

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



AIRTON JOSÉ MARTINS

**BROTAMENTOS AXONAIS EM CAMUNDONGOS *MDX* E
IMPLICAÇÕES NA TERAPIA GÊNICA DA DISTROFIA
MUSCULAR DE DUCHENNE**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>AIRTON JOSÉ MARTINS</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Airton José Martins.

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

Orientador: Prof. Dr. Humberto do Santo Neto

Co-orientadora : Profa. Dra. Maria Júlia Marques

NIDADE CD C
° CHAMADA T/UNICAMP
M366b
EX
OMBO BC/ 49223
ROC 16-83710 2
DX
PREÇO R\$11,00
DATA
Nº CPD

2

CM00167783-5

31B ID 241396

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

M366b

Martins, Airton José

Brotamentos axonais em camundongos *MDX* e implicações na terapia gênica da distrofia muscular de Duchenne/ Airton José Martins.

Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Humberto Santo Neto

Co-Orientadora: Maria Júlia Marques

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. Junção Neuromuscular. 2. Brotamentos Axonais. 3. Distrofia Muscular de Duchenne. I. Santo Neto, Humberto. II. Marques, Maria Júlia. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Data da defesa: 19/02/02

BANCA EXAMINADORA

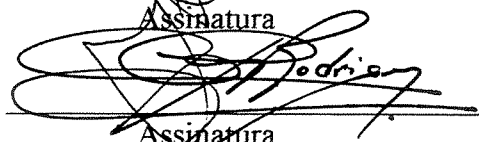
Titulares:

Prof. Dr. Humberto Santo Neto (Orientador)



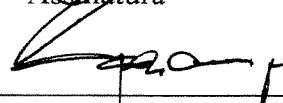
Assinatura

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues



Assinatura

Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos



Assinatura

Suplente :

Profª. Drª. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

Assinatura

502233/8

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais pela minha formação
para a vida e para os estudos.

A minha esposa e filhos pelo apoio e compreensão dispensados
em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que ilumina meu caminho, renovando em mim a esperança e a confiança na jornada da vida.

Ao Prof. Dr. Humberto Santo Neto pelo acolhimento, confiança e valiosa orientação durante toda a realização do trabalho e ainda pela amizade adquirida nestes anos.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Júlia Marques pela atenção, pelas constantes e prontas sugestões e pela ajuda inestimável dispensada.

Ao Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos, Prof^ª. Dr^ª. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues pelas importantes sugestões dadas durante a pré-banca examinadora.

Aos técnicos Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula, pelo auxílio e colaboração imprescindíveis durante a realização do processo experimental deste trabalho.

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

As Sras. Ana Floriana Rodrigues, Silvia Helena Burghi Kalaf, Lourdes Pinheiro e Liliam Alves Senne Panagio, pela atenção que dispensaram durante todo o mestrado.

Aos amigos Elaine Minatel, Elaine Pereira, Cesar Alexandre, Marcelo, Yara, Débora e Cibele pela amizade, companheirismo e apoio.

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

Aos órgãos financiadores, FAPESP (95/6110-2), CNPq (301053/91) e FAEP (1201/00)

A Pontifícia Universidade Católica de Campinas pelo apoio através da liberação de horas para o desenvolvimento deste trabalho

Muito obrigado.

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract	10
1. Introdução.....	11
1.1 Objetivo.....	15
2. Aspectos Gerais dos Temas e dos Métodos	16
2.1 Distrofia Muscular de Duchenne.....	17
2.2 Modelo Animal Para o Estudo da Distrofia Muscular.....	21
2.3 Brotamentos Axonais.....	23
2.4 Princípios da Microscopia Confocal.....	27
2.5 Materiais e Métodos	30
2.5.1 Animais	30
2.5.2 Procedimento para Esmagamento do Nervo	31
2.5.3 Procedimento Cirúrgico para Retirada dos Músculos Esternomastóides (Stns)....	31
2.5.4 Marcação dos Receptores de Acetilcolina e Terminais Nervosos.....	32
2.5.5 Identificação e Quantificação dos Brotamentos Axonais	33
3. Trabalho a ser submetido ao Neuroscience Letters	35
4. Considerações Finais	46
5. Referências Bibliograficas	63

RESUMO

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum e a mais devastadora das distrofias musculares. É causada pela mutação do gene responsável pela expressão da distrofina, uma proteína estrutural do sarcolema, a membrana celular das fibras musculares esqueléticas. A ausência dessa proteína leva a uma instabilidade sarcolemal que termina em necrose da fibra muscular. As fibras necróticas perdem a capacidade regenerativa fazendo com que o tecido muscular seja substituído por tecido fibroso. O comprometimento muscular inicia-se pelos membros inferiores e progride até atingir os músculos respiratórios, o que ocorre geralmente ao redor dos 20 anos de idade, quando os pacientes invariavelmente vão a óbito.

Atualmente acredita-se que a cura efetiva da doença poderá ser feita com a terapia gênica que pode ser feita de duas formas. Uma delas consiste em fazer com que as fibras musculares já existentes passem a expressar distrofina e a outra em gerar novas fibras musculares que expressem distrofina. O sucesso dessas terapias depende do restabelecimento funcional das novas fibras musculares e das pré-existentes, cuja inervação deve ter sido perdida durante o momento em que sofreu o primeiro ciclo de degeneração. Por sua vez, a capacidade de reinervação depende exclusivamente da capacidade dos axônios gerarem brotamentos axonais.

A simples presença de fibras musculares em degeneração e em regeneração deve atuar como fator estimulador de brotamentos axonais. Entretanto, dados da literatura mostram que em pacientes portadores de DMD, bem como em camundongos da linhagem *mdx*, o modelo experimental para o estudo da DMD, não ocorre brotamentos axonais. O objetivo deste trabalho foi examinar a capacidade de axônios de camundongos emitirem brotamentos axonais.

Foram empregadas duas linhagens de camundongos, *mdx* e C57BL/10, cada uma delas foi examinada de duas formas: sem nenhum tratamento e com esmagamento do nervo que teve por objetivo induzir a emissão de brotamentos nervosos. Para tal, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de virbaxyl/francotar e o nervo para o músculo esternomastoideo esquerdo esmagado com pinça de relojoeiro. Oito dias após o esmagamento os animais foram anestesiados, perfundidos com paraformoldeído por via intracardiaca, e os músculos esternomastoídeos direito e esquerdo retirados para marcação dos receptores de acetilcolina e dos axônios pré-terminais e terminais. Isto foi realizado com o uso de α -bungarotoxina conjugada à rodamina e anticorpo monoclonal para filamentos nervosos, respectivamente.

Os músculos foram examinados através da microscopia confocal de fluorescência. Nossas observações mostraram que em músculos de camundongos *mdx*, que não sofreram esmagamento do nervo, portanto que representa o que ocorre durante o curso normal da distrofia muscular, não houve aumento dos brotamentos axonais do tipo nodal, mas houve aumento significativo dos brotamentos extra e intraterminais, comparados aos camundongos C57BL/10. Por sua vez, quando estimulados pelo esmagamento do nervo, os brotamentos do tipo nodal e extraterminal, mas não aqueles intraterminais, estiveram presentes na mesma intensidade dos camundongos não distróficos. Essas observações permitem concluir que, embora durante o curso normal da doença não ocorra brotamento nodal, os axônios dos camundongos *mdx* são capazes de emitirem brotamentos extra e

intraterminais. Considerando-se que a inervação de novas fibras musculares depende mais de brotamentos nodais, os quais podem propagar-se por maiores distâncias dentro de um mesmo músculo, é possível que as novas terapias de transplantes de mioblastos e de células tronco indiferenciadas apresentem menor possibilidade de sucesso que aquelas que consistem na transformação das fibras musculares pré-existentes, que não possuem distrofina em fibras distrofina positivas, já que sua inervação estaria garantida pela presença de brotamentos extraterminais e especialmente intraterminais

1. INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é considerada a forma mais comum e devastadora das distrofias musculares (Engel et al., 1994). É causada pela mutação do gene responsável pela expressão da distrofina, o que resulta na não produção, por parte da fibra muscular, dessa proteína de sua membrana celular, responsável pela estabilidade sarcolemal (Hoffman et al., 1987; Bonilla et al., 1988).

Clinicamente a DMD caracteriza-se por progressiva e severa fraqueza muscular que se torna evidente em torno dos 3 aos 5 anos de idade. Isto confere ao paciente dificuldade de locomoção e acaba confinando-o a uma cadeira de rodas por volta dos 12 anos de idade. Aproximadamente 90% dos doentes morrem antes dos 20 anos em decorrência de complicações cardíacas e respiratórias (Engel et al., 1994). Sob o ponto de vista fisiopatológico a DMD caracteriza-se pela ocorrência de necrose das fibras musculares esqueléticas e perda da capacidade regenerativa das mesmas.

Não há, atualmente, tratamento eficaz para a DMD, porém algumas alternativas apontam para terapias que possam corrigir a ausência da distrofina. Como por exemplo a terapia gênica. Nessa terapia o gen responsável pela expressão da distrofina é introduzido em alguns tipos de vírus que são administrados ao paciente ou em animais de laboratório. Através de receptores para partículas virais, que existem naturalmente na membrana celular de mamíferos, os vírus acoplam-se à membrana celular do hospedeiro e são internalizadas no citoplasma da fibra muscular (Fletcher et al., 2000; Mann et al., 2001). Outro tratamento em potencial é o transplante de células precursoras de fibras musculares, como mioblastos e células tronco (indiferenciadas) da medula óssea. Nestes casos, ao invés da transformação das fibras musculares, originalmente distrofina-negativas, em fibras distrofina-positivas, ocorre a formação de novas fibras musculares que passam a expressar distrofina (Pagel & Morgan, 1995; Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999).

No momento, o maior obstáculo para o sucesso dessas novas terapias é a antigenicidade dos vírus e das células transplantadas, que levam a baixa sobrevivência dos mesmos. Outro fator limitante é a pequena capacidade de locomoção dos mioblastos, quando introduzidos no hospedeiro.

Um fator determinante para o sucesso destas eventuais terapias reside na capacidade dos animais distróficos em reinervar as fibras musculares neoformadas, tornando-as assim, funcionalmente competentes. Por sua vez a inervação das fibras musculares depende da habilidade dos axônios pré-terminais emitirem brotamentos axonais.

Embora venha sendo pesquisada há aproximadamente três décadas e diversos elementos tenham sido considerados candidatos, até o momento não foi identificado nenhum fator que concretamente seja responsável pela sinalização molecular que induza os brotamentos axonais. Entre esses candidatos, destacam-se a molécula de adesão celular neural (*a neural cell adhesive molecules*-NCAM), o óxido nítrico (NO) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide*-CGRP).

Observações recentes (Pereira et al., 2001), sugerem que em células de Schwann de junções neuromusculares de camundongos distróficos da linhagem *mdx*, um modelo animal para estudos da DMD, há diminuição na expressão da nNOS, enzima que catalisa a síntese do óxido nítrico a partir da arginina. Isto interessa à medida em que a célula de Schwann terminal desempenha papel central na gênese e na migração dos brotamentos axonais e que o NO possa ser um mediador da célula de Schwann (Son et al., 1996). Também tem sido demonstrado que a população de junções neuromusculares com presença de CGRP está diminuída nas junções de animais *mdx* (Oliveira et al., 2001). Por outro lado, embora a presença de fibras musculares em degeneração e em regeneração atuem como

fatores indutores de brotamentos (Van Mier e Lichtman, 1994) não foi encontrada diferença significativa na frequência de brotamentos axonais em camundongos *mdx* (Lyons & Slater, 1991). Esses achados sugerem que em camundongos *mdx* a capacidade de emitir brotamentos axonais esteja alterada, provavelmente diminuída. Essa hipótese é reforçada pelos achados de ausência de brotamentos axonais em músculos de pacientes de DMD (Coers et al., 1977).

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é examinar a capacidade de emissão de brotamentos axonais em camundongos distróficos da linhagem *mdx*.

2. ASPECTOS GERAIS DOS TEMAS E DOS MÉTODOS

2.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) foi descrita inicialmente por Meryon (1852) e Duchenne (1868) e é considerada a mais devastadora das distrofias musculares. É de herança recessiva ligada ao sexo, transmitida pela mãe assintomática ao filho do sexo masculino, ocorre em cerca de 1 a cada 3500 crianças, instalando-se geralmente ao redor dos quatro anos de idade (Engel et al., 1994).

Os sinais clínicos, como fraqueza muscular, manifestam-se inicialmente nos membros inferiores, onde posteriormente desenvolve-se pseudohipertrofia muscular caracterizada por fibrose intersticial e proliferação de tecido gorduroso. Este fato cria dificuldades para a deambulação, manutenção da posição ortostática, e para levantar-se a partir da posição agachada. A degeneração muscular progride, resultando em intensa fraqueza de outros grupos musculares. A morte sobrevém quando são atingidos os músculos respiratórios e a musculatura cardíaca, o que ocorre geralmente ao redor dos 20 anos de idade (Engel et al., 1994).

A DMD ocorre em função de uma mutação no gene responsável pela expressão da distrofina (Hoffmann et al., 1987; Bonilla et al., 1988). A distrofina, uma proteína de peso molecular de 427 Kda, cuja molécula é formada por uma tripla hélice de 2700 aminoácidos, está presente em músculos esqueléticos normais e localiza-se na superfície citoplasmática do sarcolema, faz parte do citoesqueleto subsarcolemal, que conecta os miofilamentos a um complexo de glicoproteínas da membrana celular (ver fig. 1).

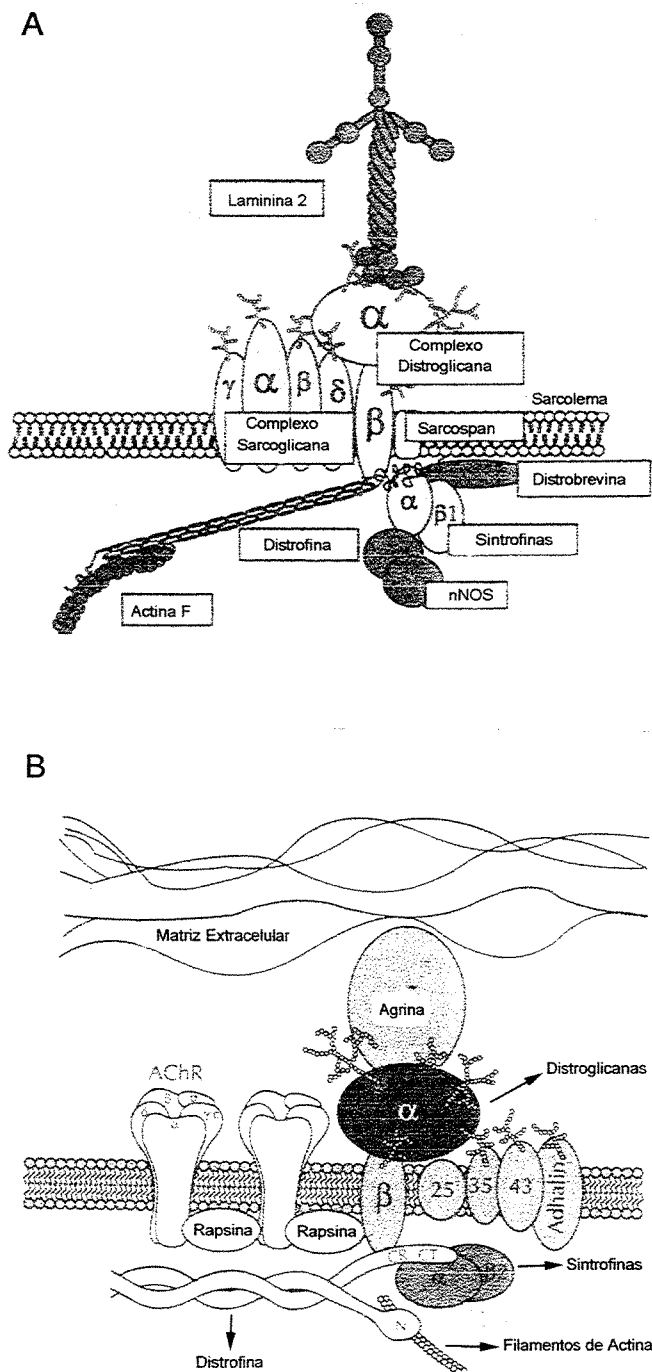


Figura 1 (A) Complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema juncional. Os componentes integrais do complexo estão indicados por elipses vazias e as proteínas que estão associadas a este complexo estão sombreadas. Adaptado de Lim e Campbell, *Curr. Op. Neurology*, 11 p. 443-452, 1998.

(B) Complexo distrofina-glicoproteínas na junção neuromuscular. CT: domínio carboxi terminal, CR: domínio rico em cisteína e N: domínio amino terminal. Adaptado de Sunada e Campbell, *Curr. Op. Neurology*, 8 p. 379-384, 1995.

O complexo distrofina-glicoproteínas conecta o citoesqueleto da fibra muscular (actina) à matriz extracelular (Campbell & Kahl, 1989; Ervasti & Campbell, 1991). Os componentes integrais deste complexo incluem a distrofina, que liga-se a F actina (Hoffman et al., 1987; Rybakova et al., 1996; Rybakova & Ervasti, 1997); a α -dystroglicana e β -dystroglicana, que encontram-se ligadas ao domínio G da laminina 2 e a uma parte da distrofina mais rica em cisteína (Jung et al., 1995), respectivamente; as syntrophinas, proteínas intracelulares que ligam-se ao terminal C da distrofina (Yang et al., 1995); uma proteína que apresenta quatro domínios transmembrana, denominada de sarcospan (Crosbie et al., 1997); e as sarcoglicanas (Nigro et al., 1996; Jung et al., 1996). O complexo de sarcoglicanas consiste de quatro proteínas transmembrana denominadas de α -sarcoglicana e δ -sarcoglicana, as quais estão ligadas a β -dystroglicana (Sunada & Campbell, 1995; Nigro et al., 1996; Jung et al., 1996). Em adição a laminina 2 e actina F, há evidências que a óxido nítrico sintase neuronal (Brenman et al., 1995) e uma proteína chamada distrobrevina (Blake et al., 1996; Sadoulet-Puccio et al., 1997) também interagem com os componentes do complexo distrofina-glicoproteínas (Figura 1 A).

Estudos com fibras musculares de pacientes portadores de DMD mostram que a deficiência de distrofina é acompanhada por perda de proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas (Ervasti et al., 1990). Conseqüente a isto, haveria uma ruptura da união entre o citoesqueleto da membrana e a matriz extracelular, o que levaria a desestabilização estrutural do sarcolema.

Considerando-se que a necrose das fibras musculares e a perda da capacidade de regeneração das mesmas são os fatores determinantes da morbidade e mortalidade na

DMD, entender os fatores que determinam mionecrose e ausência de regeneração são questões centrais nos estudos desta patologia.

Referente a gênese da lesão, várias hipóteses têm sido admitidas. Uma das mais aceitas é a de que a fragilidade estrutural do sarcolema levaria à lesões focais do mesmo, as quais permitiriam a entrada súbita e abundante de íons cálcio do meio extracelular para o sarcoplasma. Sabe-se que os íons cálcio participam da ativação da contração muscular e que seu controle ocorre através do bombeamento ativo nas membranas do retículo sarcoplasmático e pela bomba de cálcio do sarcolema. Frente a entrada súbita e abundante de íons cálcio extracelular, o bombeamento seria ineficaz provocando uma elevação da concentração deste íon dentro da célula. Isto resultaria na hipercontração das miofibrilas, lise dos lisossomos com liberação de enzimas, ativação de proteases e finalmente mionecrose (Engel et al., 1994).

De fato, o acúmulo de cálcio é um fator importante na evolução da degeneração muscular (Wrogemamm & Pena, 1976; Ebashi & Sugita, 1979). A hipótese de que a entrada de cálcio desempenha papel importante na origem da mionecrose é reforçada pelas observações de que a concentração de cálcio mostra-se elevada em biópsias de músculos de pacientes com DMD (Bodensteiner & Engel, 1978; Maunder et al., 1980; Jackson et al., 1985).

Outra hipótese para explicar a patogênese da mionecrose é a de que esta ocorra por apoptose. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que diversos aspectos compatíveis com apoptose, tais como aumento da concentração de cálcio intracelular, alterações de organelas intracelulares como condensação mitocondrial e fragmentação do retículo sarcoplasmático, são observados em fibras musculares distróficas. Interessante é que tais alterações precedem aquelas que caracterizam o processo de necrose. Estes achados somados à

fragmentação do retículo sarcoplasmático, observada nos primeiros estágios da doença, suportam a hipótese de que a gênese da lesão muscular observada na DMD não se deve a perda da capacidade de osmorregulação celular do cálcio (Tidball et al., 1995).

Menos conhecida são as razões pelas quais ocorre perda da capacidade regenerativa das fibras musculares. Várias hipóteses têm sido consideradas, entretanto duas delas têm sido mais aceitas. Uma refere-se a exaustão da capacidade mitótica das células satélites das fibras musculares, que são responsáveis pela atividade miogênica após repetidos ciclos de degeneração e regeneração (Webster & Blau, 1990; Rodrigues & Schmalbruch, 1995; Irintchev et al., 1997; Bockhold et al., 1998; Heslop et al., 2000). Outro fator responsável por este processo seria a fibrose intersticial, que constituiria uma barreira mecânica impedindo a migração das células satélites através do tecido conjuntivo, comprometendo, assim, o processo regenerativo (Itagaki et al., 1995; Bockhold et al., 1998).

2.2 MODELO ANIMAL PARA O ESTUDO DA DISTROFIA MUSCULAR

A deficiência de distrofina também ocorre em músculos de várias espécies animais, tais como cães, gatos e camundongos. Nos cães a doença parece ser mais severa e de evolução mais rápida que em humanos. Nos gatos, apesar da fibrose ser menos intensa a hipertrofia muscular é exagerada e com evolução geralmente fatal (Gasghen et al., 1992; Engel et al., 1994).

O camundongo, sem dúvida, representa a espécie animal mais empregada como modelo para a DMD. O conhecimento dos fenômenos biológicos envolvidos na DMD teve um grande avanço com o aparecimento do camundongo mutante *mdx* (x chromosome-linked muscular dystrophy), que originou-se de uma colônia de animais da linhagem C57BL/10, no Poultry Research Center, em Midlothian, Escócia. À semelhança das fibras musculares de portadores de DMD, as fibras musculares desses animais apresentam acentuada diminuição ou ausência de distrofina (Bulfield et al, 1984).

Logo após o aparecimento dos camundongos da linhagem *mdx* acreditou-se que eles teriam pouco valor como modelo animal para estudos da DMD (Dangain & Vrbova, 1984; Anderson et al., 1987, 1988). Vários fatores contribuíram para tal, uma vez que durante a vida apresentavam pouco ou nenhum sinal clínico da doença. Ao redor de 20 dias ocorreria um abrupto aumento da mionecrose a qual decresceria ao final de dois meses, e a partir daí a intensidade da mionecrose permanecia estável para o resto da vida do animal (Engel et al., 1994). Entretanto, após observações de que o músculo diafragma de camundongos *mdx* de 16 meses de idade, apresentavam alterações miopáticas semelhantes aos indivíduos portadores de DMD (Stedman et al., 1991), sugeriu-se que em alguns músculos não havia a suposta estabilização na evolução da doença.

Posteriormente, estudos clínicos e histopatológicos durante o envelhecimento demonstraram que os camundongos da linhagem *mdx* sofrem fraqueza muscular progressiva, com perda das fibras musculares, que são substituídas por tecido fibroadiposo, semelhante ao observado em pacientes portadores de DMD (Lefaucheur et al., 1995). Essas observações foram de fundamental importância pois restabeleceram definitivamente a validade do emprego dos camundongos *mdx* como modelo animal nos estudos da DMD.

Atualmente numerosos laboratórios empregam os camundongos da linhagem *mdx* para estudos de diversos aspectos da DMD tais como, patogênese das lesões (Pastoret & Sebillé, 1995; Tidball et al., 1995; Pasternak et al., 1995; Anderson et al., 1998), perda da capacidade regenerativa das fibras musculares (Itagaki et al., 1995; Irintchev et al., 1997; Bockhold et al., 1998; Zacharias & Anderson, 1991; Heslop et al., 2000) e investigação de novas terapias para DMD. Dentre estas, inclui-se a transferência de mioblastos (Pagel & Morgan, 1995; Fassati et al., 1997; Kong & Anderson, 2001; Camirand et al., 2001), de células tronco da medula óssea (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; Fletcher et al., 2000) e introdução de genes responsáveis pela expressão de distrofina (Fletcher et al., 2000; Wang & Xiao, 2000).

No Departamento de Anatomia/IB/Unicamp o camundongo *mdx* vem sendo empregado em estudos morfológicos para maior compreensão de aspectos da biologia da DMD (Pereira et al., 2001; Minatel et al., 2001).

2.3 BROTAMENTOS AXONAIS

Brotamentos axonais são expansões dos axônios intramusculares em resposta a diferentes estímulos, que acabam por formar novas terminações nervosas e em muitos casos novos contatos sinápticos (Purves & Lichtman, 1985).

Em geral, os diferentes estímulos que levam a formação de brotamentos representam situações em que há uma desnervação da fibra muscular. Em alguns casos,

trata-se de uma desnervação funcional induzida por agentes químicos, serve como exemplo disto a aplicação intramuscular de toxina botulínica. Esta toxina atua no mecanismo pré-sináptico da transmissão neuromuscular, inativando a sinaptobrevina, enzima responsável pela fusão das vesículas sinápticas que precede a incorporação das mesmas no axolema (Schiavo et al., 1992, Jessell & Kandel, 1993). Assim sendo, a acetilcolina contida nas vesículas não seria liberada na fenda sináptica, impedindo a ativação dos receptores de acetilcolina produzindo assim o bloqueio da transmissão neuromuscular.

Outro exemplo de indução de brotamento axonal por substâncias químicas refere-se a aplicação de α -bungarotoxina, um polipeptídeo extraído do veneno da *Bungarus multicinctus*, uma serpente asiática. Essa neurotoxina também leva à interrupção da transmissão neuromuscular por atuar no componente juncional pós sináptico. Embora não ocorra comprometimento na liberação da acetilcolina não há despolarização da membrana pós-sináptica, uma vez que a α -bungarotoxina combina-se seletiva e irreversivelmente com os receptores nicotínicos da acetilcolina, produzindo bloqueio não despolarizante dos mesmos (Chang & Lee, 1963; Changeux et al., 1992).

Outra maneira pela qual ocorre estímulo aos brotamentos axonais é a desnervação parcial de um determinado músculo através de esmagamento do nervo que a ele se dirige (Brown et al., 1981; Wernig & Herrera, 1986). Neste caso, aceita-se que as fibras musculares ao perderem sua inervação original, induzem um processo de reinervação, talvez reiterando um programa semelhante ao que ocorre no desenvolvimento normal, quando estas fibras são inervadas pela primeira vez (Van Mier et al., 1994. para revisão ver Brown, 1984).

O fato que fibras musculares em degeneração e em regeneração atuem como indutores de brotamentos axonais é juntamente com a desnervação, a forma que interessa ao presente trabalho.

Sabe-se que, independente do tipo de estímulo, as células de Schwann são fundamentais para que ocorram brotamentos axonais. Após a desnervação da fibra muscular a célula de Schwann passa a expressar, em níveis mais elevados, proteínas que funcionam como fatores de adesão e de crescimento axonal. Estes, que se encontram em baixas concentrações nos adultos, são expressos em grandes concentrações após desnervação (Sanes & Lichtman, 1999). Além disto, as células de Schwann parecem ser estimuladas por fatores extrínsecos a ela. Em todos os casos esses fatores parecem originar-se de uma situação comum: a desnervação do músculo.

Até o momento nenhum desses fatores foi definitivamente identificado. Algumas moléculas, contudo, apresentam-se como candidatas ao papel de estimular ou inibir a proliferação das células de Schwann. Entre elas destacam-se a NCAM, o CGRP e o NO.

A NCAM é uma glicoproteína transmembrana (Edelman, 1983), expressa na superfície de mioblastos, miotubos e axônios motores em desenvolvimento. Em músculos adultos a NCAM localiza-se exclusivamente na junção neuromuscular (Moscoso et al., 1995; Sanes & Lichtman, 1999). O eventual papel da NCAM na indução dos brotamentos axonais foi inicialmente proposto por Covault & Sanes (1985) e Moore & Walsh (1985), ao observarem que o bloqueio da transmissão neuromuscular, em músculos adultos, era acompanhado pelo aumento da expressão da NCAM ao longo da fibra muscular. Sabe-se hoje que animais transgênicos com a expressão elevada da NCAM apresentam um significativo aumento dos brotamentos axonais terminais (Walsh et al., 2000). O mecanismo através do qual a NCAM induz os brotamentos axonais não está claro, mas

provavelmente, ela atue como um segundo mensageiro, por aumentar o influxo de cálcio para o citoplasma (Walsh & Doherty, 1997).

O CGRP é um neuropeptídeo de baixo peso molecular, sintetizado no corpo do motoneurônio e transportado até o terminal motor da junção neuromuscular, onde encontra-se armazenado nas vesículas eletrodensas. Encontra-se também amplamente distribuído ao longo do sistema nervoso central. Os trabalhos iniciais sobre seu papel nos brotamentos axonais sugeriram que, o mesmo atuasse como um agente anti-brotamento (Tsujimoto & Kuno, 1988). Esse possível papel foi admitido após observações de que músculos bloqueados cronicamente com tetrodotoxina, uma situação em que se esperaria aumento dos brotamentos, ocorria uma supressão dos brotamentos axonais. Entretanto, diversos trabalhos posteriores sugeriram que, contrariamente a ação anti-brotamento, o CGRP atua como indutor dos brotamentos em resposta a desnervação. Mais recentemente essa hipótese foi demonstrada em animais transgênicos que expressam altos níveis de CGRP e intensos brotamentos axonais (Lu et al., 1999).

O NO (óxido nítrico), um radical livre gasoso, que sabidamente atua na musculatura lisa vascular, também atua sobre a célula de Schwann terminal durante o desenvolvimento da junção neuromuscular (Wang et al, 1995). O óxido nítrico é sintetizado a partir da arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (nNOS) cuja expressão está diminuída também nas células de Schwann terminais da junção neuromuscular de camundongos *mdx* (Pereira et al., 2001). Considerando-se que a célula de Schwann terminal desempenha papel central na gênese e na migração dos brotamentos axonais e que o NO possa ser um mediador da célula de Schwann (Son et al., 1996), essas observações sugerem que, ao menos nos músculos distróficos, a capacidade de brotamentos pode estar alterada.

Sob o ponto de vista morfológico ou mais precisamente de acordo com o local em que se originam, os brotamentos axonais são habitualmente classificados em três tipos: 1) brotamento nodal, quando nasce em um nó de Ranvier; 2) pré-terminal, quando origina-se distalmente ao último nó de Ranvier e, 3) ultraterminal, quando origina-se nos terminais motores. Para melhor compreensão ver figura 2.

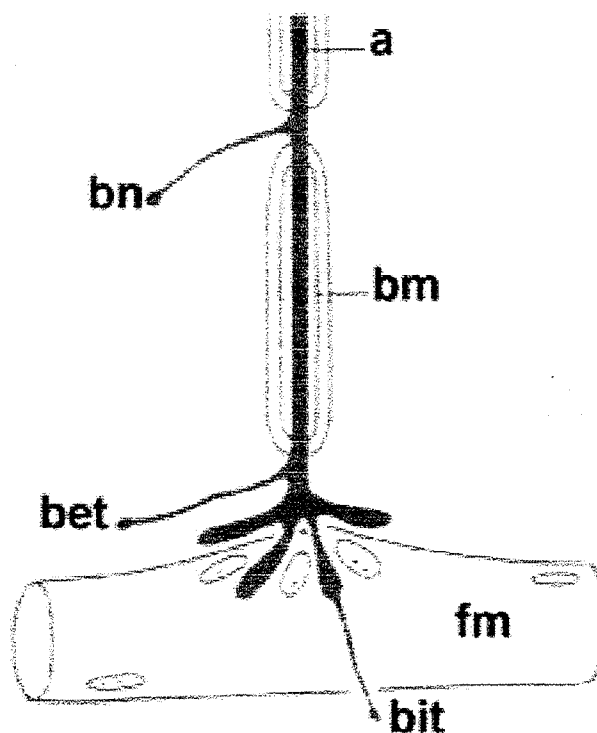


Figura 2. Esquema de uma junção neuromuscular com diferentes tipos de brotamentos axonais: bn: brotamento nodal; bet: brotamento extraterminal; bit: brotamento intraterminal; a: axônio; bm: bainha de mielina; fm: fibra muscular. Extraído de Kuno: The synapse; oxford Science publications, 1995 pag 124.

2.4 PRINCÍPIOS DA MICROSCOPIA CONFOCAL

O sistema confocal foi idealizado por Marvin Minsky, em 1957, durante seu estágio de pós-doutorado na Universidade de Havard (USA). Desde então, o sistema confocal vem sendo aperfeiçoado graças aos avanços tecnológicos que permitiram o uso de fontes de luz lasers, objetivas de maior resolução e de recursos computacionais mais eficazes para a aquisição e armazenamento de imagens.

O princípio óptico básico da microscopia confocal está ilustrado na figura 2. A lente focaliza a luz (emitida ou refletida) no detector (célula fotoelétrica). A íris ou pinhole (pequeno orifício posicionado no eixo do microscópio, em frente ao detector) impede que a luz proveniente de planos acima ou abaixo do plano de foco (linhas pontilhadas) atinja o detector. Somente a luz vinda de planos em foco (linhas contínuas) atravessa o pinhole e é detectada. Desta forma, o sinal proveniente de planos sem foco não contribuem para a formação da imagem, melhorando assim a resolução do microscópio (Lenzi et al, 1996). Os sinais captados pelo detector geram uma imagem digital do espécime em um monitor de computador.

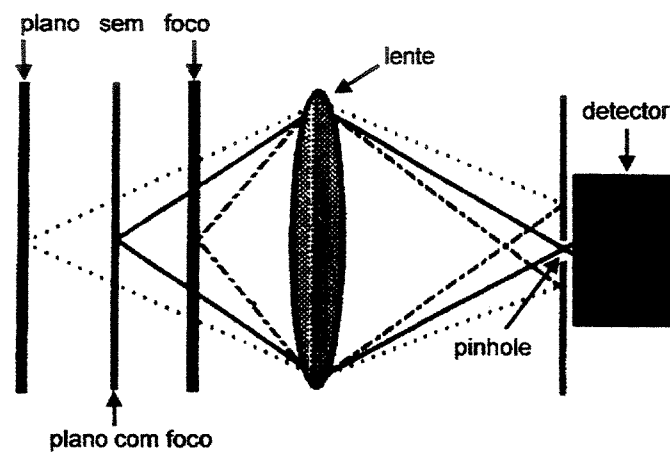


Figura 2. Princípio da microscopia confocal. Somente informações vindas de planos em foco são detectadas (linha contínua). Informações provenientes de planos acima ou abaixo do plano de foco são bloqueadas pelo pinhole e desta forma não são registradas pelo detector (linhas pontilhadas). Adaptado de Tekola et al., *Progress in Pathology*, p. 12-21, 1994.

O microscópio de varredura a laser confocal é produto do desenvolvimento de várias áreas, tais como a física e a computação. Inclui objetivas de grande abertura numérica, melhorando a resolução das imagens ópticas, com luz laser, processamento computacional de dados e computação gráfica (Lenzi et al., 1996).

A microscopia de varredura a laser confocal provocou verdadeira revolução na microscopia óptica de fluorescência. Permite, entre outros recursos, realizar tomografia e reconstruções tridimensionais de uma grande variedade de espécimes biológicos, em diferentes preparações (Lenzi et al., 1996). Permite também realizar cortes ópticos seriados de espessura variada (para junções neuromusculares são feitos cortes de 1,5 a 2 μm de espessura, em média) resultando em melhor resolução das imagens

2.5 MATERIAIS E MÉTODOS

Embora parte dos procedimentos já estejam incluídos no trabalho a ser submetido (em anexo), há necessidade de maior detalhamento da metodologia, o que não foi possível na versão a ser submetida, visto o espaço diminuto permitido pela revista (Neurosc. Letters).

2.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos, machos e fêmeas, adultos, das linhagens *mdx* e C57BL/10 (controle), provenientes do Biotério Central da Unicamp e mantidos no biotério

do Departamento de Anatomia, com ração e água à vontade e ciclo claro-escuro de 12h/12hs.

2.5.2 Procedimento para esmagamento do nervo

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura (1:1) de Ketamina (Francotar, Virbac) e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%, Virbac), dose de 1,5 ml/Kg de peso corporal, administrada por via intraperitoneal. Após completamente anestesiados, a face ventral do pescoço foi depilada sendo então realizada uma incisão na linha mediana, desde o ápice da mandíbula até a incisura esternal. A pele e as glândulas salivares submandibulares foram afastadas lateralmente e o músculo esternomastóide (STN) esquerdo exposto e seu nervo esmagado, a aproximadamente 4 mm de distância do ponto motor, com uma pinça de relojoeiro durante 30 segundos. O músculo STN contralateral foi utilizado como controle. Após sutura da ferida com fio de poliéster siliconizado n.º 4, os animais foram reconduzidos ao biotério do Departamento.

2.5.3 Procedimento Cirúrgico para retirada dos músculos esternomastóides (STNs)

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% por via intraperitoneal (0,2 ml/20 g de peso corporal). Após completamente anestesiados, foram fixados por perfusão intracardíaca com 20 ml de tampão fosfato (PBS; 14 g de fosfato de sódio monobásico, 4,3 g de fosfato de potássio bibásico anidro e 72 g de cloreto sódio em 1 litro

de água destilada, pH 7.5), seguido por 20 ml de fixador paraformaldeído a 2% em PBS. Ambos STNs foram expostos e após nova fixação *in situ* com paraformaldeído 2% por 10 minutos, foram lavados com PBS, retirados e presos pelas extremidades proximal e distal através de alfinetes entomológicos em cubas contendo Sylgard. Procedeu-se então a marcação dos receptores de acetilcolina (AChR) e terminais nervosos, conforme abaixo descrito.

2.5.4 Marcação dos receptores de acetilcolina e terminais nervosos

Os procedimentos foram realizados em laboratório climatizado à temperatura de 20°C. Os músculos foram incubados com glicina 0,1 M por 20 minutos em agitador orbital (Fanem 255-B), para inativação do fixador. A seguir, os músculos foram incubados com collagenase tipo I (Sigma), 1 mg/ml de água destilada, por 20 minutos em agitador, para desprendimento do tecido conjuntivo aderido aos músculos. Após lavagem em PBS, os músculos foram incubados com α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Tetramethylrhodamine α -bungarotoxin, Rh-BTx, Molecular Probes, 1:100 em PBS) por 30 minutos no agitador, para a marcação dos AChRs. Após lavagem em PBS, os músculos foram incubados com Triton X-100 1% (t-octylphenoxypolyethoxythanol, Sigma) durante 1 hora em agitador, para permeabilização do tecido. A seguir, os músculos foram incubados em solução bloqueadora (125 μ l de Triton X-100, 1 ml de Sero albumina Bovina- Sigma em 23,8 ml de PBS) no agitador, por 24 horas, com o objetivo de se bloquear ligações inespecíficas do anticorpo primário. A seguir, os músculos foram incubados por 12 horas

com anticorpo primário anti-neurofilamento (monoclonal anti-neurofilament 200, Sigma; 1:100 em solução bloqueadora) a 4 °C. Após lavadas com PBS por 30 minutos os músculos foram incubados por 3 horas com o anticorpo secundário anti-mouse IgG-fluoresceína (Sigma; 1:100 em solução bloqueadora) no agitador. Finalmente, após lavagem em PBS, os músculos foram montados inteiros em lâmina e lamínula em meio especial de montagem para fluorescência (DABCO- 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane, Sigma dissolvido em 800µl de água destilada, contendo 0,2 ml de Tris-HCL e 9 ml de glicerol). As lâminas foram observadas em sistema confocal da Bio-Rad (MRC 1024UV), equipado com laser Argônio-Kriptônio (Ar-Kr) e Ultra-Violeta (UV), acoplado a um microscópio de fluorescência Axiovert 100 (Zeiss).

2.5.5 Identificação e quantificação dos brotamentos axonais

Para a observação e quantificação dos brotamentos axonais, foi utilizado o sistema confocal Bio-Rad (MCR 1024UV), acoplado ao microscópio invertido Axiovert 100 da Zeiss. O comprimento de onda de 488 nm do laser AR-Kr foi utilizado para excitar a fluoresceína (observação dos terminais nervosos e brotamentos), enquanto o comprimento de onda de 568 nm foi utilizado para excitar a rodamina (observação dos AChRs). O software fornecido pelo fabricante (BioRad OS/2 e aquisitivos) em microcomputador Compaq, Pentium 150 MHZ, foi utilizado para o controle da aquisição e processamento das imagens. As teclas de contraste, brilho e diâmetro da íris foram ajustadas e mantidos os mesmos parâmetros durante todas as observações. Para cada junção examinada foram

obtidas secções ópticas de 1 a 2 μm de espessura, realizadas a partir do topo das dobras juncionais. As imagens ópticas obtidas foram armazenadas em disco óptico. Uma única imagem era construída a partir das secções ópticas, permitindo assim a observação de toda junção em um mesmo plano focal.

3. TRABALHO A SER SUBMETIDO AO NEUROSCIENCE LETTERS

Nerve terminal distribution and sprouting response at the neuromuscular junction of the *mdx* mice.

By Airton José Martins, Humberto Santo Neto, Elaine Minatel and Maria Julia Marques.

Dept. of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas (Unicamp),
Campinas, São Paulo, Brazil. 13084-971.

Correspondence should be sent to:

Maria Julia Marques

Dept. de Anatomia, Instituto de Biologia,

Unicamp, Campinas, SP Brazil,

13084-971

fax: 55-19-3289-3124

email: marques@obelix.unicamp.br

Key words: *mdx*, sprouting, neuromuscular junction, confocal microscopy

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a skeletal muscle disease caused by a defect in the dystrophin gene that affects 1 of every 3500 males born [4, 11]. The absence of dystrophin lead muscle fibers necrosis, resulting in a progressive muscle weakness that confine the patients to the wheelchairs and cause early death [4]. Because no remedy exists cell and gene therapy have been actively explored and provided to be an avenue for effective treating of DMD [5]. Cell mediated therapy aimed to restore dystrophin expression not only by fusing transplanted cells into the original dystrophic muscle fibers but also by forming new dystrophin positive muscle fibers. Therefore the success of cell therapy depends on the ability of newly formed muscle fibers to be reinnervated which in turn depends on the capacity of host axons to sprout.

Axonal sprouts are induced in the presence of degenerating and regenerating muscle fibers [12]. Since cycles of degeneration-regeneration occur in DMD and in the *mdx* mice, the animal model of DMD [2], the frequency of sprouts is expected to be higher in dystrophic than in non-dystrophic muscles. However, no axonal collateral sprouting has been observed in DMD patients [3] and no increase in the amount of pre and ultraterminal sprouting was observed in muscles of the *mdx* mice [7]. Furthermore, the neuronal oxide nitric synthase (nNOS) the enzyme responsible for nitric oxide production, which is thought to suppress polyneuronal innervation in muscle fiber [6], is greatly reduced in *mdx* muscles [10]. In the present we investigated, by using confocal microscopy, whether intramuscular nerve bundles and motor terminals of *mdx* mice nerves are able to sprout.

The sternomastoid (STN) muscles of adult (5-6 months) *mdx* mice (*mdx*; n=5) and C57Bl/10 (normal;n=5), were used. The animals were anesthetized with chloral hydrate (i.p.; 0.6mg/kg) and perfused intracardiacally with PBS followed by the fixative (4% paraformaldehyde in PBS). The STN muscle was used since the normal pattern of *AChRs*

distribution is well known for this muscle [1, 8, 9]. In addition, it is a thin and flat muscle suitable for whole mount preparation and observation on the confocal microscope [8]

The muscles were incubated with rhodamine-alpha-bungarotoxin (Rh-BTX; Molecular Probes, 1 µg/ml) for acetylcholine receptors labeling, followed by 0.1 M glycine (Sigma) and blocking solution (4% BSA, Sigma and 1% Triton X-100, Sigma, in PBS), overnight. Nerve terminals were labeled with the monoclonal anti-neurofilament 200 (Sigma, clone NE14; 1:500) and fluorescein-conjugated goat anti-Mouse IgG (Sigma, 1:500). The muscles were mounted in DABCO (Mounting media for fluorescence, Sigma).

Normal (n=5) and *mdx* mice (n=5) were anesthetized as described before and the nerve to the left STN was crushed. The contra-lateral side was used as control. After 8 days of nerve crush, left and right muscles were processed as above described for nerve terminal and *AChRs* observation at the confocal microscope. Normal and *mdx* muscles were processed identically and in parallel. Control slides for the primary antibody were made by incubation with blocking solution instead of the primary antibody. No stained structures were seen in these controls.

A Bio-Rad laser confocal system (MRC 1024UV) mounted on an Axiovert 100 Zeiss inverted microscope was used. The 488 nm line of the Ar-Kr laser was used to excite the fluorescein-labeled nerve terminal and the 568 nm line was used to excite the rhodamine-labeled receptors. Manufacturer-supplied software (OS/2) running on a Compaq Pentium 150 MHz computer was used to control image acquisition and processing. The settings of contrast, brightness and iris diameter were adjusted and kept the same during all observations, for controls and *mdx* muscles. For each endplate studied, we obtained 1.00-2.00 µm thick optical sections from bottom to top of the endplate. Each optical section was

then added to a stack of images using the BioRad Data Processing software. A single image was then built that allowed us to observe the whole endplate with all its branches within the same focus plane.

In non-crushed *mdx* mice, we observed extra-terminal sprouts in 25% of the neuromuscular junctions studied (Table 1). At most of the endplates studied (85%), nerve terminals displayed bulbous enlargements at their tips, in direct apposition to central dark or fainter areas within the islands of acetylcholine receptors (Figure 1). Since these bulbs were filled with the anti-neurofilament antibody and make direct apposition to areas lacking receptors, they were considered as intraterminal sprouting. Interestingly, this pattern of nerve terminal distribution is very similar to that seen in the NCAM-transgenic mice. These mice express a GPI-anchored NCAM isoform and show a significant increase in the complexity of the neuromuscular junction as a result of extensive intraterminal sprouting [13]. The nerve terminal pattern of distribution seen in these animals supports our suggestion that the boutons-like swellings observed in the *mdx* are intraterminal sprouts. In addition, this is in agreement with the fact that regenerating muscle fibers induce sprouting of undamaged nerve terminals probably by releasing sprout-inducing signals [12]. Considering that NCAM is present at high levels on immature myofibers [13], it would be possible that NCAM expression is up-regulated in regenerated dystrophin-deficient fibers, leading to the extensive intraterminal sprouting observed here, but further studies are needed to confirm this hypothesis.

In crushed-*mdx* mice, extra-terminal sprouts were seen in 73% of the dystrophic endplates studied, representing a 48% increase in the sprout response compared to that seen in the non-crushed *mdx* mice (Table 1). In crushed-controls, extraterminal sprouts were seen in about 41% of the endplates (Table 1). These findings demonstrate that *mdx* nerve

terminals retain their ability to sprout when a second stimulus, such as nerve lesion (in addition to muscle degeneration-regeneration), is added.

Recently, great efforts are made to develop efficient cell and gene mediated-therapies, providing the dystrophic muscle with normal muscle fibers, that no longer will suffer degenerative changes. However, little attention has been given to the fact that these new fibers need to be properly reinnervated, otherwise they will not grow and function normally. In this context, the present results showing that *mdx* nerve fibers are able to sprout are of relevance, specially if we consider the different capacities of reinnervation of intraterminal, extra-terminal and nodal sprouts.

Following muscle fiber degeneration, terminal Schwann cells with their respective motor terminal remain attached to the molecules of the junctional basal lamina [12], which are considered clues to reinnervation. Thus, when a given muscle fiber regenerates, it is mainly reinnervated by intraterminal sprouts from its original motor terminal. If we consider that in cell-mediated therapy there is formation of new muscle fibers, in addition to fusion with old ones, the basal lamina of these new fibers would not have clues to the reestablishment of innervation. Under this circumstance, nodal sprouts, which were not seen in the *mdx* in the normal course of the disease, seem to be more efficient to reinnervate the fiber [12]. In addition, extra-terminal and intraterminal sprouts would not be enough to reinnervate the newly forming muscle fibers. Taking together, these data lead us to speculate that the absence of nodal sprouts in the *mdx* mice may explain, at least in part, the unsuccessful of cell-mediated therapy, as already reported. On the other hand, the presence of extra-terminal and intraterminal sprouts are of great significance to the full functional recovery of an entire dystrophic muscle after gene therapy [5], since with this method

mostly of the muscle fibers are replaced by normal ones, with its original basal lamina in place.

In conclusion, the present investigation shows that *mdx* nerve fibers are able to sprout, not only during the normal course of the disease, probably in response to the signals from regenerated muscle fibers, but also after a nerve lesion. This finding is of relevance, considering the cell-mediated and gene therapies evolved to treat dystrophy and the necessity to properly restore muscle fiber innervation.

REFERENCES

- [1] Balice-Gordon, R.J, Lichtman, J.W. In vivo observations of Pre-and Postsynaptic changes during the transition from Multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J. Neurosci.*, 13, p. 834-855, 1993.
- [2] 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*, 81, p.1189-1192.
- [3] Coers, C.; Telerman-Toppet, N. Morphological changes of motor units in Duchenne's muscular dystrophy. *Arch. Neurol.*, 34, p. 396-399, 1977.
- [4] Engel, A.G.; Yamamoto, M.; Fischbeck, K.H. Dystrophinopathies. In Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. **Miology (vol. 2)**. USA: McGraw-Hill, p. 1130-1187, 1994.

- [5] Fletcher, S.; Wilton, S.D.; Howell, McC. Gene therapy and molecular approaches to the treatment of hereditary muscular disorders. *Curr. Opin. Neurol.*, 13, p.553-560, 2000.
- [6] Jessell, T.M; Kandel, E.R. Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell*, 72, p. 1-30, 1993.
- [7] Lyons PR, Slater CR (1991). Structure and function of the neuromuscular junction in young adult *mdx* mice. *J. Neurocytol.* 20:969-981.
- [8] Marques MJ, Santo Neto H. (1998) Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *J Anat* 192: 425-430.
- [9] Minatel E, Santo Neto H, Marques MJ (2000) Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers. *Muscle and Nerve* 24: 410-416.
- [10] Pereira ECL, Santo Neto H, Marques MJ (2001). Immunolocalisation of neuronal nitric oxide synthase at the neuromuscular junction of *MDX* mice: a confocal microscopy study. *J Anat* 198: 663-671.

- [11] Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. Science 244:1578-1580.
- [12] Van Mier P, Lichtman JW (1994) Regenerating muscle fibers induce directional sprouting from nearby nerve terminals: studies in living mice. Journal Neurosci 14: 5672-5686.
- [13] 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. Molecular and Cellular Neuroscience 15: 244-261 (2000).

Acknowledgments: The authors wish to thank Prof. Mayana Zatz for the *mdx* mice. This work was supported by FAPESP (95/6110-2; 95/6956-9) and CNPq (301053/91).

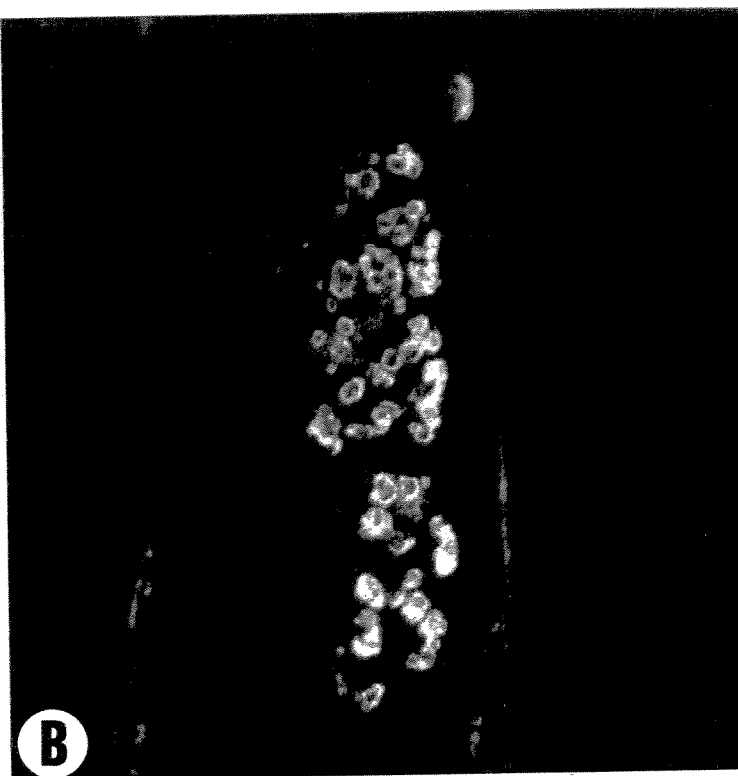


FIGURE LEGEND

Figure 1. Nerve terminals (A) and *AChRs* (B) distribution in *mdx* mice. Note Bulbous enlargements at the tips of thin nerve terminals filaments. Scale bar: 7 μ m

AChRs are in islands of receptors, characterized by a brighter outline and a fainter area in the center. Scale bar: 7 μ m

In C, nerve terminal (green) and receptors (red) of the same neuromuscular junction were merged to show that bulbs are, generally, in direct apposition to the central fainter areas of receptors. Scale bar: 7 μ m.

Table 1. Number (%) of *mdx* and control (C57Bl/10) neuromuscular junctions showing extra-terminal, intraterminal and nodal sprouts.

	Total number of nmjs	extra-terminal number of nmj (%)	Intraterminal number of nmj (%)	Nodal sprout
Non-crushed <i>mdx</i>	132	33 (25%)	114(85%)	0
Crushed <i>mdx</i>	45	33 (73%)	37(83%)	6 (13%)
Non-crushed C57Bl/10	63	1 (1.5%)	0 %	0
Crushed C57Bl/10	46	19 (41%)	0 %	6 (13%)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo observamos uma frequência de 25% na incidência de brotamentos axonais extraterminais e de 85% de intraterminais nas junções neuromusculares dos camundongos *mdx* não operados (Fig. 4), enquanto que nos camundongos da linhagem C57BL/10 não operados (fig. 5) a frequência foi respectivamente de 1,5% e 0%. Considerando-se que os camundongos distróficos apresentam ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares (Bulfield et al, 1984), e que isto atua como estímulos para brotamentos axonais (Vam Mier e Lichtman, 1994) este aumento de certa forma era esperado.

Interessante é que o aumento da incidência de brotamentos axonais nos animais *mdx*, não está de acordo com as observações de Lyons e Slater (1991), uma vez que estes não encontraram diferença significativa do número de brotamentos, pré e ultra-terminais, ao compararem camundongos *mdx* e C57BL/10. Razões para tais diferenças não estão claras, mas alguns pontos poderiam justificá-las.

O primeiro refere-se ao fato de que a intensidade de brotamentos axonais pode diferir de acordo com a idade e entre diferentes músculos de um mesmo animal (Werning & Herrera, 1986). O segundo ponto refere-se as diferentes metodologias empregadas neste e naquele trabalho. Embora as técnicas argênticas utilizadas na marcação dos terminais nervosos permitam boa resolução e confiabilidade, sendo assim universalmente empregadas, é possível que a microscopia confocal ofereça melhores condições na identificação de brotamentos de pequena dimensão. Na impregnação argêntica a estrutura marcada é a bainha de mielina, que durante o crescimento inicial do axônio pode estar pouco desenvolvida. No presente trabalho o axônio foi marcado com anticorpo monoclonal para neurofilamento, permitindo assim a marcação de axônios de pequeno diâmetro, inclusive do cone de crescimento. O terceiro e mais provável é o fato de que pequenos

botões terminais dilatados (Ver fig 4), foram aqui considerados como brotamentos intraterminais, ao passo que no trabalho de Lyons & Slater não o foram. A decisão em considerar as estruturas acima descritas como brotamentos intraterminais, contudo, fundamenta-se em trabalhos mais recentes realizados pelos mesmos autores (Walsh et al., 2000). Também, o uso da microscopia confocal de fluorescência permite-nos assim proceder. Ela apresenta a vantagem de permitir a sobreposição de componentes pré e pós sinápticos de uma mesma junção neuromuscular. Quando analisadas no comprimento de onda que estimula a fluoresceína, observa-se os terminais nervosos que devem sobrepor-se a imagem dos receptores de acetilcolina que são obtidas pela estimulação da rodamina. Nos casos em que consideramos brotamentos intraterminais não havia uma perfeita sobreposição entre o axônio e os receptores de acetilcolina (ver figura 4), caracterizando-se assim um brotamento axonal intraterminal.

Interessa-nos o fato de que, nos animais *mdx* que não sofreram esmagamento, há alta frequência de brotamentos intraterminais ou seja, a presença de terminais nervosos não coincidentes com áreas de receptores. Este padrão de distribuição do terminal nervoso assemelha-se em muito àquele visto em junções neuromusculares de camundongos transgênicos, cujas fibras musculares que expressam níveis elevados de NCAM. As junções neuromusculares desses camundongos mostram-se mais complexas como resultado de extensos brotamentos intraterminais (Walsh et al., 2000). Este padrão de distribuição sustenta a idéia de que fibras musculares em regeneração induzem brotamentos axonais em terminais nervosos intactos, provavelmente pela liberação de sinais indutores de brotamentos (Van Mier & Lichtman, 1994). Considerando-se que a NCAM também está presente em níveis elevados em fibras musculares em regeneração (Walsh et al, 2000), uma possibilidade é que também a expressão de NCAM esteja aumentada em fibras distróficas

regeneradas, sendo assim responsável pelo extenso brotamento intra terminal. Caso isto seja verdadeiro, poderia-se sugerir a partir dos nossos achados, que as fibras musculares distróficas não seriam deficientes na produção de um dos fatores tido como indutores de brotamentos axonais. Para a confirmação desta hipótese serão necessários estudos adicionais, utilizando-se marcadores da NCAM nos animais distróficos.

O fato de termos encontrado aumento do número de brotamentos nos animais distróficos em relação aos camundongos C57BL/10, não nos permite concluir se há ou não de fato diminuição dos brotamentos axonais, já que conforme ponderamos anteriormente a presença destes é esperada como resposta à presença de fibras musculares em degeneração e regeneração. Por isto, acrescentamos um estímulo adicional que ao ser aplicado tanto nos camundongos *mdx* como nos C57BL/10, estimulasse a ocorrência de brotamentos, permitindo desta maneira uma comparação mais fiel e avaliação quantitativa. O estímulo utilizado foi o da desnervação dos músculos esternomastóideos, através do esmagamento de sua inervação.

É bem conhecido o fato que diferentes procedimentos atuam estimulando o aparecimento de brotamentos axonais. Servem como exemplo a toxina botulínica e α -bungarotoxina que impedem por diferentes mecanismos a transmissão neuromuscular. Embora injeções locais de toxina botulínica produzam extensos brotamentos dos terminais motores, esses brotamentos eventualmente formam junções neuromusculares ectópicas com as fibras musculares funcionalmente desnervadas (Duchen Strich, 1968) o que poderia prejudicar a nossa avaliação. Por outro lado, o emprego da α -bungarotoxina que, ao ligar-se seletivamente aos receptores de acetilcolina poderia comprometer a eficácia do processo de marcação dos receptores de acetilcolina que também se utiliza da α -bungarotoxina

conjugada a rodamina. Outra razão para adotarmos o esmagamento é que o mesmo vem sendo rotineiramente empregado em nosso laboratório como modelo de estímulo ao brotamento axonal.

Nossas observações mostraram que oito dias após o esmagamento nos camundongos *mdx* (Fig. 6), a frequência dos brotamentos axonais do tipo extraterminal foi de 73% e de intraterminal foi de 83%, enquanto nos camundongos C57BL/10 (Fig. 7) foram respectivamente de 41% e 0%. Esses resultados permitem duas considerações que estão diretamente relacionadas ao objetivo geral deste trabalho.

A primeira refere-se a maior frequência de brotamentos do tipo extraterminal nos animais *mdx* quando comparadas ao C57BL/10. Ao nosso ver o aumento da frequência não representa efetivamente aumento na capacidade de brotamento, pois excetuando-se a presença da degeneração e regeneração das fibras musculares não haveria razão para que fibras musculares distróficas estimulassem os brotamentos. Da mesma forma, até onde é sabido não existem fatores intrínsecos aos axônios que possam fazer isto. Dessa maneira, nossa interpretação é que o aparente aumento na capacidade de brotamento nos animais distróficos deve-se à presença simultânea de dois estímulos indutores de brotamentos: o esmagamento do nervo e as fibras em degeneração e regeneração. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que se subtrairmos a frequência de brotamentos extraterminais (25%) observada no curso normal da doença (sem esmagamento) nos camundongos *mdx*, daquela observada após o esmagamento do nervo (73%) teremos uma frequência de 48% que se aproxima da frequência observada no camundongo C57BL/10 (41%) onde somente o estímulo provocado pelo esmagamento do nervo está presente. Mais interessante entretanto é o fato de que não há diminuição dos brotamentos.

A segunda refere-se aos brotamentos do tipo intraterminal. Observamos que não há diferença significativa entre os animais *mdx* sem esmagamento (85%) e com esmagamento do nervo (83%). Além disto, eles não foram observados em junções de camundongos C57BL/10 mesmo quando submetidos ao esmagamento do nervo. Esses achados reforçam a idéia de que a capacidade de brotamento está mantida nos animais distróficos e sugerem fortemente que os mecanismos que controlam esse tipo de brotamento deve-se mais a fatores relacionados a fibra muscular que ao componente nervoso propriamente dito, uma vez que não aparecem após esmagamento do nervo em camundongos C57BL/10. É possível que o estímulo a esse tipo de brotamento seja originado pela fibra muscular em regeneração, o que reforça a idéia que esse sinal molecular possa ser a NCAM produzida pela fibra em regeneração. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que brotamentos do tipo intraterminal são observados em fibras musculares regeneradas (Minatel, comunicação pessoal) e naquelas que expressam grande quantidades de NCAM (Walsh et al, 1999).

Outro achado relevante é o fato de brotamentos nodais não terem sido observados durante o curso normal da doença, embora houvesse a expectativa de que isto pudesse ocorrer pois a presença de fibras musculares em degeneração e regeneração nos camundongos *mdx* atuariam como estímulo para brotamento. O fato de não termos observado esse tipo de brotamentos deve ser interpretado como incapacidade real de produção dos mesmos durante o curso da doença, e não somente como ausência decorrente do aumento de fibrose intersticial a qual sabidamente pode atuar como um fator físico que obstrui o crescimento dos mesmos (Gutmann & Young, 1944). O que nos permite essa interpretação é o fato que quando o nervo é esmagado, uma situação em que também há

fibrose intersticial, a presença de brotamentos do tipo nodal foi observada, inclusive sem diferença significativa daquela observada para os camundongos C57BL/10.

Ao nosso ver a ausência de brotamentos nodais durante o curso da doença explicaria-se pelo fato que para que isto ocorra há necessidade de lesão da célula de Schwann tal como ocorre no esmagamento. De fato tem sido postulado que os estímulos responsáveis pelos brotamentos axonais nodais e aqueles intra e extraterminais, diferem entre si. Enquanto o estímulo mais importante para a indução de brotamentos nodais seria lesão da célula de Schwann não terminal (Wernig & Herrera, 1986), aqueles para os brotamentos extra e intraterminais seriam moléculas situadas ou liberadas ao nível da fibra muscular na junção neuromuscular.

Embora, neste trabalho, os achados tenham sido obtidos em camundongos, eles parecem não estar em desacordo com aqueles da literatura, que relatam a ausência de brotamentos axonais durante o curso da DMD, em Humanos (Coers et al., 1977) e também com aqueles que atestam a manutenção da capacidade de emitir brotamentos quando estimulados .

Embora grandes esforços venham sendo feitos no desenvolvimento de terapias genéticas e celulares para o tratamento de DMD, pouca atenção vem sendo dispensada ao fato que estas novas fibras musculares necessitam ser reinervadas para o restabelecimento da função muscular. Neste particular, os resultados aqui apresentados, mostrando a manutenção da capacidade de brotamento axonais dos animais distróficos *mdx* podem ser relevantes.

A terapia celular inclui o transplante de mioblastos e a transferência de células da linhagem tronco da medula óssea (Pagel & Morgam, 1995; Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999). Nesses casos além da transformação das fibras distróficas em fibras distrofina

positivas, ocorre principalmente a formação de novas fibras musculares. Embora a literatura demonstre claramente o sucesso em transformar as fibras distróficas em fibras musculares saudáveis, não há registros de que nesses casos ocorra uma efetiva recuperação da função muscular. Nossos resultados permitem sugerir que esta modalidade de terapia apresenta de fato dificuldade na recuperação da função muscular, o que se explicaria da seguinte maneira.

Sabe-se que os brotamentos do tipo extraterminal e principalmente os do tipo intraterminal restringem-se exclusivamente à região juncional e para-juncional da fibra muscular. Assim, a reinervação das novas fibras musculares, a partir do transplante de mioblastos e de células tronco exigiria que brotamentos axonais estendessem-se desde o feixe axonal intra muscular principal ou na melhor das hipóteses desde o axônio extra terminal. Esse cenário exigiria, portanto, a possibilidade de que durante o curso normal da doença houvesse a presença de brotamentos axonais do tipo nodal, os quais não estão presentes nessa situação.

Por outro lado, nossos resultados permitem sugerir que as terapia gênicas teriam maior chance de sucesso a medida em que as fibras musculares tornar-se-iam inervadas com maior facilidade, o que se explicaria da seguinte forma.

Após a degeneração da fibra muscular, células de Schwann terminais com seu respectivo terminal nervoso permanecem fixos às moléculas da membrana basal juncional (Sanes & Lichtman, 1999). Assim sendo, a simples substituição de uma fibra muscular distrófica para uma fibra distrofina positiva implicaria na manutenção da célula de Schwann e do terminal nervoso no sítio juncional original. Entende-se assim, que a presença de brotamentos intra e extraterminais do terminal motor, seriam suficientes para a

reinervação da fibra geneticamente modificada, assegurando a recuperação funcional do músculo.

Figura 4 Junções neuromusculares de camundongos *mdx* sem esmagamento do nervo. Em verde, axônios pré-terminais e terminais marcados com anticorpos para neurofilamento. Em vermelho, AChRs. Notar a presença de brotamentos intraterminais (setas maiores) e de brotamentos extraterminais (setas menores). Notar ainda a ausência de brotamentos nodais. Escala A,B,C: 12µm; D: 7 µm.

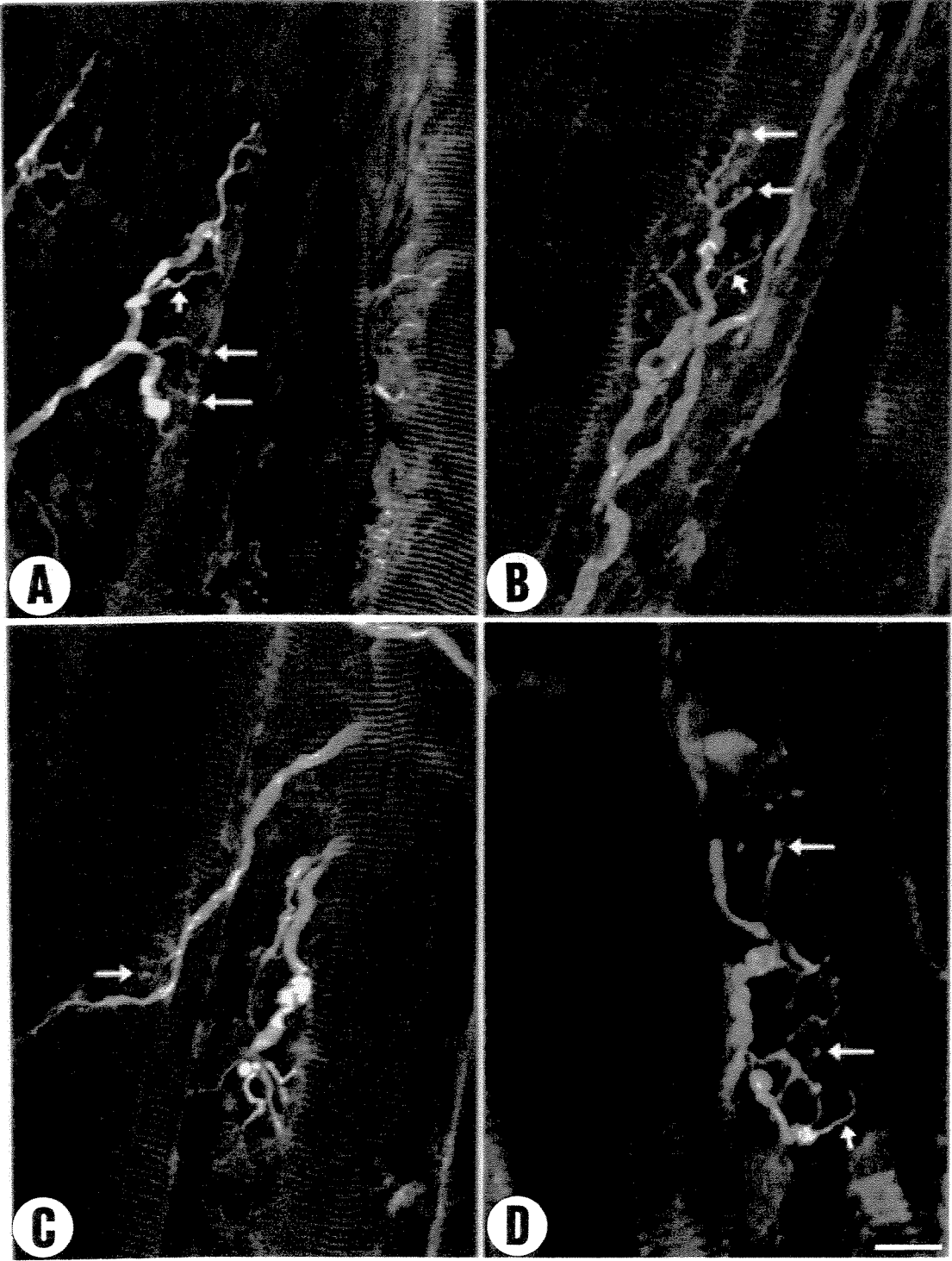


Figura 5 Junções neuromusculares de camundongos C57BL/10. Notar a sobreposição dos terminais nervosos (em verde) e os AChRs (em vermelho) característico na junção normal com ausência de brotamentos. Escala: 10µm.

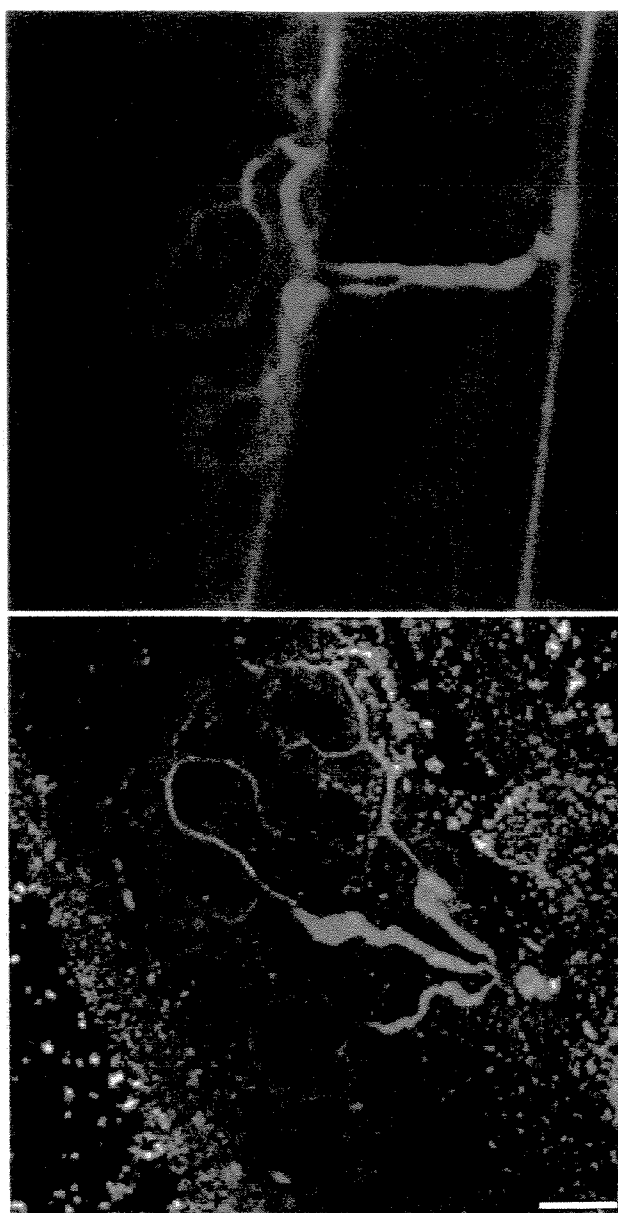


Figura 6 Junções neuromusculares de camundongos *mdx* com esmagamento do nervo. Brotamentos axonais do tipo extraterminal (**setas**). Na figura B, aumento do painel inferior, observa-se um brotamento (*), que se dirige a outra junção (figura C). Escala: A e C: 20µm, B: 10µm.

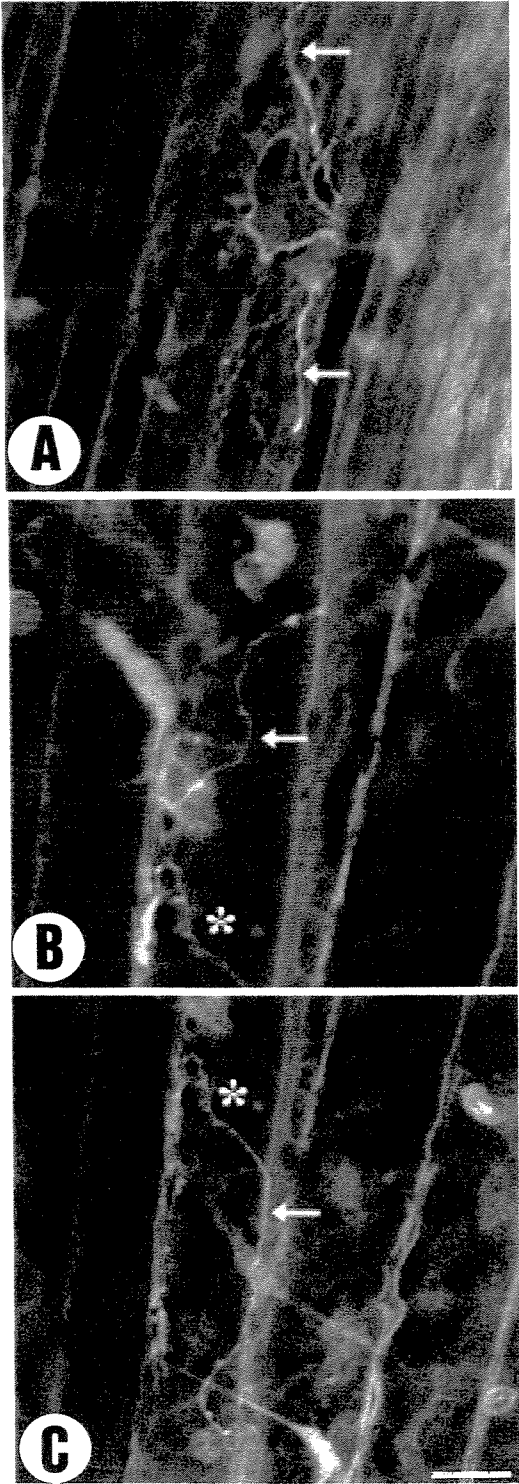
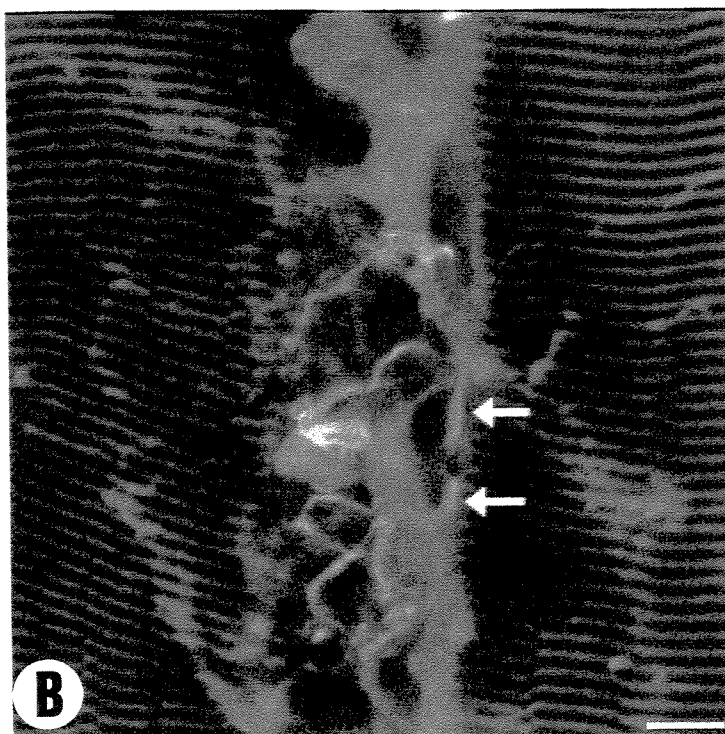
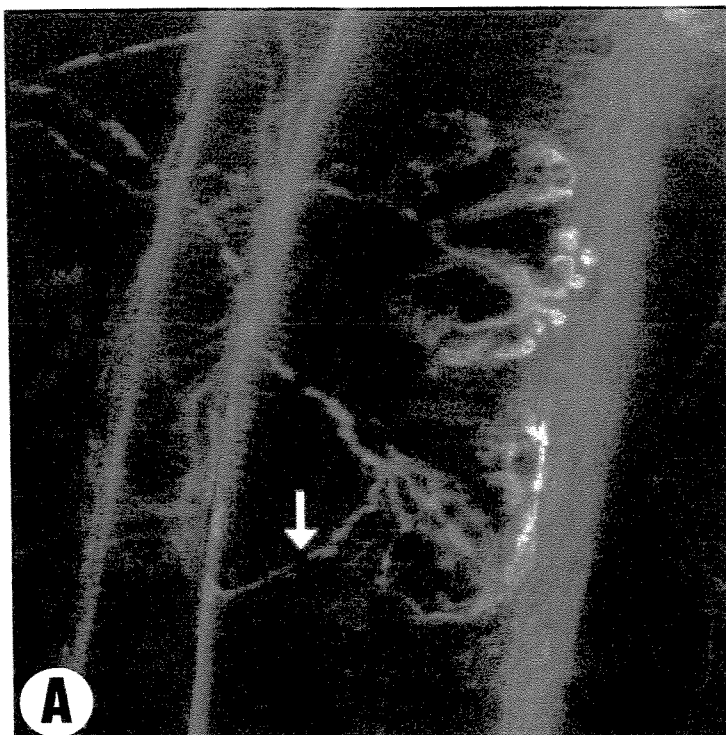


Figura 7 Junção neuromuscular de camundongo C57BL/10, com esmagamento do nervo. Brotamentos axonais do tipo extraterminal (**setas**). Escala: 10 μ m.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anderson, J.E.; Ovalle, W.K.; Bressler, B.H. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the *mdx* mouse. *Anat. Rec.*, 219, p. 243-257, 1987.

Anderson, J.E.; Garret, K.; Moor, A.; McIntosh, L.; Penner, K. Dystrophy and myogenesis in the *mdx* diaphragm. *Muscle Nerve*, 21, p. 1153-1165, 1998.

Blake, D.J.; Tinsley, J.M.; Davies, K.E. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.*; 6, p. 37-57, 1996.

Bockhold, K.J.; Rosenblatt, J.D.; Partridge, T.A. Aging normal and dystrophic mouse muscle: Analyses of myogenicity in cultures of living single fibers. *Muscle & Nerve*, p. 173-183, 1998.

Bodensteiner, J.B.; Engel, A.G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: A study of 567.000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology (Minneap)*, 28, p. 439-446, 1978.

Bonilla, E.; Samit, C.E.; Miranda, A.F.; Hays, A.P.; Salviati, G.; DiMauro, S.; Kunkel, L.M.; Hoffman, E.P.; Rowland, L.P. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, 54, p. 447-452, 1988.

Brenman, 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*, 82, p. 743-752, 1995.

Brown, M.C.; Holland, R.L.; Hopkins, W.G. Motor nerve sprouting. *Annu. Rev. Neurosci.*, 4, p. 17-42, 1981

Brown, M.C.; Holland, R.L.; Hopkins, W.G. Motor nerve sprouting. *Annu. Rev. Neurosci.*, 4, p. 17-42, 1984.

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*, 81, p. 1189-1192, 1984.

Camirand, G.; Caron, N.J.; Asselin, I.; Tremblay, J.P. Combined immunosuppression of mycophenolate mofetil and FK506 for myoblast transplantation in *mdx* mice. *Transplantation*, 72, p. 38-44, 2001.

Campbell, K.P.; Kahl, S.D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 338, p. 259-262, 1989.

Chang, C.C.; Lee, C.Y. Isolation of neurotoxins from the venons of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch. Int. Pharmacodyn*, 144, p. 241-257, 1963.

Changeux, J.P.; Galzi, J.L.; Devillers-Thiéry, A.; Bertrand, D. The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity and site-directed mutagenesis. *Quart. Rev. Biophys.*, 25, p. 395-432, 1992.

Coers, C.; Telerman-Toppet, N. Morphological changes of motor units in Duchenne's muscular dystrophy. *Arch. Neurol.*, 34, p. 396-399, 1977.

Covault, J.; Sanes, J.R. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralysed skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, p. 4544-4548, 1985.

Crosbie, R.H.; Heighway, J.; Venzke, D.P.; Lee, J.C.; Campbell, K.P. Sarcospan, the 25 Kda transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex, *J. Biol. Chem.*, 272, p. 31221-31224, 1997.

Dangain, J.; Vrbova, G. Muscle development in *mdx* mutant mice. *Muscle Nerve*, 7, p. 700-704, 1984.

Duchen, L.W.; Strich, S.J. The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. *Q. J. Exp. Physiol.*, 53, p. 84-89, 1968.

Ebashi, S.; Sugita, H. The role of calcium in physiological and pathological processes of skeletal muscle. In: Aguayo A.J., Karpatis, G., eds. **Current topics in nerve and muscle research**. Amsterdam: *Excerpta Medica*, ICS No 445, p. 73-84, 1979.

Edelman, G.M. Cell adhesion molecules. *Science*, 219, p. 450-457, 1983.

Engel, A.G.; Yamamoto, M.; Fischbeck, K.H. Dystrophinopathies. In Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. **Miology (vol. 2)**. USA: McGraw-Hill, p. 1130-1187, 1994.

Ervasti, J.M.; Ohlendieck, K.; Kahl, S.D.; Gaver, M.G.; Campbell, K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex dystrophic muscle. *Nature*, 345, p. 315-319, 1990.

Ervasti, J.M.; Campbell, K.P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66, p. 1121-1131, 1991.

Fassati, A.; Wells, D.J.; Serpente, P.A.S.; Walsh, F.S.; Brown, S. C.; Strong, P.N.; Dickson, G. Genetic correction of dystrophin deficiency and skeletal muscle remodeling in adult *mdx* mouse via transplantation of retroviral producer cells. *J. Clin. Invest.*, 100, p. 620-628, 1997.

Ferrari, G.; Angelis, G.C.; Coletta, M.; Paolucci, E.; Stonaiuolo, A.; Cossu, G.; Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279, p. 1528-1530, 1998.

Fletcher, S.; Wilton, S.D.; Howell, McC. Gene therapy and molecular approaches to the treatment of hereditary muscular disorders. *Curr. Opin. Neurol.*, 13, p. 553-560, 2000.

Gasghen, E.R.; Hoffman, E.P.; Gorospe, J.R.; Uhl, E.W.; Senior, D.F.; Cardinet, G.H.; Pearse, L.K. Dystrophy deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurol. Sci.*, 110, p. 149-153, 1992.

Gussoni, E.; Soneoka, Y.; Strickland, C. D.; Buzney, E.A.; Khan, M.K.; Flint, A. F.; Kunkel, K.M.; Mulligan, R.C. Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401, p. 390-394, 1999.

Gutmann, E.; Young, J.Z. The reinnervation of muscle after various periods of atrophy. *J. Anat.*, 78, p. 78, 1944

Heslop, L.; Morgan, J.E.; Patridge, T.A. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J. Cell Sci.*, p. 2299-2308, 2000.

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

Irintchev, A; Zweyer, A; Wernig, A. Impaired and structural recovery after injury in dystrophic *mdx* mice. *Neuromuscular Disorders*, 7, p. 117-125, 1997.

Itagaki, Y; Saida, K; Iwamura, K. Regenerative capacity of *mdx* mouse muscles after repeated applications of myo-necrotic bupivacaine. *Acta Neuropathol.*, 89, p. 380-384, 1995.

Jackson, M.J.; Jones, D. A.; Edwards, R.H.T. Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta*, 147, p. 215-221, 1985.

Jessell, T.M; Kandel, E.R. Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell*, 72, p. 1-30, 1993.

Jung, D.; Yang, B.; Meyer, J.; Chamberlain, J.S.; Campbell, K.P. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan. *J.Biol. Chem.*, 270, p. 27305-27310, 1995.

Jung, D.; Duclos, F.; Apostol, B.; Straub, V.; Lee, J.C.; Allamand, V.; Venzke, D.P. Sunada, Y.; Moomaw, C.R.; Leveille, C.J.; Slaughter, C.A.; Crawford, T.O.; McPherson, J.D.; Campbell, K.P. Characterization of δ -sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol. Chem.*, 271, p. 32321-32329, 1996.

Kong, J.; Anderson, J.E. Dynamic restoration of dystrophin to dystrophin-deficient myotubes. *Muscle & Nerve*, 24, p. 77-88, 2001.

Lefaucheur, J.P.; Pastoret, C.; Sebillle, A. Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. *Anat. Rec.*, 242, p.70-76, 1995.

Lenzi, H.L.; Pelajo-Machado, M.; Vale, B.S.; Panasco, M.S. Microscopia de varredura laser confocal: Princípios e aplicações biomédicas. *NewsLab*, 16, p. 62-71, 1996.

Lu, J.T.; Son, Y.; Lee, J.; Jetton, T.L.; Shiota, M.; Moscoso, L.; Niswender, K.D.; Loewy, D.; Magnuson, M.^a; Sanes, J.R.; Emeson, R.B. Mice lacking α -calcitonin gene-related peptide exhibit normal cardiovascular regulation and neuromuscular development. *Mol. Cell. Neurosci.*, 14, p. 99-120, 1999.

Lyons P.R.; Slater, C.R. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult *mdx* mice. *J. Neurocytol.*, 20, p. 969-981, 1991.

Mann, C.J.; Honeyman, K.; Cheng, A.J.; Ly, T.; Lloyd, F.; Fletcher, S.; Jennifer, M.E.; Partridge, T.A.; Wilton, S.D. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the *mdx* mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 42-47, 2001.

Maunder Sewry, C.A.; Gorodetsky, R.; Yaron, R.; Dubowitz, V. Element analysis of skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy using x-ray fluorescence spectrometry. *Muscle & Nerve*, 3, p. 502-508, 1980.

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*, p. 410-415, 2001.

Moore, S.E.; Walsh, F.S. Nerve dependent regulation of NCAM expression in skeletal muscle. *Neurosci.*, 18, p. 499-505, 1985.

Moscoso, L. M.; Merlie, J.P.; Sanes, J.R. NCAM, 43K-rapsyn, and S-laminin mRNAs are concentrated at synaptic sites in muscle fibres. *Mol. Cell. Neurosci.* 6, p. 80-89, 1995.

Nigro, V.; Piluso, G.; Belsito, A.; Politano, L.; Puca, A.A.; Papparella, S.; Rossi, E.; Viglietto, E.; Esposito, M.G.; Albondanza, C.; Medici, N.; Molinari, A.M.; Nigro, G.; Puca, G.A. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemal 35 Kda glycoprotein. *Hum. Mol. Genet.*, 5, p. 1179-1186, 1996.

Oliveira, A.S.; Marques, M.J. Calcitonin gene-related peptide distribution at the neuromuscular junction of the *mdx* mice. XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2001.

Pagel, C.N.; Morgan, J.E. Myoblast transfer and gene therapy in muscular dystrophies. *Microscopy Research and Technique*, 30, p. 469-479, 1995.

Pasternak, C.; Wong, S.; Elson, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 128, p. 355-361, 1995.

Pastoret, C.; Sebillé, A. *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J. Neurol. Sci.*, 129, p.97-105, 1995.

Pereira, E.C.; Santo Neto, H.; Marques, M.J. Immunolocalisation of neuronal nitric oxide synthase at the neuromuscular junction of *mdx* mice: a confocal microscopy study. *J. Anat.*, 198, p. 663-671, 2001.

Purves, D.; Lichtman, J.W. Maintenance and Modifiability of synapses. In: *Principles of Neural Development*, p. 301-327, 1985.

Rodrigues, A. C. & Schmalbruch, H. Satellite Cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. *Anat. Rec.*, 243, p 243-430, 1985.

Rybakova, I.N.; Amann, K.J.; Ervasti, J.M. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J. Cell Biol.*, 135, p. 661-672, 1996.

Rybakova, I.N.; Ervasti, J.M. Dystrophin-glycoprotein complex is monometric and stabilizes actin filaments in vitro through a lateral association. *J. Biol. Chem.*, 272. p. 28771-28778, 1997.

Sadoulet-Puccio, H.M.; Rajala, M.; Kunkel, L.M. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, p. 13413-12418, 1997.

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

Schiavo, G.; Benfenati, F.; polain, B.; Rossetto, O.; Polverino de Laureto, P.; DasGupta, B.R.; Montecucco, C. Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature*, 359, p. 832-835, 1992.

Stedman, H.H.; Sweeney, P.B. Sharager, H.C.; Maguire, R. A.; Panettieri, B.; Petrofi, M.; Narusawa, J.M.; Leferovich, J.T.; Sladky.; Kelly, A .M. The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerativ changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 352, p. 536-539, 1991.

Son, Y.J.; Trachtenberg, T.; Thompson, W.J. Schwann cell induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci.*, 19(7), p. 280-285, 1996.

Sunada, Y.; Campbell, K.P. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Curr. Opin. Neurology*. 8:379-384, 1995.

Tidball, J.G.; Albrecht, D.E.; Lokensgard, B.E.; spencer, M.J. Apoptosis precedes necroses of dystrophin-deficient muscle. *J. Cell Sci.*, 108, p. 2197-2204, 1995.

Tsujimoto, T.; Kuno, M. Calcitonin gene-related peptide prevents disuse-induced sprouting of rat motor nerve terminals. *J. Neurosci.*, 8, p. 3951-3951, 1988.

Van Mier, P.; Lichtman, J.W. Regenerating muscle fibers induce directional sprouting from nearby nerve terminals: Studies in living Mice. *J. Neurosci.* 14, p. 5673-5686, 1994.

Yang, B.; Ibraghimov-Beskrovnaya, O.; Moomaw, C.R.; Slaughtter, C.A.; Campbell, K.P. Heterogeneity of the 59 Kda dystrophin-associated protein revealed by cDNA cloning and expression. *J. Biol. Chem.*, 269, p. 6040-6044, 1995.

Walsh, F.S.; Doherty, P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: Role in axonal growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13, p. 425-456, 1997.

Walsh, F. S.; Hobbs, C.; Wells, D.J.; Slater, C. R.; Fazeli, S. Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic mice results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered struture but not function. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 15,p. 224-261, 2000.

Wang T, Xie Z, Lu B. Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature.* 374, p. 262-266, 1995.

Webster, C; Blau, H.B. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: Implications for cell and gene therapy. *Somatic and Molecular Genetics*, 16 (6), p. 557-565, 1990.

Wernig, A; Herrera, A.A. Sprouting and remodelling at the nerve-muscle junction. *Prog Neurobiol.*, 17 p: 203-282, 1986.

Wrogemann, k.; Pena, S.D.J. Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet*, 1, p. 672-673, 1976.

Zacharias, J.M; Anderson, J.E. Muscle regeneration after imposed injury is better in younger than older *mdx* dystrophic mice. *J. Neurol. Sci.*, 104, p. 190-196, 1991.