o NO pode não ser um fator primário ou não está diretamente envolvido na indução de brotamentos dos axônios e terminais nervosos da junção neuromuscular.

4.2. Células de Schwann Terminais

O achado mais interessante de nosso trabalho foi que as células de Schwann terminais dos animais que sofreram lesão nervosa e foram tratados com L-NAME não apresentaram a intensa proliferação de seus processos citoplasmáticos, como esperado (Ver Fig. 9; REYNOLDS & WOOLF, 1992; SON et al., 1996; O'MALLEY et al., 1999; LOVE et al., 2003; TAM & GORDON, 2003b). Estas células exibiram padrão morfológico similar aos dos músculos que não tiveram o nervo esmagado.

A nNOS, enzima que catalisa a produção do NO nos músculos, foi descrita nas SCs de rãs (DESCARRIES et al., 1998), nas SCs de músculos de camundongos desnervados e normais (PEREIRA et al., 2001), além de ter sido observada nas SCs que cobrem junções neuromusculares desnervadas da eletroplaca de *Torpedo* (RIBERA et al., 1998).

Diversos autores sugerem que é provável que um estímulo indutor de brotamentos terminais difusível de curto alcance vindo das fibras musculares, influencie as SCs a iniciar a emissão de processos citoplasmáticos para guiar os brotamentos dos terminais nervosos até a junção neuromuscular desnervada mais próxima (TAM & GORDON, 2003a; ENGLISH, 2003). Como o NO é uma molécula que se difunde rapidamente, é esperado que ele alcance apenas células vizinhas após sua síntese e liberação (RIBERA et al., 1998), sendo um possível fator regulador dos brotamentos das SCs no processo de regeneração nervosa.

A proteína associada ao crescimento (GAP-43) foi encontrada nas células de Schwann terminais após lesão neural (WOOLF et al., 1992), entretanto não está presente

nestas células em camundongos *mdx* (VERZÈ et al., 1996), apesar dos ciclos de degeneração-regeneração que exigem constante remodelação neural.

Do mesmo modo que no terminal nervoso, a indução dos brotamentos das células de Schwann pode estar relacionada à ativação de mais de um fator neurotrófico.

Foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) do número de junções neuromusculares positivas para marcação das SCs com anti-S100 entre os músculos controles tratados e não tratados com L-NAME. Da mesma maneira, o número de junções neuromusculares positivas para SCs nos esmagados tratados também foi significativamente menor ($p < 0,05$) que as positivas nos esmagados não tratados.

Sugerimos algumas hipóteses para explicar a não marcação das SCs em todas as junções observadas e para diferença entre o número de junções positivas para SCs de músculos tratados e não tratados. Primeiramente, as proteínas específicas de membrana marcadas com anti-S100 estão preferencialmente incorporadas à face axonal interna das SCs (VOIGT et al, 2004) o que pode dificultar a penetração do anticorpo. Além disso, algumas células poderiam estar em apoptose após a lesão, o que prejudicaria a posterior observação (LOVE & THOMPSON, 1998). Por outro lado, O'MALLEY et al. (1999) demonstraram que a marcação com anti-S100 estava diminuída após desnervação, sugerindo que a expressão deste marcador é mantida pela inervação e que as junções neuromusculares que não apresentavam SCs estariam desnervadas. Contudo, diferentes estudos utilizaram esse marcador e identificaram com sucesso as SCs após desnervação parcial (REYNOLDS & WOOLF, 1992; SON & THOMPSON, 1995a,b; LOVE &

THOMPSON, 1998, 1999).

Ainda há a possibilidade do NO regular a expressão da S100 nas SCs e, neste caso a inibição da produção do NO pelo L-NAME alteraria a imunomarcagem e o número de SCs observadas em controles e esmagados.

Outros estudos utilizando dupla marcação das células de Schwann e do terminal nervoso em animais tratados, esmagados e *mdx* podem contribuir para o melhor entendimento da importância do óxido nítrico para os brotamentos das células de Schwann terminais.

Em conclusão, nosso trabalho sugere que a ausência de NO alterou a resposta das SCs após lesão nervosa parcial.

4.3.Considerações Finais

Embora músculos distróficos de humanos e camundongos *mdx* idosos apresentem reduzida capacidade regenerativa (ENGEL et al., 1994), existem ciclos de degeneração-regeneração nestes músculos, implicando na necessidade de remodelação contínua dos terminais nervosos para reinervação muscular (VERZÈ et al., 1996). A ausência do NO pode interferir neste processo de remodelação neural, contribuindo para evolução da doença pela diminuição da possibilidade de inervação e sobrevivência das fibras musculares regeneradas. Por outro lado, alterações nos brotamentos dos componentes juncionais podem comprometer a formação das junções neuromusculares em fibras musculares geradas a partir de terapias celulares, como o transplante de mioblastos. Neste caso, os

brotamentos terminais podem ficar sem direção e acabar não inervando as novas fibras, se as células de Schwann não desempenharem sua função de guia.

Na figura 9, apresentamos esquematicamente uma proposta de vias moleculares sinalizadoras para indução de brotamentos, de acordo com as hipóteses discutidas por ENGLISH, 2003. Na ausência de transmissão sináptica neuromuscular, brotamentos do terminal e das SCs são gerados para auto-reparação e restabelecimento da neurotransmissão. Sugerimos que a fibra muscular inativa libera um fator indutor de brotamentos (FIB) em direção à fibra muscular inervada, o qual pode ter como órgão alvo o próprio terminal nervoso, as células de Schwann terminais ou ambos. O NO pode ser o FIB para as SCs, mas não para o terminal nervoso. Um estímulo inicial é preciso para os músculos liberarem o FIB. É sugerido que este estímulo pode vir dos próprios músculos desnervados ou das SCs das junções desnervadas (ENGLISH, 2003), podendo ser também uma ação mediada pelo NO. Não descartamos a possibilidade do NO ser liberado pelo terminal nervoso ativo e regular os brotamentos das SCs em justaposição à ele.

Nosso trabalho ressalta a importância do estudo da inervação das fibras musculares formadas a partir do transplante celular, nas terapias celulares. O uso de fatores de crescimento indutores de brotamentos dos terminais nervosos e das células de Schwann pode ser uma nova perspectiva para o sucesso destas terapias, que visam a regeneração dos músculos distróficos.

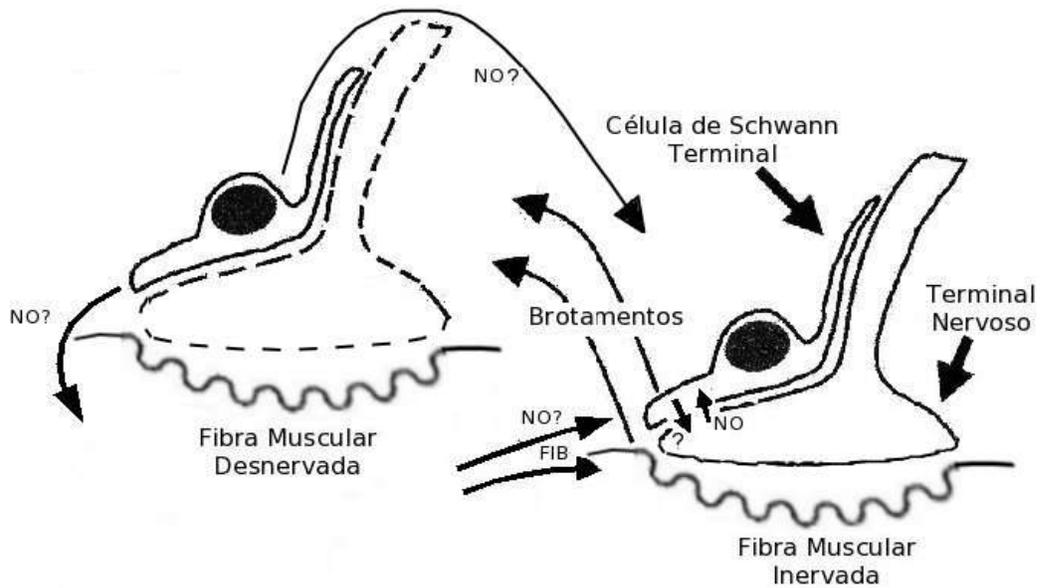


Figura 9. Esquema sugerido de vias moleculares sinalizadoras reguladoras de brotamentos. Uma molécula sinalizadora ativa inicialmente a liberação de fatores indutores de brotamentos (FIB) pela fibra muscular desnervada. Estes FIB estimulam brotamentos do terminal nervoso e das células de Schwann terminais da fibra muscular inervada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* De acordo com NBR6023 – Set/2002

AULD, D.S.; ROBITAILLE, R. Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: Nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *The Neuroscientist*, n. 9(2), p. 144-157, 2003.

ARMERLLE, D.R.; STAMLER, J.S. NO⁺, NO and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: Implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, n.318, p.279-285, 1995.

BIGGAR, W.D.; KLAMUT, H.J.; DEMACIO, P.C.; STEVENS, D.J., RAY, P.N. Duchenne muscular dystrophy: Current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin. Orth. Rel. Res.*, n.401, p.88-106, 2002.

BIRKS, R.; HUXLEY, H.E.; KATZ, B. The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *J. Neurophysiol. London*, n.150, p.134-144, 1960.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: Current approaches and future directions. *J. Mol. Med.*, n.82(2), p.102-115, 2004.

BOWDEN, R.E.M.; DUCHEN, L.W. The anatomy and pathology of the neuromuscular junction: In: *The Neuromuscular junction. Handbook of Experimental Pharmacology*. Ed. Zaimis, Berlin, Springer Verlag, v. 42, p. 23-97, 1976.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, n.7, p.248-54, 1976.

BROCKES, J.P. Assays for cholinergic properties in cultered rat Schwann cells. *Proc. Roy. Soc. Lond. (B)*, n.222, p.121-134, 1984.

BROWN, M.C.; IRONTON, R. Motor neurone sprouting induced by prolonged tetrodotoxin block of nerve action potential. *Nature*, n.265, p.459-461, 1977.

BROWN, M.C.; HOLLAND, R.L. A central role for denervated tissues in causing nerve sprouting. *Nature*, n.282, p.724-726, 1979.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, n.63, p.175-195, 1994.

BRENNAN, J.E.; CHAO, D.S.; XIA, H.; ALDAPE, K.; BREDT, D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, n.82, p.743-752, 1995.

BULFIELD, G.; SILLER, W.G.; WIGHT, P.A.L.; MOORE, K.J. X chromosome - linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n.81, p.1189-1192, 1984.

CARPENTER, J.L.; HOFFMAN, E.P.; ROMANUL, F.C.; KUNKEL, R.K.; ROSALES, N.S.Ma.; DASBACH, J.J.; RAE, J.F.; MOORE, F.M.; MCAFEE, M.B.; PEARCE, L.K. Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.*, n.135, p.909-919, 1989.

CARPENTER, C.; KARPATI, G., Duchenne muscular dystrophy: plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it repaired. *Brain*, n.102, p.147-161, 1979.

CHANG, W.-J.; IANNACCONE, S.T.; LAU, K.S.; MASTERS, B.S.S.; MCCABE, T.J.; MCMILLAN, K.; PADRE, R.C.; SPERNER, M.J.; TIDBALL, J.G.; STULL, J.T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n.93, p.9142-9147, 1996.

CHAO, D.S.; SILVAGNO, F.; BREDET, D.S. Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase. *J. Neurochem.*, n.71(2), p.784-789, 1998.

COOPER, B.J.; WINAND, N.J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B.A.; HOFFMAN, E.P.; KUNKEL, L.M.; ORONZI-SCOTT, M.; FISHBECK, K.H.; KORNGAY, J.N.; AVERY, R.J.; WILLIAMS, J.R.; SCHMICKEL, R.D.; SYLVESTER, J.E. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature*, n.334, p.154-156, 1988.

COVAULT, J.; SANES, J.R. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, n.102, p. 716-730, 1986.

DICK, J.; VRBOVA, G. Progressive deterioration of muscles in mdx mice induced by overload. *Clin. Sci.*, n.84, p.145-150, 1993.

DIXON, R.W.; HARRIS, J.B. Nerve terminal damage by β -bungarotoxin: Its clinical significance. *Am. J. Pathol.*, n.154(2), p.447-455, 1999.

DESCARRIES, LM.; CAI, SF; ROBITAILLE, R. Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, n.27(11), p.829-840, 1998.

DICKSON, B. J. Molecular mechanisms of axon guidance. *Neuron*, n.298, p.1959-1964, 2002.

DUBOWITZ, V. What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *J. R. Coll. Physicians Lond.*, n.34, p.464-468, 2000.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Dystrophinopathies. In: Engel, A. G.; Franzini-Armstrong, C., (Eds.) *Myology* (2 vol.). USA: McGraw-Hill, p.1133-1187, 1994.

ENGLISH, A.W. Citokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, n.32, p.943-960, 2003.

FARIA, M.; MUSCARÁ, M.N.; MORENO, H.Jr.; TEIXEIRA, S.A; DIAS, H.B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F.; DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus-maze test. *Eur J Pharmacol*, n.323, p.37-43, 1996.

FLETCHER, S.; WILTON, S.D.; HOEWELL, M. C. Gene therapy and molecular approaches to the treatment of hereditary muscular disorders. *Curr. Opin. Neurol.*, n.13, p.553-560, 2000.

FÖRSTERMANN, U; GORSKY, L.D; POLLOCK, J.S; SCHMIDT, H.H; HELLER, M.; MURAD, F.R. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.*, n.168(2), p.727-32, 1990.

GILLIS, J. Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of *mdx* mouse. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, n.20, p.605-625, 1999.

GODFREY, E.W.; SCHWARTE, R.C. The role of nitric oxide signaling in the formation of the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, n.32, p.591-602, 2003.

GROZDANOVIC, Z.; BAUMGARTEN, H.G. Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histology and Histopatol.*, n.14 (1), p.243-256, 1999.

GRINNEL, A. Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junction. *Physiol. Rev.*, n.75, p.789-834, 1995.

HALL, Z.W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. *Cell*, n.72/*Neuron*, n.10(suppl.), p.99-121, 1993.

HEUSER, J.E.; REESE, T.S. Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, n.88, p.564-580, 1981.

HESS, D.T.; PATTERNSON, S.I.; SMITH, D.S.; SKENE, J.H.P. Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature*, n.366, p.562-565, 1993.

HOLLAND, R.L.; BROWN, M.C. Postsynaptic transmission block can cause terminal sprouting of a motor nerve. *Science*, n.207, p.649-651, 1980.

HOFFMAN, H. Local re-innervation in partially denervated muscle: a histophysiological study. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, n28, p.383-397, 1950.

HOFFMAN, E.P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *Trends Pharmacol. Sci.*, v.22(9), p.465-470, 2001

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

JAHRONI, B.S.; ROBITAILLE, R.; CHARLTON, M.P. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells *in situ*. *Neuron*, 8, p.1069-1077, 1992.

JIA, L.; BONAVENTURA, C; BONAVENTURA, J.; STAMLER, J.S. Nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, n. 380, p.221-226, 1996.

KAMINSKI, H.J.; ANDRADE, F.H. Nitric oxide: Biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neurom. Dis.*, n.11, p.517-524, 2001.

KRAMARCY, N.R.; SEALOCK, R. Syntrophin isoforms at the neuromuscular junction: Developmental time course and differential localization. *Mol. Cel. Neurosci.*, n.15., p.262-274, 2000.

KOENIG, M.; HOFFMAN, E.P.; BERTELSON, C.J.; MONACO, A.P.; FEENER, C.; KUNKEL, L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, n.50, p.509-517, 1987.

KNUDSEN, K. Cell adhesion molecules in myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, n.2, p.902-906, 1990.

KOIRALA, S.; QIANG, H.; KO, C-P. Reciprocal interactions between perisynaptic Schwann cells and regenerating nerve terminals at the frog neuromuscular junction. *J. Neurobiology*, n.44, p.343-360, 2000.

KOIRALA, S.; REDDY, L.V.; KO, C-P. Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, n.32, p.987-1002, 2003.

LOVE, F.M.; THOMPSON, W.J. Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junction during development and regeneration. *J. Neurosci.*, n.18(12), p.9376-9385, 1998.

LOVE, F.M.; THOMPSON, W.J. Glial cells promote reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *J. Neurosci.*, n.19, p.10390-10396, 1999.

LOVE, F.M.; SON, Y-J.; THOMPSON, W.J. Activity alters muscle reinnervation and terminal sprouting by reducing the number of Schwann cell pathways that grow to link synaptic sites. *J. Neurobiol.*, n.54(4), p.566-576, 2003.

LU, J.T.; SON, Y.; LEE, J.; JETTON, T.L.; SHIOTA, M.; MOSCOSO, L.; NISWENDER, K.D.; LOEWY, D.; MAGNUSUN, M^a; SANES, J.R.; EMESON, R.B. Mice lacking α -calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. *Mol. Cel. Neurosci.*, n.14, p.969-981, 1999.

LU, Q.L.; RABINOWITZ, A.; CHEN, Y.C.; YOKOTA, T.; YIN, H.; ALTER, J.; JADOON, A.; BOU-GARIOS, G.; PATRIDGE, T. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restore dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *PNAS*, n.102(1), p.198-203, 2005.

MARIOL, M-C; SÉGALAT, L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Current Biol.*, n.11(21), p. 1691-1694, 2001.

MATTEOLI, M.; BALBI, S.; SALA, C.; CHINI, B.; CIMINO, M.; VITADELO, M.; FUMAGALLI, G. Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction. *J. Mol. Neurosci.*, n.2, p.175-184, 1990.

MENKE, A.; JOCKUSH, H. Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse. *Nature*, n.349, p.69-71, 1991.

MING, G-L.; HENLEY, M.; TESSIER-LAVIGNE, H., M.; SONG, H-J.; POO, M-M. Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron*, n.29, p.441-452, 2001.

MUELLER, G.M.; O'DAY, T.; WATCHKO, J.F.; ONTELL, M. Effect of injecting primary myoblasts versus putative muscle-derived stem cells on mass and force generation in mdx mice. *Hum. Gene Ther.*, n.13, p.1081-1090, 2002.

OLLERSTAM, A.; PITNER, J.; PERSSON, A.E.G.; THORUP, C. Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.*, n.99(9), p.2212-2218, 1997.

O'MALLEY, J.P.; WARAN, M.T.; BALICE-GORDON, R.J.. *In vivo* observations of terminal Schwann cell at normal, denervated, and reinnervated mouse neuromuscular junction. *J. Neurobiol.*, n.38, p.270-286, 1999.

PAMPHLETT, R. Early terminal and nodal sprouting of motor axons after botulinum toxin. *J. Neurosci.*, n.92, p.181-192, 1989.

PEREIRA, E.C.L.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Immunolocalization of neuronal nitric oxide synthase of the neuromuscular junction of mdx mice: A confocal microscopy study. *J. Anatomy*, n.198, p.663-671, 2001.

PURVES, D.; LICHTMAN, J.W. Maintenance and modifiability of synapses. *In: Principles of Neural Development*. Sinauer Associates Inc. ed., Sunderland, p.301-327, 1985.

RAFUSE, V.F.; GORDON, T. Self-reinnervated cat medial gastrocnemius muscles. I. Comparisons of the capacity of regenerating nerves to form enlarged motor units after extensive peripheral nerve injuries. *J. Neurophysiol.*, n.75, p.268-281, 1996.

REIST, N.E.; SMITH, S.J. Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junctions. *PNAS*, n.89, p.7625-7629, 1992.

REYNOLDS, M.L.; WOOLF, C.J. Terminal Schwann cells elaborate extensive process following denervation of the motor endplate. *J. Neurocytol.*, n.21, p.50-66, 1992.

RIBERA, J.; MARSAL, J.; CASANOVAS, A.; HUKKANEN, M.; TARABAL, O.; ESQUERDA, J.E. Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of torpedo electric organ: Its role as regulator of acetylcholine release. *J. Neurosc. Res.*, n.51, p.90-102, 1998.

RICH, M.M.; LICHTMAN, J.W. In vivo visualization of presynaptic and postsynaptic changes during synapse elimination of reinnervated mouse muscle. *J. Neurosci.*, 9(5), p.1781-1805 1989.

RUFF, R.L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: Overview. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, n.998(1-10), 2003.

SALA, C.; ANDREOSI, J.S.; FUMAGALLI, G.; LOMO, T. Calcitonin gene-related peptide: possible role in formation and maintenance of neuromuscular junctions. *J. Neurosc.*, n.15, p.520-528, 1995.

SALPETER, M.M. Vertebrate neuromuscular junctions: General morphology, molecular organization and functional consequences. In: *The vertebrate neuromuscular junction*. Ed. M.M Salpeter, New York, Alan R. Liss, 1987.

SANES, J.J.; LICHTMAN, J.W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22, p.389-442, 1999.

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. *Neurosc. Lett.*, n.343, p.67-69, 2003.

SCHMALBRUCH, H. The muscular dystrophies. In: Mastaglia, F.L and Walton, J.(Eds.), *Skeletal muscle pathology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, p.235, 1982.

SCHUMAN, E.M; MADISON, D.V. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, p.153-83, 1994.

SENDTNER, M.; STOCKLI, A.; THOENEN, H. Synthesis and localizaton of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J. Cell biol.*, 118, p.139-148, 1992

SEIXAS, S.L.; CÂNDIDO, J.L.; SAVINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55(3-B), p.610-617, 1997.

SIEGEL, S.G.; PATTON, B.; ENGLISH, A.W. Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Experimental Neurology*, n.166, p.205-212, 2000.

SLATER, C. R. Structural determinants of the reliability of synaptic transmission at the vertebrate neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, n.32, p.505-522, 2003.

SNYDER, S.H. No endotelial NO. *Nature*, n.377, p.196-197, 1995.

SON, Y-J.; THOMPSON, W.J. Schwann cell process guide regeneration of periferal axons. *Neuron*, n.14, p.125-132, 1995a.

SON, Y-J.; THOMPSON, W.J. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by process extended by Schwann cells. *Neuron*, n.14, p.133-141, 1995b.

SON, Y-J.; TRACHTENBERG, T.; THOMPSON, W.J. Schwann cell induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *TINS*, n.19(7), p.280-285, 1996.

STAMLER, J.S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, n.81, p.209-237, 2001.

STEDMAN, H.H.; SWEENEY, H.L.; SHRAGER, J.B.; MAGUIRRE, H.C.; PANETTIERI, R.A.; PETROF, B.; NARUSAWA, M.; LEFEROVICH, J.M.; SLADKY, J.T.; KELLY, A.M. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerataive changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, n.352, p.536-539, 1991.

SKENE, J.H.P. Axonal growth associated proteins *Ann. Rev. Neurosci.*, n.12, p.127-156, 1989.

SULAIMAN, O.A.R.; BOYD, J.G.; GORDON, T. Regeneration in the peripheral system of mammals. In: Kettenmann, H. and Ranson, B.R. (Eds.) *Neuroglia*, 2^aed., Oxford University Press, USA, 2004.

TAM, S.L.; ARCHIBALD, V.; TYREMAN, N.; JASSAR, B.; GORDON, T. Increased neuromuscular activity reduces sprouting in partially denervated muscles. *J. Neurosci.*, n.21, p.654-667, 2001.

TAM, S.L.; GORDON, T. Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, n.32, p.961-974, 2003a.

TAM, S.L.; GORDON, T. Neuromuscular activity impairs axonal sprouting in partially denervated muscles by inhibiting bridge formation of perisynaptic Schwann cells. *J. Neurobiol.*, n.57(2), p.221-234, 2003b.

TARABAL, O.; CALDERÓ, J.; RIBERA, J.; SORRIBAS, A.; LÓPEZ, R.; MOLGÓ, J.; ESQUERDA, J.E. Regulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP) during axonal growth and neuromuscular synaptic plasticity induced by botulinum toxin in rats. *Eur. J. Neurosci.*, n.8, p.829-836, 1996.

TEWS, D.S.; GOEBEL, H.H.; SCHNEIDER, I.; GUNKEL, A.; STENNERT, E.; NEISS, W.F. Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, n.56, p.1283-1289, 1997.

TINSLEY, J.M.; BLAKE, D.J.; RICHARD, A.Z.; DAVIES, K.E. Increase complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, n.91, p.8307-8313, 1994.

THOMAS, J.; LANUZA, M.A.; SANTAFÉ, M.; FENOLL-BRUNET, M.R.; GARCIA, M.R. Topological differences along mammalian motor nerve terminals for spontaneous and alpha-bungarotoxin-induced sprouting. *Histol. Histopathol.*, n.15, p.43-52, 2000.

THOMAS S.; ROBITAILLE, R. Differential frequency-dependent regulation of transmitter release by endogenous nitric oxide at the amphibian neuromuscular synapse. *J. Neurosci.*, n.21, p.1087-1095, 2001.

TRACHEMBERG, J.T.; THOMPSON, W.J. Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature*, n.379, p.174-177, 1996.

TRACHEMBERG, J.T.; THOMPSON, W.J. Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J. Neuroscience*, n.17 (16), p.6243-6255, 1997.

TSUJIMOTO, T.; KUNO, M. Calcitonin gene-related peptide prevents disuse-induced sprouting from nearby nerve terminals: Studies in living mice. *J. Neurosci.*, n.8, p.3951, 1988.

TURNER, P.R.; FONG, P.; DENETCLAW, W.F.; STEINHARDT, R.A. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J. Cell. Biol.*, n.115, p.1701-1712, 1991.

VERZÈ, L.; BUFFO, A.; ROSSI, F; OESTREICHER, A.B.; GISPEN W.H.; STRATA, P. Increase of B-50/GAP-43 immunoreactivity in uninjured muscle nerves of mdx mice. *Neurosci.*, n.70(3), p.807-815, 1996.

VOIGT, T.; DAUBER, W.; KOHLER, U. Perisynaptic Schwann cells of the vertebrate motor endplate bear modified cilia. *Microsc. Res. Tech.*, n.63, p.149-154, 2004.

WALSH, F.S.; DOHERTY, P. Structure and function of the gene for neural cell adhesion molecule. *Semin. Neurosci.*, n.3, p. 271-284, 1991.

WALSH, F.S.; HOBBS, C.; WELLS, D.J.; SLATER, C.R.; FAZELLI, S. Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic mice results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered structure but not function. *Mol. Cel. Neurosci.*, n.15 (3), p.244-261, 2000.

WANG, T.; XIE, Z.; LU, B. Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature*, n.374, p.262-266, 1995.

WEHLING, M.; SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell Biol.*, n.155, p.123-131, 2001.

WEINER, N.; TAYLOR, P. Neurohumoral transmission: The autonomic and somatic motor nervous systems. In: Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; Murad, F. (Eds.). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, Ed. MacMillan Publishing Company, p.66-235, 1985.

WELLER, B.; KARPATI, G.; CARPENTER, S. Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening. *J. Neurol. Sci.*, n.100, p.9-13, 1990.

WERNIG, A.; SALVINI, T.F.; IRINTCHEV, A. Axonal sprouting and changes in fibre types after running-induced muscle damage. *J. Neurocytol.*, n.20, p.903-913, 1991.

WOOLF, C.J.; REYNOLDS, M.L.; CHONG, M.S.; EMSON, P.; IRWIN, N.; BENOWITZ, L.I. Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal Schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. *J. Neurosci.*, n.12, p.3999-4010, 1992.

**ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA MUSCLE &
NERVE**

LACK OF A TERMINAL SCHWANN CELL RESPONSE AFTER NERVE INJURY IN THE ABSENCE OF NITRIC OXIDE

Elaine Cristina Leite Pereira*, Elaine Minatel, Humberto Santo Neto, Maria Julia Marques.
Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP),
Campinas, SP, Brazil, 13083-970.

*Current address: São Francisco University (USF), Bragança Paulista, SP, Brazil.

Acknowledgments: We thank Dr. Gilberto De Nucci (Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP) for providing the [³H]L-arginine and drugs used in the pharmacological tests, Dr. Simone Teixeira for help with the brain NO synthase activity assays, and Dr. Stephen Hyslop (Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP) for reviewing the manuscript. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 95/6110-2 and 01/00570-4). H.S.N. and M.J.M. are recipients of fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 300061/99-4 and 301053/91-0). E.C.L.P was supported by a fellowship from CNPq.

All correspondence should be addressed to:

Maria Julia Marques,

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP).

Campinas, SP, Brazil - CEP 13083-970 - CP 6109.

Phone: 55-19-3788-6395; Fax: 55-19-32893124; email: marques@unicamp.br

Running title: Neuromuscular junction alterations in the absence of NO

LACK OF A TERMINAL SCHWANN CELL RESPONSE AFTER NERVE INJURY IN THE ABSENCE OF NITRIC OXIDE.

ABSTRACT

Dystrophic muscles show alterations in the dystrophin-glycoprotein complex and a lack of neuronal nitric oxide (NO) synthase, associated with structural changes in neuromuscular junction. In this study, we examined the nerve terminal and Schwann cell responses after a crush lesion in NO-deficient mice. Nine days after nerve crush, 24% of the control junctions (n=200) showed ultraterminal sprouts. In the absence of NO, this frequency was 28.5% (n=217; $p > 0.05$ compared to the controls; X^2 test). Fourteen days after nerve lesion, all of the Schwann cells showed an extensive network of processes away from the synaptic site, whereas in the absence of NO, Schwann cells processes failed to extend away from the endplate. These results show that NO is involved in the Schwann cell response to nerve injury. They also suggest that presynaptic molecular signaling may be impaired in dystrophic muscles, and that this could influence the innervation and survival of newly formed myofibers generated by cell-mediated therapies.

Key words: dystrophy, nerve terminal sprouting, neuromuscular junction, nitric oxide, terminal Schwann cell.

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy is a severe X-linked recessive disorder characterized by the progressive loss of muscular strength that is perceptible from 4 - 5 years onwards^{7,8}. Duchenne dystrophy is caused by a lack of dystrophin, a cytoskeletal protein localized on the inner surface of the sarcolemma in normal muscle⁴. Dystrophin contributes to the stability of the muscle membrane¹¹ and is associated with a complex of glycoproteins and membrane proteins known as the dystrophin-glycoprotein complex (DGC), which contains molecules involved in signal transduction cascades important for cell survival¹⁷.

The innervation of newly formed muscle fibers, generated by cell-mediated therapies for dystrophinopathies, is an important step for the success of these therapies since new myotubes need to be innervated to ensure their maturation and survival. A knowledge of the factors that govern synapse formation and the molecular interactions between the pre- and postsynaptic elements of the neuromuscular junction is therefore important.

Muscular dystrophies that arise from mutations in genes that encode proteins in the DGC frequently involve defects in the structure of neuromuscular junctions. Such mutations typically cause a secondary loss of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) from the postsynaptic membrane since nNOS is a prominent member of the DGC^{3,5}. Recently, the defects in neuromuscular junction structure in some DGC mutants have been suggested to result from the secondary loss of muscle NO²².

In addition to its location in the DGC, nNOS has also been reported in the

presynaptic region of the neuromuscular junction, in nerve terminals or Schwann cells of denervated muscle fibres¹⁹, and in the Schwann cells of regular innervated muscle fibers of frogs⁶ and mice¹⁶. Interestingly, in dystrophin-deficient *mdx* mice, the presynaptic expression of nNOS is decreased¹⁶. Since Schwann cells are important for maintaining the neuromuscular junction structure by inducing and guiding nerve sprouts^{24,25}, and since nitric oxide (NO) is a potential sprout-promoting molecule in synapses of the CNS²³, we hypothesized that the decrease in nNOS seen in the presynaptic region of *mdx* mice would reduce the ability to sprout of nerve and/or Schwann cells. We have shown that *mdx* nerve terminals do not lose their ability to sprout after a nerve lesion²¹. However, the presence of muscle fiber regeneration and the production of sprout-inducing factors in *mdx* mice may enhance the sprouting of nerve terminals²⁶.

In this study, we examined whether the inhibition of NO production *per se* in normal muscle would affect the ability of Schwann cells and/or nerve terminals to sprout. By using L-NAME to inhibit nNOS activity, we observed that Schwann cells, but not nerve terminals, lose their ability to respond to a nerve lesion.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male and female C57BL/10 mice (n=20) were obtained from the animal care facilities at Unicamp and were housed on a 12 h light/dark cycle and had free access to water and standard rodent chow until used. The animal experiments described here were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation, Unicamp and were done in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). The mice were divided into control (n=10) and L-NAME treated (n=10) groups. In all mice, the nerve to the left sternomastoid muscle was crushed, with the right muscle serving as a control. In each group, some mice (n=5) were sacrificed 9 days after the nerve lesion, to observe nerve terminals, while other mice (n=5) were sacrificed 14 days later to observe the Schwann cells.

Nitric oxide synthase (NOS) inhibition

To inhibit NOS, the mice were given L -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME; Sigma) in their drinking water (0.5 mg/ml) for 20 days.

Brain NO synthase activity

The efficacy of the L-NAME treatment was assessed by measuring brain NOS activity *ex vivo*, as described elsewhere¹⁰. The assay measured the ability of a whole-brain

homogenate to convert [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline. After treatment with L-NAME as described above, mice (n=3 controls and 3 treated with L-NAME) were killed by ether inhalation and the brains were quickly removed and homogenized in 5 vols. of cold incubation buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) containing 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 1 mM L-citrulline.

The homogenates were incubated at room temperature (25-27°C) for 30 min in the presence of 1 mM NADPH, 2 mM CaCl_2 and 10 mM L-arginine containing 100,000 dpm of [2,3,4,5- ^3H]L-arginine monohydrochloride (Amersham, UK). Controls for enzymatic activity were done in parallel and consisted either of the omission of CaCl_2 or the addition of 1 mM EGTA or L-NAME to the incubation medium.

The protein content of the samples was determined according to the method of Bradford² and the brain NOS activity was expressed as pmol L-citrulline produced/min/mg of protein.

Nerve crush

Nerve crush was done 14 days after starting the treatment with L-NAME. L-NAME-treated (n=10) and non-treated (n=10) mice were anesthetized with a mixture (1:1) of ketamine hydrochloride (0,2 g/Kg, Francotar, Virbac) and xilazine hydrochloride (0,04 mg/kg Virbaxil 2%, Virbac). 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 nerve to the left sternomastoid (STN) muscle was exposed and using a fine forceps crushed for 1 min at a

position 2 mm from its entry into the sternomastoid muscle. The contralateral side served as a control. The skin was sutured with interrupted Ethicon 5.0 sutures and the wound then carefully cleaned. Nerve terminals and acetylcholine receptors were labeled for observation nine days later (n=5 mice/group) and Schwann cells and receptors were studied 14 days after nerve crush (n=5 mice/group).

Confocal microscopy

Nine (for nerve terminal labeling) and 14 (for Schwann cell labeling) days after the crush lesion, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (0.6 mg/kg) and perfused intracardially with phosphate buffered saline (PBS) followed by freshly prepared cold fixative (2% formaldehyde in PBS). Right (control) and left (nerve crush) sternomastoid muscles were removed, placed in a sylgard dish and washed with PBS. The muscles were incubated with rhodamine- -bungarotoxin (Molecular Probes, Eugene, OR; 1 g/ml) for receptor staining and anti-neurofilament antibody (anti-NF-200; Sigma; Saint Louis, MO; 1:500 in blocking solution) followed by anti-mouse IgG-fluorescein (Sigma; 1:500), for nerve terminal staining. For Schwann cell labeling, the muscles were incubated with anti-S100 antibody (anti-S-100, Sigma, Saint Louis, MO; 1:500 in blocking solution), followed by anti-rabbit IgG-fluorescein (Sigma; 1:500). After washing with PBS, the muscles were mounted in 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO; mounting medium for fluorescence microscopy, Sigma) and then observed with a confocal microscope. The sternomastoid muscles were mounted intact on a slide and observed

without sectioning^{13,14,15}.

A dual-channel BioRad laser confocal system (MRC 1024UV; Hercules, CA) mounted on an Axiovert 100 Zeiss inverted microscope and equipped with Ar-Kr lasers was used. A wavelength of 568 nm was used to excite the rhodamine-labeled receptors and 488 nm was used to excite the fluorescein. The settings for contrast, brightness, and iris diameter were adjusted and kept constant during all observations of control and L-NAME treated muscles. A 63X objective and a 100X 1.4 NA oil immersion objective were used for confocal imaging. The number of endplates showing nerve sprouts in L-NAME-treated and non-treated mice was compared using the X² test.

RESULTS

Brain NOS activity

Treatment with L-NAME significantly inhibited brain NOS activity when compared to the respective control group (Fig. 1). Brain NOS activity was inhibited *in vitro* by approximately 95% when calcium ions were omitted from the assay and EGTA was added, and by approximately 98% when 1 mM L-NAME was added to the incubation mixture, thus confirming that the conversion of [³H]L-arginine to [³H]L-citrulline mediated by a Ca²⁺-dependent constitutive NOS in the brain homogenates.

Control mice

Nerve terminals

In control neuromuscular junctions (n=150), the nerve terminals were seen as fine processes arising from the presynaptic terminals, and were stained with anti-NF200 antibody. These processes covered the acetylcholine receptors (AChRs) branches and colocalized with the AChR-rich area (Fig. 2A). Few neuromuscular junctions showed ultraterminal sprouts (Table 1). These sprouts were characterized by one or two prolongations that emerged from the nerve terminal and left the endplate region towards other junctions. The AChRs were distributed in regular branches. Nine days after nerve lesion, 24% of the neuromuscular junctions showed ultraterminal sprouts (Table 1). The nerve terminal profiles that covered the receptors gave off one or two sprouts that frequently run as bridges from one endplate to another (Fig. 2C).

Schwann cells

In control neuromuscular junctions (n=150), the pattern of Schwann cell distribution was characterized by intramuscular processes filled with anti-S-100 antibody that ran towards the AChR-rich area (Fig. 2B). These profiles contained one or two non-stained oval or round structures (Schwann cell nuclei) that were also seen over the endplate region. This main profile branched over the AChRs, which had the normal pretzel-like shape distribution (Fig. 2 A,B). No Schwann cell processes were seen outside the endplate area in all of the junctions positively labeled with anti-S-100 antibody (Table 1).

Fourteen days after nerve crush, the changes in the pattern of Schwann cell

distribution were similar to those previously reported for these cells after a nerve lesion^{12,18}.

At all of the junctions positively labeled with anti-S-100 (78%; n=100 junctions), Schwann cell processes were seen away from the endplate region and formed a network of processes (Fig. 2D).

L-NAME treated mice

Nerve terminal

The pattern of nerve terminal and AChRs distribution in L-NAME treated mice did not differ from that seen in the control group. Few neuromuscular junctions showed sprouts. Nine days after nerve crush, 28.5% of the junctions showed up to two ultraterminal sprouts (Table 1, Fig. 2E).

Schwann cell

The neuromuscular junctions showed the same pattern of SCs and AChRs distribution as seen in control mice and no Schwann cell processes occurred away from the endplate region. After nerve crush, there was a significant decrease in the number of endplates positive for the S-100 antibody, as well as in the number of junctions showing Schwann cell processes outside the AChR-rich area (Table 1, Fig. 2F).

DISCUSSION

Duchenne muscular dystrophy is caused by a lack of dystrophin, a cytoskeletal protein associated with the DGC^{4,11}. One of the signaling molecules associated with the DGC is neuronal NOS (nNOS), the levels of which are reduced in the dystrophic muscle. This secondary loss of nNOS may contribute to the physiopathology of Duchenne dystrophy²⁸ and to the defects in neuromuscular junction structure seen in some DGC mutants²². nNOS has also been described in the presynaptic elements of the neuromuscular junction^{6,19}, and is decreased in dystrophin-deficient muscle fibers of *mdx* mice¹⁶, where NO may modulate Schwann cell and nerve terminal interactions.

In *mdx* muscle, the nerve terminals do not lose their ability to sprout during the normal course of the disease or after a crush injury²¹. Potential sprouting factors, such as NCAM, IGF and CNTF^{9,27}, may be produced by regenerating *mdx* muscle fibers. As shown here, the ability of nerve terminals to sprout did not decrease following a nerve crush, after inhibition of the activity of the nNOS with L-NAME. The lack of NO did not affect the ability of nerve terminals to sprout since the frequency of junctions with ultraterminal sprout was similar in L-NAME treated and non-treated mice. Thus, NO may not be directly involved in the sprouting of axons and nerve terminals at the neuromuscular synapse after a nerve crush.

A striking finding of the present investigation was that Schwann cells did not react to nerve lesion in the L-NAME treated mice. Schwann cells respond vigorously to nerve damage by elaborating extensive processes that spread away from the synaptic site¹⁸,

possibly in order to improve nerve regeneration and guide muscle reinnervation¹² In the present study, 14 days after nerve lesion all of the endplates labeled with S-100 showed a network of processes away from the synaptic region. Conversely, in L-NAME treated mice, Schwann cells did not show this same response, which suggests that the ultraterminal sprouts travel without the orientation of Schwann cell processes. If this is the case, then innervation cannot be accurate when NO is decreased. Double labeling of Schwann cells and nerve terminals could reveal whether ultraterminal sprouts travel alone and are able to reach synaptic sites precisely. Fewer junctions were labeled with anti-S-100 antibody in the L-NAME-treated mice, regardless of whether the nerve was crushed or not. This raises the possibility that NO also regulates the expression of the S-100 protein.

In conclusion, the inhibition of nNOS, with a consequent decrease in NO formation, affected the presynaptic components of the neuromuscular junction to different extents. Although nerve terminals were able to produce ultraterminal sprouts, Schwann cells did not respond to the nerve lesion. This finding suggests that the molecular signaling pathways for motor neuron and Schwann cell sprouting use different molecules and that the signaling interactions between Schwann cells and the nerve terminal are disrupted by the lack of NO. A decrease in nNOS activity in dystrophic muscles can lead to several alterations, not only in the molecular assemblage of the neuromuscular junction, but also in other aspects of muscle physiology^{1,20} The influence of the alterations seen here on the formation of synapses in newly generated muscle fibers remains to be elucidated.

REFERENCES

1. Anderson JE. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 2000;11:1859-1874.
2. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;7:248-54.
3. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS. Nitric oxide synthase is complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995;82:743-752.
4. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:1189-1192.
5. Chang W-J, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BSS, McCabe TJ, McMillan K, Padre RC, Spencer MJ, Tidball JG, Stull JT. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9142-9147.
6. Descarries LM, Cai SF, Robitaille R. Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J Neurocytol* 1998;27(11):829-840.
7. Dubowitz V. What is muscular dystrophy? Forty years of progressive ignorance. *J R Coll. Phys Lond* 2000;34:464-468.
8. Engel AG, Yamamoto M, Fischbeck KH. Dystrophinopathies. In: Engel A.G. & Franzini-Armstrong C. (Editors), *Myology*. New York: McGraw-Hill; 1994. Vol.2, p1133-1187.

9. English AW. Cytokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction. *J Neurocytol* 2003;32:943-960.
10. Faria MS, Muscará MN, Moreno Jr H, Teixeira SA, Dias HB, Oliveira B, Graeff FG, De Nucci G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol* 1997;323:37-43.
11. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:919-928.
12. Kang H, Tian L, Thompson W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. *J Neurocytol* 2003;32:975-985.
13. Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neurosci* 2000;20:3663-3675.
14. Marques MJ, Santo Neto H. Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *J Anat* 1998;192:425-430.
15. Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ. Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers. *Muscle Nerve* 2001;24:410-416.
16. Pereira ECL, Santo Neto H, Marques MJ. Immunolocalization of neuronal nitric oxide synthase at the neuromuscular junction of *mdx* mice: a confocal microscopy study. *J Anat* 2001;198:663-671.

17. Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001;24:1575-1594.
18. Reynolds ML, Woolf CJ. Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol* 1992;21:50-66.
19. Ribera J, Marsal J, Casanovas A, Hukkanen M, Tarabal O, Esquerda JE. Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of torpedo electric organ: its role as regulator of acetylcholine release. *J Neurosci Res* 1998;51:90-102.
20. Sander M, Chavoshan B, Harris SA, Iannaccone ST, Stull JT, Thomas GD, Victor RG. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13818-13823.
21. Santo Neto H, Martins AJ, Minatel E, Marques MJ. Axonal sprouting in mdx mice and its relevance to cell and gene mediated therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Neurosci Lett* 2003;343:67-69.
22. Shiao T, Fond A, Deng B, Wehling-Henricks M, Adams ME, Froehner SC, Tidball JG. Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking alpha-and beta 1-syntrophins. *Hum Mol Genet* 2004;13:1873-1884.
23. Sohn YK, Ganju N, Bloch KD, Wands JR, de la Monte SM. Neuritic sprouting with aberrant expression of the nitric oxide synthase III gene in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 1999;162:133-151.

24. Son YJ, Thompson WJ. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 1995a;14:125-132.
25. Son YJ, Thompson WJ. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron* 1995b;14:133-141.
26. Van Mier P, Lichtman JW. Regenerating muscle fibers induce directional sprouting from nearby nerve terminals: studies in living mice. *J Neurosci* 1994;14:5672-5686.
27. Walsh FS, Hobbs C, Wells DJ, Slater CR, Fazeli S. Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic mice results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered structure but not function. *Mol Cell Neurosci* 2000;15:244-261.
28. Wehling M, Spencer MJ, Tidball JG. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in *mdx* mice. *J Cell Biol* 2001;155:123-131.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. NOS activity in brain homogenates from control (Cont) and L-NAME-treated mice, measured as the conversion of [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline (prot:protein). Brain NOS activity was inhibited 80% when Ca^{2+} was omitted from the incubation medium (control-dep Ca^{2+}) and by approximately 98% when L-NAME was included in the assay (L-NAME-dep Ca^{2+}), thus confirming that the conversion of [^3H]L-arginine to [^3H]L-citrulline involved a Ca^{2+} -dependent constitutive NOS. Each column represents the mean \pm S.E.M of 3 experiments.

*** $p < 0.01$ compared to the control mice (ANOVA).

Figure 2. Nerve terminal (green - A, C, E), Schwann cell (green - B, D, F) and AChR (red) distribution in control neuromuscular junctions (A, B) and after nerve lesion in L-NAME non-treated (C, D) and treated (E, F) mice. In the controls, nerve terminal branches were distributed over the receptors and were limited to the AChR-rich area. Note the muscle fiber striations (A). Schwann cell processes (B, arrow) limited to the endplate area. Schwann cell nuclei (B, asterisk). After nerve lesion, ultraterminal nerve sprouts (C, arrow) and Schwann cell processes (D, arrows) were away from the endplate region. After nerve lesion in the L-NAME-treated group, ultraterminal sprouts (E, arrow) and Schwann cell processes were seen covering the AChRs; no Schwann cell processes were seen away from the endplate region. Scale bar 50 μm .

Table 1. The presence of nerve terminal sprouts and Schwann cell processes away from the neuromuscular junction site, in non-crushed and after nerve crush, in control and L-NAME-treated mice.

	Control		L-NAME treated	
	<i>Non-crushed</i>	<i>After crush</i>	<i>Non-crushed</i>	<i>After crush</i>
Nerve sprout	1.5 (195)	24 (200)	1.4 (207)	28.5 (217)
S100 - positive	41 (100)	78 (100)	17.7 (124)*	50 (122)*
Schwann cell processes	0 (100)	100 (78)	0 (22)	0 (61)*

Values represent the % of neuromuscular junctions out of the total number of junctions indicated in parentheses. *p<0.05 compared to the corresponding control.

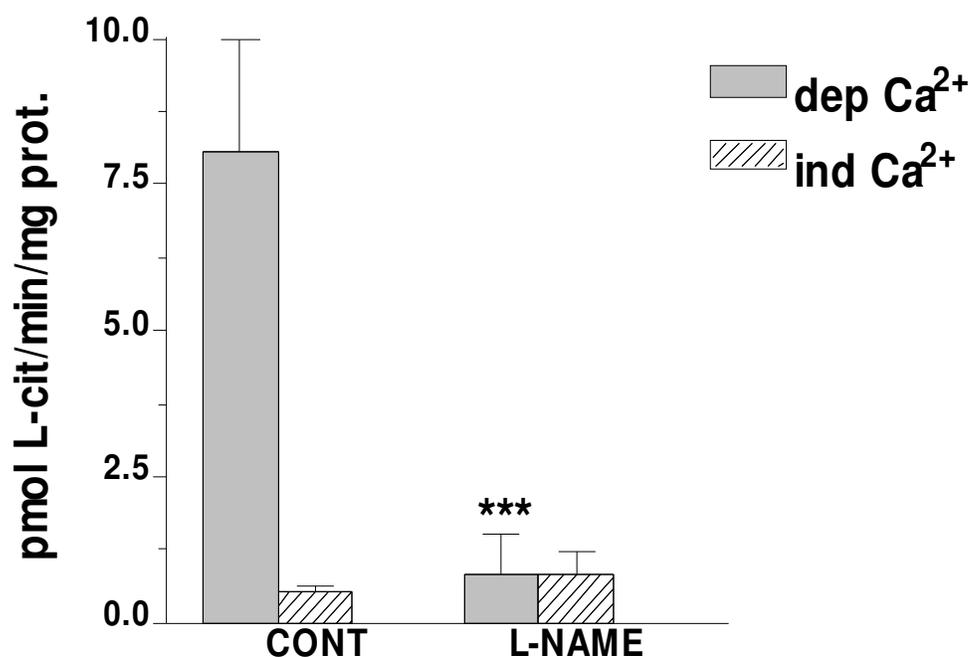


Figure 1.

