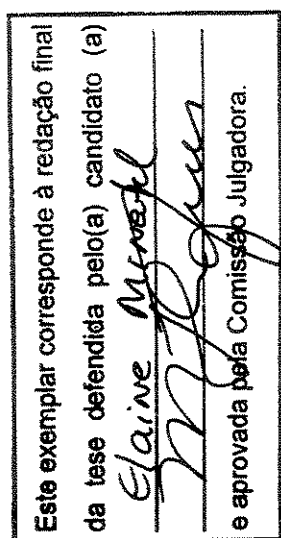


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ELAINE MINATEL

**DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE
ACETILCOLINA E ELIMINAÇÃO SINÁPTICA
DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA JUNÇÃO
NEUROMUSCULAR DO CAMUNDONGO *MDX***



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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE 3e
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M661d
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49905
PROC 16-837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00170442-5

BIB ID 246919

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

M661d

Minatel, Elaine

Distribuição dos receptores de acetilcolina e eliminação sináptica durante o desenvolvimento da junção neuromuscular do camundongo *MDX*/ Elaine Minatel. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadora: Maria Júlia Marques

Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia.

1. Receptores de acetilcolina. 2. Junção neuromuscular. 3. Camundongo *MDX*. I. Marques, Maria Júlia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 09/05/02

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Júlia Marques (Orientadora)


Assinatura

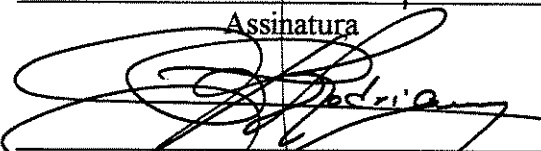
Prof. Dr. José Angelo Camilli


Assinatura

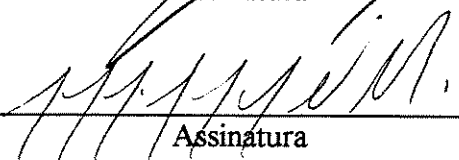
Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos


Assinatura

Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues


Assinatura

Prof. Dr. Joffre Guazzelli Filho


Assinatura

Prof. Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira

Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

00231657

DEDICATÓRIA

À DEUS...

“Deus é o que me cinge de força e aperfeiçoa o meu caminho.”

(Salmo 18:32)

AOS MEUS PAIS, RUBENS E CLEUSA,

“Pelo significado de suas vidas na minha.”

AO EDUARDO,

pelo carinho, apoio e compreensão em todas as horas.

*“O amor não consiste em olhar um para o outro, mas sim em
olhar juntos para a mesma direção.”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

Às minhas irmãs (**Cleide e Lude**), ao cunhado (**Cesar**), às sobrinhas (**Rafaela, Natália e Bruna**) pela presença constante, incentivo e apoio durante a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques**, pela confiança e por ter dirigido meus passos, visando meu aprimoramento didático e científico.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto**, pelas importantes considerações no exame de qualificação e pelas sugestões dadas durante a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari** e à **Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete** pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. José Angelo Camilli**, ao **Prof. Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira** e à **Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder** pelas correções, indicações e lapidação deste trabalho, durante a pré-banca examinadora.

Às **Sras. Lilian Alves Senne Panagio, Silvia Helena Burghi Kalaf, Ana Floriano Rodrigues e Lourdes Pinheiro** pela atenção que dispensaram durante todo o doutorado.

Aos **Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula**, pela disposição em ajudar durante a parte experimental deste trabalho.

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

À amiga **Elaine Cristina Leite Pereira**, pela amizade e apoio em todas as horas.

Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação**, por ensinarem um pouco mais sobre a convivência em grupo.

À **CAPES** pela concessão de bolsa e financiamento do projeto, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

*“A maior conquista da vida é a consciência
de concluir uma etapa, com a certeza de ter
dado tudo de si mesmo.”*

(autor desconhecido)

SUMÁRIO

Resumo	X
Abstract	XI
1- Introdução.....	1
1.1– Objetivo	4
1.2 Junção Neuromuscular	5
1.2.1 Morfologia e Organização Ultraestrutural da Junção Neuromuscular	5
1.2.2 Compartimento Pré-Sináptico.....	6
1.2.3 Compartimento Pós-Sináptico	8
1.2.4 Compartimento Extracelular	9
1.2.5 Eliminação Sináptica	10
1.2.6 Junção Neuromuscular do camundongo <i>mdx</i>	11
1.3.1 Aspectos Clínicos.....	12
1.3.2 Patogênese	13
1.4 – Distrofia	14
1.5 Animais Ditróficos	18
2- Materiais e Métodos	20
2.1 Animais	21
2.2 Grupos Experimentais	21
2.2.1 Grupo C57BL/10.....	21
2.2.2 Grupo <i>mdx</i>	22
2.3 Imunomarcção.....	22
2.3.1 Marcação dos receptores de acetilcolina e dos terminais nervosos	22
2.4 Historesina	24
2.5 Análise dos Dados.....	25
2.5.1 AChRs e terminais nervosos.....	25

2.5.2 Historesina	26
3- Synapse elimination in mdx mice.....	27
Abstract	29
Introduction	30
Materials and Methods.....	33
Results	35
Discussion	38
Bibliography	44
Legends	51
Figure 1	53
Figure 2	54
Figure 3	55
Figure 4	56
Figure 5	57
Table 1 and 2	58
Table 3 and 4	59
4- Considerações Finais	60
5- Referências Bibliográficas	65

RESUMO

As junções neuromusculares (JNM) dos vertebrados, inicialmente polinervadas, tornam-se monoinervadas em um processo denominado eliminação sináptica. Os mecanismos envolvidos neste processo ainda são pouco conhecidos, sendo uma das possibilidades a de que mudanças no nível das moléculas da membrana pós-sináptica poderiam levar a remoção dos terminais nervosos em excesso. Neste sentido, a JNM distrófica se torna um modelo interessante para o estudo dos mecanismos envolvidos na eliminação sináptica, uma vez que as fibras distróficas não expressam distrofina e apresentam redução de moléculas do complexo distrofina-glicoproteína, complexo este que faz parte do citoesqueleto pós-sináptico e que possivelmente está envolvido na estabilização dos receptores de acetilcolina (AChRs). Desta forma, no presente trabalho verificamos se a eliminação sináptica e a distribuição dos receptores de acetilcolina, observados durante o desenvolvimento pós-natal, estão alterados na fibra deficiente de distrofina. Os AChRs e os terminais nervosos do músculo esternomastóide de camundongos mdx e controle (C57BL/10) foram marcados, respectivamente, com rodamina- α -bungarotoxina e anticorpo anti-neurofilamento. Através da microscopia confocal, observamos que 7 dias após o nascimento a maioria das JNMs do camundongo mdx se encontravam monoinervadas (86,7% - n=200), enquanto a mesma observação foi feita em 41,4% no controle (n=200). Consistente com este fato, no mesmo período, a presença de placas perfuradas é mais frequente no mdx (18,6%) do que no controle (7,3%). No final da segunda semana pós-natal, todas as JNMs se encontravam monoinervadas (100% mdx e 94,7% controle, n=200 para cada grupo) e os AChRs apresentavam o padrão de distribuição adulto. No camundongo mdx, a presença de AChRs distribuídos em pequenas ilhas foi observada no período de 21 dias pós-natal em 13,3% das JNM, indicando a presença de fibras musculares regeneradas. Nossos resultados demonstram que a eliminação sináptica ocorre mais cedo nas fibras musculares distróficas quando comparada ao de um animal controle, sugerindo assim que a estabilização da fibra muscular pela distrofina ou pelo complexo distrofina-glicoproteínas normal é necessário para o curso da eliminação sináptica em tempo normal.

ABSTRACT

The vertebrate neuromuscular junction goes from multiple to monoinnervated during early postnatal life in a process called synapse elimination. The mechanisms underlying this process are unknown but one possibility would be that changes at the molecular level in the postsynaptic cell lead to the removal of the overlying nerve terminal. The *mdx* mice show a deficiency of dystrophin and associated proteins, which are part of the postsynaptic cytoskeleton and possibly involved in acetylcholine receptors (AChRs) stabilization. In the study, we used rhodamine- α -bungarotoxin and anti-neurofilament-IgG-FITC to stain AChRs and nerve terminals of the sternomastoid muscle, during early postnatal development of *mdx* and control C57BL/10 mice. Using fluorescence confocal microscopy, we observed that 7 days after birth, 86,7% of the *mdx* endplates were monoinnervated (n=200) while the same observation was made in 41,4% of the controls (n=200). Consistent with this is the fact that, at this time, perforated plaques were seen more frequently in *mdx* (18,6%) than controls (7,3%). By the end of the second postnatal week, all the endplates were monoinnervated (100% *mdx* and 94,7% controls, n=200 for each group) and AChRs had attained the branched-pattern distribution of adults. In *mdx* mice, breaking down of receptors into islands, as observed in adult *mdx*, were seen 21 days after birth in 13,3% of the junctions, indicating the presence of regenerated muscle fibers. These results show that synapse elimination takes place earlier in dystrophin-deficient muscle fibers of the *mdx* mice, suggesting that stabilization of muscle fiber by dystrophin or a normal cytoskeleton complex is required for the normal time course of synapse elimination.

1. INTRODUÇÃO

A junção neuromuscular é formada, basicamente, por três células – o neurônio motor, a célula de Schwann terminal e a fibra muscular (HALL & SANES, 1993; ENGEL, 1994). A característica fundamental desta junção é a de que as porções sinápticas destas três células são altamente especializadas, contendo elevadas concentrações de organelas e moléculas, que se encontram em baixas concentrações nas regiões extra-sinápticas. A junção adulta é caracterizada pela presença de dobras no sarcolema juncional e por alta densidade de receptores de acetilcolina no ápice das dobras. Adicionalmente, o terminal nervoso situa-se em uma depressão, a fenda sináptica primária, sendo recoberto por processos das células de Schwann terminais (HALL & SANES, 1993).

O padrão morfológico adulto da junção neuromuscular de camundongos se estabelece durante as duas primeiras semanas de vida pós-natal. A transmissão sináptica se estabelece ao primeiro contato do cone de crescimento nervoso com a fibra muscular indiferenciada, sendo a atividade elétrica fator essencial para que se dê o desenvolvimento apropriado da junção (THOMPSON, 1985). Este contato induz os receptores de acetilcolina, antes dispersos ao longo de toda a fibra muscular, a se agruparem sob o terminal nervoso (ANDERSON & COHEN, 1977; FRANK & FISCHBACH, 1979).

Sabe-se que, nas duas primeiras semanas de vida pós-natal, os músculos estriados esqueléticos são polinervados, ou seja, possuem mais de um terminal por junção ou várias junções em uma única fibra (BROWN *et al.*, 1976). Durante este período, os terminais motores são gradativamente eliminados, no processo de eliminação sináptica e a fibra muscular atinge o padrão adulto de monoinervação ao redor do 14º-15º dia de vida (GRINNELL, 1995).

A eliminação sináptica na fibra normal é um fenômeno complexo e pouco entendido. Atualmente, aceita-se que a fibra muscular tenha papel fundamental na gênese

da eliminação sináptica, através de sinais retrógrados que mediam as interações competitivas entre os terminais (para revisão ver SANES & LICHTMAN, 1999). Estes sinais são desconhecidos, mas sugere-se, por exemplo, que concentrações elevadas de cálcio intracelular, ao ativar proteases, poderiam desestabilizar os terminais nervosos e promover sua retração (SWANSON & VRBOVA, 1987). Sabe-se também que a densidade ou estabilidade de moléculas pós-sinápticas, tais como os receptores de acetilcolina, rapsina e utrofina, são importantes para a eliminação, visto que os níveis destas moléculas diminuem nos locais de eliminação sináptica, antes que os terminais retraiam (CULICAN *et al.*, 1998).

Neste sentido, a junção neuromuscular distrófica se torna um modelo interessante para o estudo dos mecanismos envolvidos na eliminação sináptica. As fibras distróficas apresentam alterações no turnover dos receptores de acetilcolina, que são degradados mais rapidamente do que os das fibras normais (XU & SALPETER, 1997). Adicionalmente, estas fibras não expressam distrofina, sendo que outras moléculas do complexo distrofina-glicoproteínas estão diminuídas ou mesmo ausentes, na região juncional (OHLENDIECK & CAMPBELL, 1991; PEREIRA *et al.*, 2001), o que parece comprometer a estabilidade da sarcolema muscular, levando ao excesso de cálcio observado nas fibras distróficas (TURNER *et al.*, 1993).

1.1 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina e a eliminação sináptica, durante o desenvolvimento das junções neuromusculares distróficas de camundongos da linhagem *mdx*. Estes animais, tal como humanos portadores da distrofia muscular de Duchenne, não expressam distrofina, sendo utilizados como modelo experimental desta patologia.

1.2 JUNCÃO NEUROMUSCULAR

1.2.1 *Morfologia e Organização Ultraestrutural da Junção Neuromuscular*

A estrutura, função e organização da junção neuromuscular (JNM) dos vertebrados têm sido extensamente discutidas na literatura (SALPETER, 1987). Entretanto, os estudos modernos da organização ultraestrutural e molecular tiveram início há aproximadamente 40 anos (para revisão ver PALADE & PALAY, 1954; ANDERSON-CEDERGREEN, 1959; COUTEAUX, 1973; SHOTTON *et al.*, 1979; CARTAUD *et al.*, 1981).

A junção neuromuscular é uma sinapse química, formada pela junção do terminal nervoso motor com a fibra muscular, aproximadamente no seu ponto médio. Descreve-se na junção neuromuscular dos vertebrados um compartimento pré-sináptico, um compartimento pós-sináptico e entre os compartimentos pré e pós-sinápticos, o compartimento extracelular (HALL & SANES, 1993 – Figura 1).

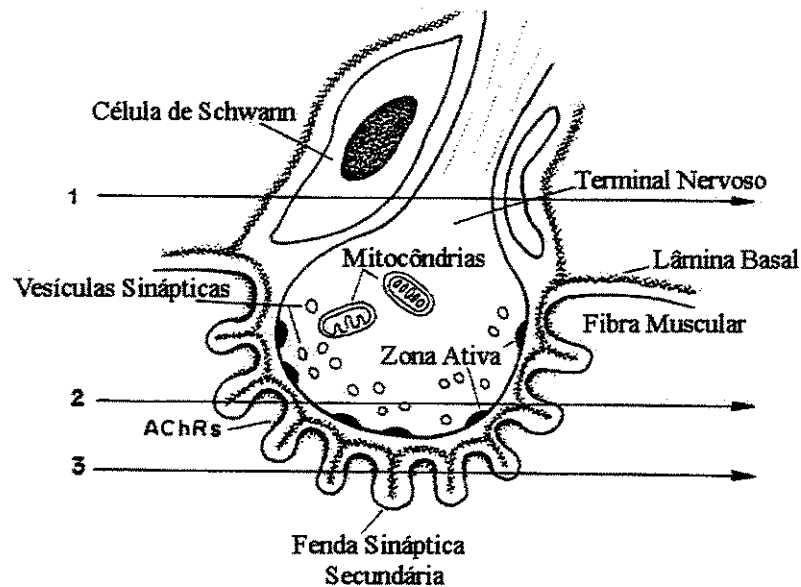


Figura 1. Esquema da junção neuromuscular mostrando os planos focais em que cortes ópticos podem ser realizados. Este esquema ilustra apenas 3 cortes para simplificar o desenho. No corte número 1, esperamos observar somente as estruturas que fazem parte do compartimento pré-sináptico, no corte 2 é esperado observar AChRs e parte das estruturas do compartimento pré-sináptico e no corte 3 um predomínio da marcação dos AChRs. Adaptado de PEREIRA *et al.*, *J. Anat.*, 198, p.663-671, 2001.

1.2.2 Compartimento Pré-Sináptico

Os músculos esqueléticos são inervados pelos motoneurônios. Seus axônios penetram no músculo através de um feixe neurovascular. A seguir, dividem-se em numerosos feixes intramusculares que caminham entre as fibras musculares. Após abandonarem o feixe nervoso intramuscular, os axônios motores passam a ser denominados

de axônios pré-terminais. O axônio pré-terminal perde seu revestimento miélinico próximo ao contacto com a fibra muscular. Esta porção do axônio é chamada de axônio terminal. O axônio terminal sofre delicadas arborizações com suas terminações levemente dilatadas, denominadas de botões terminais, os quais se alojam na goteira sináptica ou fenda sináptica primária, uma depressão da fibra muscular (para revisão ver BOWDEN & DUCHEN, 1976; PETERS *et al.*, 1976).

A estrutura do terminal 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 1.000 a 50.000 moléculas do neurotransmissor acetilcolina (WEINER *et al.*, 1985). Muitas dessas vesículas estão localizadas próximas de placas densas na superfície interna da membrana pós-sináptica. Essas placas, chamadas de zonas ativas, são os locais onde as vesículas se fundem com a membrana pré-sináptica para liberar o neurotransmissor. As membranas das vesículas são reincorporadas pela superfície pré-sináptica para formação de novas vesículas (HEUSER & REESE, 1981). No terminal também são encontrados corpos multivesiculares e vesículas elétron-densas que contêm neuropeptídeos (MATTEOLI *et al.*, 1990). O terminal nervoso também possui numerosas mitocôndrias para suprir a energia necessária para síntese, estocagem e liberação de transmissores (HALL & SANES, 1993).

Recobrando os botões sinápticos identificam-se processos citoplasmáticos das células de Schwann. Estas são denominadas de células de Schwann terminais. Elas recobrem os terminais nervosos protegendo-os de possíveis lesões químicas e motoras. As células de Schwann pré-terminais formam a bainha de mielina nos axônios (para revisão ver HALL & SANES, 1993).

1.2.3 Compartimento Pós-Sináptico

O compartimento pós-sináptico é composto pelo sarcolema imediatamente abaixo do terminal nervoso. A membrana sarcolemal pós-sináptica é uma região altamente especializada da fibra muscular, apresentando dobras juncionais. As dobras juncionais têm cerca de $1\mu\text{m}$ de profundidade e o espaço contido dentro das dobras é chamado de fenda sináptica secundária (para revisão ver HALL & SANES, 1993).

Sugere-se que as dobras juncionais aumentem a superfície da membrana pós-sináptica em cerca de 3 a 7 vezes quando comparada à superfície da membrana axolemal pré-sináptica (SALPETER, 1969; MATTHEWS-BELLINGER & SALPETER, 1978). Recentemente, foi sugerido que as dobras juncionais resultam da interação mecânica do terminal sobre o sarcolema juncional, durante o desenvolvimento normal (MARQUES *et al.*, 2000).

Cada dobra juncional apresenta duas regiões: o ápice e o fundo. No ápice encontram-se agrupados os receptores de acetilcolina em uma densidade de aproximadamente $10^4/\mu\text{m}^2$ e no fundo das dobras estão dispostos canais de sódio responsáveis pela geração do potencial de ação (HALL & SANES, 1993).

Durante o desenvolvimento da JNM, na fase embrionária, os AChRs inicialmente aparecem distribuídos em placas compactas e permanecem com esta forma por diversos dias, até aproximadamente 2-3 dias pós-natal. A seguir, ocorrem falhas no interior dessas placas até que os AChRs atinjam seu padrão de distribuição normal da fase adulta, ou seja, apresentam-se distribuídos no interior de braços contínuos (STEINBACH, 1981).

Os AChRs são pentâmeros dispostos em torno de canais iônicos que se abrem quando a acetilcolina liga-se a eles. São responsáveis pela recepção e transdução de sinais químicos (para revisão ver UNWIN, 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 a distrofina (HALL & SANES, 1993).

No ápice das dobras juncionais também há outras proteínas que servem de ligação entre o sarcolema e o citoesqueleto da fibra, mantendo a estrutura das dobras juncionais. Entre elas está a distrofina e proteínas relacionadas, que ligam-se ao complexo de proteínas transmembrânicas e ligam o citoesqueleto abaixo do sarcolema à lâmina basal (OHLENDIECK *et al.*, 1991).

1.2.4 *Compartimento Extracelular*

O espaço compreendido entre o terminal nervoso e o sarcolema pós-sináptico é chamado fenda sináptica primária. A lâmina basal está contida nesta fenda, estendendo-se para dentro das dobras juncionais nas fendas sinápticas secundárias. Ela é contínua com a membrana basal da fibra muscular e se funde com a membrana basal da célula de Schwann terminal (HALL & SANES, 1993).

A lâmina basal sináptica é bioquimicamente especializada, pois contém proteínas distintas daquelas encontradas na região extra-sináptica (CARBONETTO & LINDENBAUM, 1995; SANES, 1995) tais como a acetilcolinesterase, enzima envolvida na neurotransmissão ao hidrolisar a acetilcolina liberada pelo terminal nervoso motor (WEINBERG & HALL, 1979); a S-laminina; a agrina, proteína necessária para a

diferenciação pós-sináptica (SANES & LICHTMAN, 1999) e o indutor de atividade do receptor de acetilcolina (ARIA) (GOODEARL *et al.*, 1995; JO *et al.*, 1995).

1.2.5 Eliminação Sináptica

A eliminação sináptica ocorre na maioria das fibras musculares dos vertebrados sendo um fenômeno complexo e pouco entendido. Sabe-se que, ao nascimento, a transmissão sináptica nos vários terminais nervosos de uma junção é aproximadamente igual, sendo que gradualmente um dos terminais passa a ‘ganhar’ território, enquanto outros terminais perdem (COLMAN *et al.*, 1997). Morfologicamente, o processo se dá através da perda gradual de ramos dos terminais nervosos. Cada ramo passa por um processo de atrofia e retração, com separação progressiva dos territórios que cada terminal ocupa. Finalmente o terminal ‘perdedor’ forma um bulbo de retração e abandona o seu sítio sináptico. Esta perda de território é concomitante, e pode estar relacionada, às alterações na distribuição dos receptores de acetilcolina, que de uma placa oval, passam a constituir uma estrutura com a forma de um ‘pretzel’, ou em ramos contínuos (BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993; MARQUES *et al.*, 2000).

Duas características fundamentais parecem estar envolvidas no fenômeno da eliminação sináptica: primeiro, o músculo media a interação competitiva entre os axônios e segundo, a atividade elétrica afeta a intensidade da competição. A questão central é a natureza dos sinais envolvidos e três possibilidades foram levantadas, todas envolvendo influência retrógrada do músculo para o terminal. Essas incluem a liberação de fatores de manutenção (sinaptotropinas; SNYDER & LICHTMAN, 1996), fatores de punição

(sinaptotoxinas) e fatores de proteção ou punição (sinaptomedinas; para revisão ver SANES & LICHTMAN, 1999).

1.2.6 *Junção Neuromuscular do Camundongo mdx*

A junção neuromuscular de animais *mdx* apresenta alterações na sua estrutura quando comparada com junções de animais normais. Essas alterações são similares ao dos pacientes com distrofia muscular de Duchenne (ENGEL *et al.*, 1994). As principais anormalidades da JNM dos *mdx* referem-se a uma diminuição da complexidade da membrana pós-sináptica da fibra muscular, tornando-se mais evidente com a idade (TORRES & DUCHEN, 1987).

Quando o animal tem cerca de 4-6 semanas de vida, percebe-se redução no número e profundidade das fendas sinápticas secundárias (TORRES & DUCHEN, 1987). Os AChRs tendem a se apresentar em pequenos aglomerados com poucos μm de diâmetro, diferentemente da distribuição em braços contínuos observadas em junções normais (LYONS & SLATER, 1991). Essa redistribuição das moléculas pós-sinápticas é observada somente em fibras musculares com núcleo central. Possivelmente as mudanças no padrão de distribuição dos AChRs, observadas nas fibras musculares dos camundongos *mdx*, são uma consequência do processo de regeneração das fibras musculares, uma vez que, esses animais apresentam ciclos de degeneração/regeneração da fibra muscular (LYONS & SLATER, 1991; MINATEL *et al.*, 2001).

1.3 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

1.3.1 Aspectos Clínicos

A distrofia muscular de Duchenne foi primeiramente descrita por MERYON (1852) e DUCHENNE (1868) e é considerada a mais devastadora das distrofias musculares, afetando aproximadamente uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas. Em média, 1 em 3 casos é resultado de uma mutação no óvulo da mãe ou da avó da criança (ENGEL *et al.*, 1994).

O diagnóstico, na maioria dos casos, é feito somente no quarto ou quinto ano de vida, quando os pais percebem que a criança apresenta um atraso no desenvolvimento motor. 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 adiposo. Este fato cria dificuldades para a deambulação, manutenção da posição ortostática, e em levantar-se a partir da posição agachada. A degeneração muscular progride, resultando em intensa fraqueza de outros grupos musculares (ENGEL *et al.*, 1994).

No período correspondente à segunda década de vida, após a perda da capacidade de locomoção, há uma redução da massa muscular dos membros acompanhada de uma cifoescoliose pronunciada. Em seguida, ocorre comprometimento dos músculos respiratórios e cardíaco. Assim sendo, o óbito ocorre frequentemente por insuficiência respiratória ou cardíaca, o que ocorre geralmente ao redor dos 20 anos de idade (ENGEL *et al.*, 1994).

1.3.2 Patogênese

Acredita-se que a patogênese da DMD está relacionada com uma anormalidade da membrana da fibra muscular, a qual permite a saída de enzimas intracelulares e o ingresso de cálcio (OBERC & ENGEL, 1977; BODENSTEINER & ENGEL, 1978; MAUNDER *et al.*, 1980). O acúmulo de cálcio é um fator importante na evolução da degeneração muscular (WROGEMANN & PENA, 1976; EBASHI & SUGITA, 1979). Um aumento elevado na concentração de cálcio em biópsias de músculos de pacientes com DMD tem sido extensamente reportado (BODENSTEINER & ENGEL, 1978; MAUNDER *et al.*, 1980; JACKSON *et al.*, 1985). Outras alterações histopatológicas importantes são múltiplos focos de necrose associados a intenso infiltrado inflamatório, fagocitose e regeneração parcial das fibras musculares (SEIXAS *et al.*, 1997).

Hoje sabe-se que a DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, sendo que as translocações e deleções detectadas neste foram observadas na banda I da região 2 do braço curto do cromossomo, denominada de banda Xp21. Essa banda apresenta uma sequência de nucleotídeos responsáveis pela expressão de uma proteína denominada distrofina. Devido ao tamanho e complexidade do gene, é bastante elevada a taxa de mutação, deleções ou duplicações (HOFFMAN, 1996). Isto resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas (SEIXAS *et al.*, 1997).

1.4 DISTROFINA

A distrofina é uma proteína de massa molecular relativa de 427 kDa, presente em músculos normais, mas deficiente em músculos distróficos (ENGEL *et al.*, 1994). O código de sequência para a expressão de distrofina é realizado por 79 exons, e comandada pela atuação de diversos promotores presentes em alguns tipos celulares, como as células musculares, as células gliais, as células de Purkinje e as células de Schwann. O promotor muscular para a distrofina é bastante ativo nos músculos esqueléticos e cardíacos. A expressão da distrofina muscular é regulada de acordo com as etapas do desenvolvimento. Nos músculos fetais, a distrofina é detectada no sarcolema depois da nona semana de gestação, aumentando progressivamente sua expressão nas junções neuromusculares e miotendinosas, na superfície das membranas dos túbulos T e junto à diversas junções celulares (ENGEL *et al.*, 1994).

Quanto à organização molecular, a distrofina é um dímero antiparalelo associado a outras proteínas estruturais do sarcolema. O dímero de distrofina apresenta-se dividido em quatro domínios; o primeiro relacionado com a α -actina, o segundo ligado à espectrina, o terceiro à ancarina e o último à um complexo de proteínas unidas à laminina (ENGEL *et al.*, 1994).

A distrofina é encontrada principalmente na face citoplasmática do sarcolema, fazendo parte do citoesqueleto subsarcolemal, ligada aos miofilamentos da fibra muscular e a um complexo de glicoproteínas da membrana (SUNADA & CAMPBELL, 1995).

O complexo distrofina-glicoproteínas é constituído por proteínas sarcolemas e expresso em alta concentração no músculo estriado (CAMPBELL & KAHL, 1989;

ERVASTI & CAMPBELL, 1991). Os componentes integrais deste complexo incluem: a distrofina, que liga-se à actina F (HOFFMAN *et al.*, 1987; RYBAKOVA *et al.*, 1996; RYBAKOVA & ERVASTI, 1997); a α -dystroglicana e a 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 sintrofina, proteínas intracelulares que ligam-se ao terminal C da distrofina (YANG *et al.*, 1995); uma proteína que apresenta quatro domínios transmembrânicas, 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 transmembrânicas denominadas de α -sarcoglicana, β -sarcoglicana, γ -sarcoglicana, δ -sarcoglicana, as quais estão ligadas a β -dystroglicana (SUNADA & CAMPBELL, 1995; NIGRO *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 1996). Em adição à laminina 2 e actina F há evidências de 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 2A). Este modelo sugere que a distrofina, unida às proteínas integrantes, confere a estabilidade da superfície da membrana da fibra muscular durante sua contração e relaxamento (ENGEL *et al.*, 1994).

Há interação entre os elementos do sarcolema e do citoesqueleto e a distrofina, de modo que uma deficiência na expressão desta compromete a expressão e organização das demais proteínas, promovendo a deterioração da fibra, diante de uma lesão (BONILLA *et al.*, 1988). A deficiência na síntese de distrofina promove fragilidade da fibra muscular tornando-a suscetível à lesão e à necrose. Comumente, a lesão está relacionada ao acúmulo

intracelular de cálcio, geralmente localizado na região subsarcolemal da fibra, que promoveria lesão direta da membrana da célula muscular (BERTORINI *et al.*, 1982).

Em estudos subsequentes revelou-se que a distrofina também está particularmente concentrada na junção neuromuscular (Figura 2B) de mamíferos e na membrana pós-sináptica da eletroplaca do *Torpedo marmorata* (JASMIM *et al.*, 1990; YEADON *et al.*, 1991; para revisão ver BERTHIER & BLAINEAU, 1997).

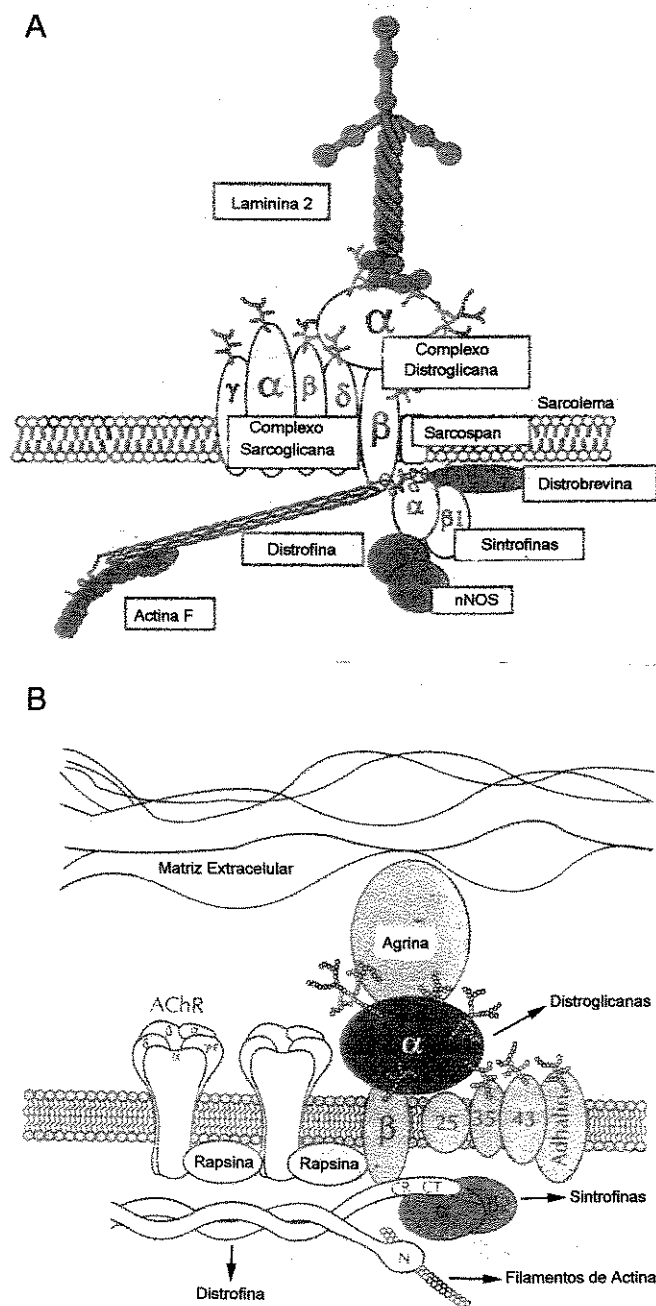


Figura 2

(A) Complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema extrajuncional. 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.

1.5 ANIMAIS DISTRÓFICOS

Até o final da década de 80, o estudo da DMD estava restrito às análises de biópsias ou ao cultivo de células, sendo impossível uma observação experimental controlada da degeneração muscular. Entretanto, surge nesse período uma linhagem de camundongos mutantes originados da linhagem C57BL/10, denominados *mdx*, X chromosome-linked muscular dystrophy (BULFIELD *et al.*, 1984).

Estudos genéticos demonstraram que nos camundongos *mdx* o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD (LEFAUCHEUR *et al.*, 1995). Esses camundongos apresentam deficiência na produção da distrofina nas suas fibras musculares, reproduzindo assim, as características das fibras musculares dos pacientes portadores de DMD (BULFIELD *et al.*, 1984; SICINSKI *et al.*, 1989). Face a isto, os camundongos distróficos são extensivamente utilizados como modelo experimental para investigação de diversos aspectos da DMD. Assim sendo, muito o que se sabe hoje sobre a fisiopatologia da doença deve-se aos estudos realizados com esses animais (LEFAUCHEUR *et al.*, 1995; HAGIWARA *et al.*, 1995; PASTERNAK *et al.*, 1995; PASTORET & SEBILLE, 1995; IRINTCHEV *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 1998; BOCKHOLD *et al.*, 1998; VILQUIN *et al.*, 1998).

Apesar da ausência da distrofina ser um achado comum tanto nos pacientes portadores de DMD quanto nos camundongos *mdx*, ultraestruturalmente há algumas diferenças evidentes entre a patologia de cada um deles. Os camundongos *mdx* não apresentam fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos; machos e fêmeas são afetados e os músculos regeneram sucessivamente após necrose (CULLEN & JAROS, 1988).

Os primeiros sinais de degeneração e regeneração das fibras musculares nos animais distróficos inicia-se por volta dos 20 dias de idade. Entre 35 e 90 dias a necrose atinge seu ápice, comprometendo um grande número de fibras. Neste período encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (TANABE *et al.*, 1986). Apesar da progressiva degeneração das fibras acompanhada de regeneração, a diferença fenotípica fundamental entre a DMD humana e a dos camundongos, está no fato de que, nestes últimos, as fibras musculares regeneram, não havendo manifestação de sinais clínicos que demonstrem o comprometimento da locomoção, da respiração, ou óbito decorrente desse fator (TORRES & DUCHEN, 1987).

Apesar de apresentar algumas características diferentes em relação a miopatia humana, em termos de severidade e persistência da miopatia o camundongo *mdx* é valioso como um modelo para DMD (BULFIELD *et al.*, 1984).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos filhotes, de ambos os sexos da linhagem *mdx*. Os camundongos controle pertenceram à linhagem C57BL/10, os quais são heterozigotos para o gene que desencadeia a distrofia muscular e que deram origem à linhagem *mdx* (BULFIELD, *et al.*, 1984). Os animais foram adquiridos do Biotério Central da UNICAMP e mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, IB, em caixas plásticas padrão, com condições ambientais adequadas (12 horas de ciclo claro/escuro), com ração e água *ad libitum*.

2.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

2.2.1. Grupo C57BL/10

- Marcação dos AChRs e dos terminais nervosos

Constituído de 20 animais, distribuídos em diferentes tempos de vida pós-natal: 1, 7, 14 e 21 dias (P1, P7, P14 e P21 respectivamente, n= 5 animais para cada idade). Este grupo teve por objetivo estudar o padrão de distribuição dos AChRs e também o padrão dos terminais nervosos no músculo esternomastóideo (STN) nos referidos tempos de vida pós-natal, servindo de controle para os animais *mdx*. Os músculos STNs foram marcados segundo o protocolo para imunomarcção dos AChRs e dos terminais nervosos descrito no item 2.3.1.

2.2.2. Grupo *mdx*

- Marcação dos AChRs e dos terminais nervosos

Constituído de 20 animais, distribuídos em diferentes tempos de vida pós-natal: 1, 7, 14 e 21 dias (P1, P7, P14 e P21 respectivamente, n= 5 animais para cada idade). Este grupo teve por objetivo estudar o padrão de distribuição dos AChRs e também o padrão dos terminais nervosos no músculo STN nos referidos tempos de vida pós-natal. Os músculos STNs foram marcados segundo o protocolo para imunomarcação dos AChRs e dos terminais nervosos descrito no item 2.3.1.

- Análise histológica

Constituído de 12 animais, distribuídos em diferentes tempos de vida pós-natal: 1, 7, 14 e 21 dias (P1, P7, P14 e P21 respectivamente, n= 3 animais para cada idade). Este grupo teve por objetivo verificar o aparecimento do processo degenerativo das fibras do músculo STN nos diferentes tempos de vida. Os músculos STNs foram incluídos em historesina segundo o protocolo descrito no item 2.4.

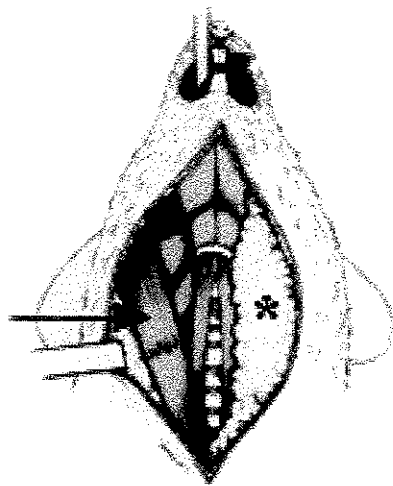
2.3. IMUNOMARCAÇÃO

2.3.1. Marcação dos AChRs e dos terminais nervosos

Após pesagem e anestesia com hidrato de cloral 10% intra-peritoneal na dosagem de 0.2ml/20g de peso corporal, os animais foram perfundidos via cardíaca com 20 ml de

tampão fosfato (PBS; 14g de fosfato de sódio monobásico, 4,3g de fosfato de potássio bibásico anidro e 72g de cloreto de sódio em 1 litro de água destilada, pH 7.5), seguida por 20 ml de paraformaldeído a 2%. A seguir, foi realizada uma incisão longitudinal mediana na pele da região ventral do pescoço, desde o ápice da mandíbula até a incisura esternal. As glândulas submandibulares foram então visualizadas e rebatidas lateralmente e os músculos STNs, direito e esquerdo foram expostos. (Fig. 3).

Figura 3. Vista da face ventral do pescoço do camundongo. Observa-se a glândula submandibular esquerda não rebatida (*) e o músculo STN direito (seta) exposto.



Após fixação *in situ* com paraformaldeído a 2%, por 15 min, os músculos STNs foram lavados com PBS, retirados cuidadosamente e presos pelas extremidades em uma cuba, com o auxílio de alfinetes. Foram então lavados várias vezes com PBS e, com o objetivo de se inativar o fixador, foram incubados com glicina 0,1 M por 20 min em agitador orbital (FANEM 255-B). Após lavadas com PBS, foram incubados com collagenase 1% (Tipo I-Sigma) por 20 min no agitador, para que o tecido conjuntivo que

resta preso aos músculos desprenda-se. A seguir foram lavados com PBS e os AChRs marcados com α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX 1:100 em PBS; Sigma) durante 30 min no agitador. Após esse período, os músculos foram lavados (PBS) e incubados com triton 1% durante 1 hora, para permeabilização das fibras musculares. Em seguida, foram lavados com PBS e com a finalidade de bloquear ou diminuir a marcação inespecífica do anticorpo primário (Ab primário) foram incubados com uma solução bloqueadora composta de 125 μ l de triton X-100, 1 ml de soro albumina bovina, diluídos em 23,8 ml de PBS, durante 24 horas. Após esse período foram incubados com anticorpo (Ab) primário (anti-neurofilamento; 1:100 em solução bloqueadora), a 4°C por 12 horas. No dia seguinte, foram lavados com PBS e incubados com Ab secundário (anti-mouse; 1:100, em solução bloqueadora) por 3 horas. A seguir, foram lavados e montados em lâmina sob laminula em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma), para posterior observação ao microscópio confocal.

2.4. HISTORESINA

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% intra-peritoneal (0,2 ml:20 g de peso corporal) e perfundidos com 20 ml de formol cálcio.

Os músculos STNs direito e esquerdo, foram retirados e fixados com formol cálcio e submetidos a técnicas histológicas de rotina (inclusão em historesina) e corados com hematoxilina e eosina (HE), para posterior observação ao microscópio de luz.

2.5 ANÁLISE DOS DADOS

2.5.1 AChRs e Terminais Nervosos

Os músculos submetidos a imunomarcação foram observados utilizando-se 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). Foram utilizadas as objetivas de 63X (1.4NA) e 100X (1.4NA) de imersão em óleo. A linha 488 nm do laser Ar-Kr foi utilizada para excitar a fluoresceína (terminal nervoso) e a linha 568 nm para a rodamina (AChRs). A observação concomitante da FITC+Rodamina foi possível com a utilização dos filtros de emissão HQ 598/40, HQ522/35 e filtros barreira T1/E2 supridos pelo fabricante. Imagens de um único plano focal, ou um grupo de imagens em vários planos focais, foram adquiridas com auxílio do software Laser Sharp OS/2 (Bio-Rad) e salvas em disco óptico. A documentação foi feita em impressora Codonics acoplada ao sistema confocal, em papel fotográfico Kodak.

Para analisar o padrão de distribuição dos AChRs e dos terminais nervosos durante o desenvolvimento pós-natal foram utilizados 10 músculos STNs (n=5 animais) para cada período de vida (P1, P7, P14 e P21). Foram observadas de 20 a 40 junções neuromusculares por músculo, perfazendo um total de 200 junções analisadas para cada período de vida pós-natal. Os AChRs foram classificados de acordo com sua forma (placas, placas perfuradas, adulto e ilhas) e as junções neuromusculares foram classificadas em polinervadas ou monoinervadas.

O índice da área juncional foi obtido multiplicando-se o comprimento máximo e a largura máxima da junção neuromuscular, através do software Processing do sistema confocal da Bio-Rad. Os dados obtidos foram então processados no programa Excel

(fórmula: comprimento x largura) resultando na medida da área juncional. A análise estatística foi feita através do teste t de Student.

2.5.2 *Historesina*

Cortes transversais com 5 μm de espessura corados com HE foram examinados em microscópio de luz. O número de fibras normais e de fibras regeneradas (indicada pela presença de núcleo central) foi obtido através de um retículo de cem pontos acoplado a ocular do microscópio em objetiva de 40x, com auxílio de um contador manual. Desta forma foi possível obter a porcentagem de fibras regeneradas nos diferentes tempos de vida pós-natal.

3. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Acetylcholine receptors distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice.

By Elaine Minatel, Humberto Santo Neto, PhD and Maria Julia Marques, PhD

Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas,
Campinas, São Paulo - 13083-970,
Brazil

Key words: acetylcholine receptors; synapse elimination; neuromuscular junction; *mdx* mice.

All correspondence should be addressed to:

Prof. Maria Julia Marques

Dept. de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas

Campinas, SP - 13083-970, Brazil

fax: 55-19-3289-3124

email:marques@unicamp.br

phone: 55-19-3788-6395

Running title: Synapse elimination in *mdx* mice

Acetylcholine receptors distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice.

ABSTRACT

The vertebrate neuromuscular junction goes from multiple to monoinervated during early postnatal life in a process called synapse elimination. The mechanisms underlying this process are unknown but one possibility would be that changes at the molecular level in the postsynaptic cell lead to the removal of the overlying nerve terminal. The *mdx* mice show a deficiency of dystrophin and associated proteins, which are part of the postsynaptic cytoskeleton and possibly involved in acetylcholine receptors (AChRs) stabilization. In the study, we used rhodamine- α -bungarotoxin and anti-neurofilament-IgG-FITC to stain AChRs and nerve terminals of the sternomastoid muscle, during early postnatal development of *mdx* and control C57BL/10 mice. Using fluorescence confocal microscopy, we observed that 7 days after birth, 86,7% of the *mdx* endplates were monoinervated (n=200) while the same observation was made in 41,4% of the controls (n=200). Consistent with this is the fact that, at this time, perforated plaques were seen more frequently in *mdx* (18,6%) than controls (7,3%). By the end of the second postnatal week, all the endplates were monoinervated (100% *mdx* and 94,7% controls, n=200 for each group) and AChRs had attained the branched-pattern distribution of adults. In *mdx* mice, breaking down of receptors into islands, as observed in adult *mdx*, were seen 21 days after birth in 13,3% of the junctions, indicating the presence of regenerated muscle fibers. These results show that synapse elimination takes place earlier in dystrophin-deficient muscle fibers of the *mdx* mice, suggesting that stabilization of muscle fiber by dystrophin or a normal cytoskeleton complex is required for the normal time course of synapse elimination.

INTRODUCTION

During the first two weeks after birth, several changes in structure and function take place at the neuromuscular junction of skeletal muscles. Acetylcholine receptors (AChRs) distribution goes from a oval plaque to a branched form (Steinbach, 1981; Slater, 1982; Balice-Gordon & Lichtman 1993), their turnover rate and subunits change (Salpeter & Loring, 1985; Culican *et al.*, 1998), while the topography of the postsynaptic membrane is gradually complicated, by the presence of folds and synaptic clefts, due to its relations to the overlying nerve terminal (Marques *et al.*, 2000).

One of the most intriguing events that occur during this period is the process of synapse elimination, where all inputs but one are withdrawn, leaving the synapses monoinnervated by the end of the second postnatal week (Balice-Gordon & Lichtman, 1993). It is known that during transition from multiple to single innervation, the strength of one input gradually gains territory as the others loose (Balice-Gordon & Lichtman, 1993; Colman *et al.*, 1997) and quantal content and size decrease prior to axon withdrawal (Colman *et al.*, 1997). Anatomically, nerve terminals show atrophy and progressively separate from each others territory, forming a retraction bulb and leaving the synapse (Bixby, 1981). The loss of nerve territory is concomitant with the transformation from an oval, AChR plaque to the branched-shaped structure (Balice-Gordon & Lichtman, 1993). Two fundamental characteristics seem to underlie the process of synapse elimination. First, is that the muscle mediates the competitive interaction among axons and second, electrical activity affects the intensity of competition (for a review see Sanes & Lichtman, 1999).

The *mdx* mice show a deficiency of dystrophin, a 400 kDa protein that is part of the

cytoskeletal network of the postsynaptic sarcolemma. The C termini of dystrophin binds to a complex of glycoproteins, such as α -Dystrobrevin-2, syntrophin and neuronal nitric oxide synthase and this complex links subsarcolemmal cytoskeleton to the basal lamina (Ervasti & Campbell, 1991). Interesting, not only dystrophin is diminished in the *mdx* mice, but also all the other proteins that are part of the complex are somehow affected by the lack of dystrophin (Ervasti *et al.*, 1990; Ohlendieck & Campbell, 1991). In dystrophin-deficient fibers of *mdx* mice and in Duchenne dystrophy, the lack of dystrophin is associated with increased levels of calcium in the muscle fiber, leading to muscle degeneration (Bertorini, 1982), showing that this complex is important to sarcolemmal stabilization (Hoffman *et al.*, 1987; Bonilla *et al.*, 1988). The lack of dystrophin and/or of the proteins of its complex is also associated to accelerated rates of AChRs degradation in the *mdx* mice, suggesting that this postsynaptic cytoskeleton complex may also be required for neuronal stabilization of receptors (Xu & Salpeter, 1997).

The adult *mdx* mice also present changes in acetylcholine receptors distribution (Torres & Duchen, 1987; Lyons & Slater, 1991). It was suggested that these alterations were not related to the absence of dystrophin, but rather were typical of regenerated muscle fibers. In fact, regenerated fibers that normally express dystrophin exhibited changes in AChRs distribution similar to that seen in the *mdx* (Minatel *et al.*, 2001), but an ideal situation would be to verify receptors distribution in dystrophic fibers before the onset of degeneration-regeneration cycles.

In this study we investigated whether AChRs distribution and synapse elimination are altered in dystrophin-deficient fibers of the *mdx* mice, *in vivo*, during the normal course of their postnatal development, before the cycles of degeneration and regeneration increased.

We observed a marked effect on the rate of synapse elimination, but no changes in AChRs distribution. This suggests that an intact dystrophin-glycoprotein complex may be required for the normal time course of synapse elimination, but not for the developmental changes of AChRs distribution.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Neonatal *mdx* and C57BL/10 mice were obtained from breeding colonies established in our animal care facility. Pregnant females were isolated and checked daily. The date of birth was designated postnatal day 0 (P0). Forty animals (20 *mdx* and 20 controls, 5 animals for each age studied) were used for confocal microscopy and twelve *mdx* mice (3 animals for each age studied) were used for light microscopy.

Light microscopy

One, 7, 14 and 21 days after birth, the sternomastoid muscles (STNs) were removed and stained with hematoxylin and eosin (HE) for evaluation of muscle fiber regeneration. Briefly, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (0.6 mg/kg) and perfused intracardially with phosphate-buffered saline (PBS). The STNs were removed, fixed overnight in calcium-formalin, dehydrated in an ethanol series and embedded in historesin. Five μm thick transverse sections were stained with HE and examined with a light microscope. The number of normal and regenerated muscle fibers (indicated by the presence of central cell nuclei) was counted using a hand counter.

Confocal microscopy

One, 7, 14 and 21 days after birth, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate and perfused intracardially with PBS followed by freshly prepared cold fixative (2% formaldehyde in PBS). Right and left sternomastoid (STN) muscles were removed, placed in a sylgard dish and washed with PBS. The muscles

were incubated with rhodamine-alpha-bungarotoxin (Rh-BTX; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; 1 µg/ml) for receptors and anti-neurofilament (Sigma; Saint Louis, Missouri, USA; 1:500 in blocking solution) followed by anti-mouse IgG-fluorescein (Sigma; Saint Louis, Missouri, USA; 1:500), for nerve terminals staining. After washing with PBS, the muscles were mounted in 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO; mounting media for fluorescence microscopy, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) and then observed with a confocal microscope.

A dual-channel BioRad laser confocal system (MRC 1024UV) mounted on an Axiovert 100 Zeiss inverted microscope and equipped with Ar-Kr lasers were used. A wavelength of 568 nm was used to excite the rhodamine-labeled receptors and 488 nm was used to excite fluorescein. The settings for contrast, brightness, and iris diameter were adjusted and kept constant during all observations of control and *mdx* muscles. A 63X and 100X 1.4 NA oil immersion Zeiss objective were used for confocal imaging. An index of junctional area was measured by taking the product of the maximum length of the junction in the long axis of the muscle fiber and the maximum width of the junction in the orthogonal axis.

RESULTS

Shape of junctional AChRs aggregates

It is known that, during the first two weeks after birth, AChRs distribution changes from a plaque to a pretzel-like shape, typical of adult (Steinbach, 1981; Balice Gordon & Lichtman, 1993; Marques *et al.*, 2000). In the plaque, AChRs are homogeneously distributed (plaque endplates) and as synapse elimination progresses, the loss of AChRs leave fainter areas within the plaque, which became perforated by holes (perforated endplates). The holes seem to coalesce and break the endplate area into branches that ultimately give raise to the adult pattern distribution of AChRs.

Junctions stained with α -BTX-Rh were qualitatively assigned to three groups (see Fig.1): plaque (Fig.1A), perforated (Fig.1B) and adult (Fig.1C). As shown in Table 1, the plaque was the predominant shape in neonatal (P01 and P07) *mdx* and control animals. Perforated plaques were mainly seen on P14, in controls. The *mdx* mice showed more perforated forms during earlier neonatal period (P01, P07). The adult junctional shape appeared about 14 days postnatal in the *mdx* (Table 1) and was the only morphological type seen at P21 in controls.

In adult *mdx* muscles, AChRs are distributed into islands of receptors, instead of the pretzel-shape form (see Fig.1D; Lyons & Slater, 1991; Minatel *et al.*, 2001) and this pattern of distribution had been associated with muscle fiber degeneration-regeneration, a phenomenon that typically occurs in the *mdx* mice after 3 weeks of birth (Cullen & Jaros, 1988; Mokhtarian *et al.*, 1995; Mokhtarian *et al.*, 1999), which is in agreement with our results in that an increase in the number of fibers with central cell nuclei was seen

beginning 21 days after birth (Table 2). Thus, we also seek the presence of such receptors islands during the early steps of junction formation. Few endplates with AChRs islands were seen beginning on P14, in the *mdx* mice, but most of the junctions displayed a normal pattern of receptor distribution (Table 1; Fig.2C,D). Acetylcholine receptor area increased over time, as expected and no differences were seen between controls and *mdx* (Table 3).

Junctional innervation

As already reported for the sternomastoid muscle (Balice-Gordon & Lichtman, 1993) most of the neonatal control muscle fibers were innervated by more than one axon on P01 and P07 (86% and 58.6% respectively; see Table 4). The elimination of multiple innervation was essentially completed by 14 days postnatal (5.3% of multiple innervation). In the *mdx* mice, half of the fibers were already monoinnervated on P01 (58% of monoinnervation; see Table 4). The process of synapse elimination was almost completed on P07 (87% of monoinnervation; see Table 4) and no multiple innervated fibers were seen 14 days after birth (Table 4).

The pattern of junctional innervation in early neonatal (P01) *mdx* and control mice was rather complicated by the presence of several nerve bundles, which seem form bright agglomerations of axons near the AChRs rich areas and appeared to be highly intermingled (Fig.3). Generally, pre-terminal profiles varied from very thin to thicker structures (Fig.3B) directed towards the AChRs plaques. At most of the endplates studied (200 *mdx* and 200 controls) nerve terminals typically displayed bulbous enlargements or dilatations connected by thin process (Fig.3C,D). These bulbs varied from $3.64 \pm 2.07 \mu\text{m}^2$ (control and *mdx*

P01) to $6.17 \pm 2.85 \mu\text{m}^2$ (control P07) and $7.72 \pm 2.72 \mu\text{m}^2$ (control P14). No breaks in the outlines of the AChRs plaque were seen in *mdx* and control mice.

On P07, pre-terminal axons were easier to be individualized, showing a more uniform width, not so large as on P01, but still showing thicker filaments together with very thin profiles, usually towards the same endplate area (Fig.4A,B). Bulbous enlargements were seen most frequently in controls (Fig.4C,D) than in *mdx* mice (Fig.2A,B). In the late postnatal life (P14) nerve terminals covered AChRs branches in a similar pattern of adults (P21; Fig.5) with a uniform diameter along its length. A break in the outline of the AChR area was seen (see asterisk in Fig.5).

DISCUSSION

The *mdx* mice show a deficiency of dystrophin, a protein that is part of a multimolecular complex that links the extracellular matrix to the cytoskeleton (the dystrophin-glycoprotein complex or DGC) that includes dystroglycan, dystrobrevin and syntrophins (Ervasti & Campbell, 1991). The absence of dystrophin greatly reduces the concentration of dystrophin-associated proteins in skeletal muscle (Ohlendieck & Campbell, 1991). At the neuromuscular junction, the DGC is present, dystrophin is particularly concentrated in synaptic troughs (Bewick *et al.*, 1992) and a dystrophin-related protein named utrophin also binds to the DGC (Blake *et al.*, 1996). The absence of dystrophin is related to morphological abnormalities of the neuromuscular junction (Torres & Duchen, 1987; Lyons & Slater, 1991) and changes in the rate of degradation of adult AChRs (Xu & Salpeter, 1997).

At the present we show that the shape of AChRs aggregates changes during normal development in dystrophin-deficient fibers, in a similar way as that observed in normal fibers of the sternomastoid muscle (Steinbach, 1981; Balice-Gordon & Lichtman, 1993, Marques *et al.*, 2000). We observed that the receptor-dense plaque is followed by a transitional period in which different degrees of perforations appear in the plaques (perforated) leading to the normal pretzel-like shape of adults. This suggests that dystrophin is not required for the developmental changes of receptor distribution seen in the early life. *In vitro* studies also showed that dystrophin is not required for the initial formation of AChRs aggregates (Sealock *et al.*, 1991; Kong & Anderson, 1999).

In *mdx* adults, almost all the neuromuscular junctions are characterized by a breakdown in the branched-pattern receptor distribution, leading to formation of islands of receptors, a phenomenon suggested to be associated to muscle fiber regeneration, rather than absence of dystrophin (Lyons & Slater, 1991, Minatel *et al.*, 2001). Interesting, young adults, such as we observed here (P14, P21) did show the pretzel-shape form typically seen in normal adults, at most of the endplates viewed at this time. A few endplates displaying receptors distributed into islands were first seen on P14, as well as normal endplates at the neighboring fibers (see Fig. 2A), the same happening on P21. This suggests that, even in the absence of dystrophin, the pattern of AChR distribution did not change in adult muscles, supporting the fact that dystrophin may not be required for AChR normal distribution even in the adult. At the age of P14, we observed the first signs of muscle degeneration-regeneration, which is in agreement to reports in the literature (Anderson *et al.*, 1987) and this may explain the islands of receptors present at this time. In conclusion, the changes in AChR distribution that takes place during normal development of the neuromuscular junction are not affected by the absence of dystrophin or a normal DGC.

During the first two weeks after birth, while AChRs distribution changes, the synapses change from multiple to monoinnervated. In normal muscles, most of the neuromuscular junctions were multiply innervated 1 and 7 days after birth and by the end of the second week, all the synapses were monoinnervated. This is in agreement with previous *in vivo* observations of the sternomastoid neuromuscular junctions over time (Balice-Gordon & Lichtman, 1993).

The most striking finding of the present investigation was that most of the *mdx* junctions were already monoinnervated 1 and 7 days postnatal. Thus, the time course of synapse elimination changed in the dystrophin-deficient fiber, in a way that neuromuscular

junctions became monoinnervated earlier than normal fibers. In agreement to that is the fact that AChRs changes in distribution were faster in *mdx* than normal mice, the *mdx* attaining the pretzel form earlier. Therefore, this suggests that dystrophin, or an intact dystrophin-glycoprotein complex, is required for the normal time course of synapse elimination.

In the phenomenon of synapse elimination, motor axons that initially co-innervate the same muscle fibre lose some of their connections during early postnatal life, leaving fibres singly innervated. Two fundamental characteristics of the synapse elimination process are the fact that muscle mediates competitive interaction among axons and electrical activity affects the intensity of competition. The fundamental question in this process is the nature of the signals that mediate the competition and the possibilities that have been raised involve retrograde influences from the muscle to the nerve terminal (for a review see Sanes & Lichtman, 1999).

One possibility suggests that muscle releases a toxic factor and axons are able (or not) to escape to it, depending on their activity. One suggestion is that the toxic factor is a protease, whose activity is held in check by endogenous inhibitors. It had been proposed that calcium-activated neutral proteases destabilize nerve terminals, leading to their elimination (Tyc & Vrbova, 1995; Swanson & Vrbova, 1987). The lack of dystrophin and the reduction of dystrophin-related proteins (Ohlendieck *et al.*, 1991) may also weaken the mechanical stability of the postsynaptic membrane. This may explain the fact that the membrane of *mdx* mice is leakier to calcium, resulting in an elevation of intracellular free calcium (Turner *et al.*, 1993) and muscle fiber degeneration (Leonard & Salpeter, 1979). Therefore, one possibility to explain the earlier synapse elimination process could be the increased calcium influx in *mdx* fibers leading to increased protease activity. However, muscle fiber degeneration triggered by increased calcium influx is not observed on P01 and

P07, which would suggest that calcium influx is not increased in these earlier days. Possibility, at these ages the animals are not yet under great motor activity which is believed to activate the process of muscle degeneration, only seen at the time of weaning (Cullen & Jaros, 1988; Mokhtarian *et al.*, 1995; Mokhtarian *et al.*, 1999).

Recently, accelerated synapse loss has also been observed in the neonatal rat levator auris longus muscle, and *in vivo* (Lanuza *et al.*, 2001), when exogenous thrombin or protein kinase C system (PKC) activators were used, being suggested that synapse elimination in neonatal muscle may be modulated at least in part, by G-protein and PKC activity. PKC is activated by calcium and phospholipids, so it might be activated directly by calcium influx or indirectly by calcium-activated production of diacylglycerol. Therefore, PKC activity would be increased in the *mdx*, accelerating the synapse loss during normal development.

It had been suggested that agrin may function as a protease inhibitor (Biroc *et al.*, 1993). Agrin is a nerve derived factor major organizer of post-synaptic differentiation (Bowe & Fallon, 1995). It binds to dystroglycan, which in turn associates with the cytoskeletal complex that includes dystrophin, utrophin and dystrobrevin. One possibility would be that in *mdx* mice, given the alteration in their cytoskeleton, agrin is not able to bind correctly and perform its function as a protease inhibitor. For instance, it had been demonstrated that both spontaneous and agrin-induced AChR clustering activities on cultured *mdx* myotubes were very markedly reduced as compared to that on wildtype myotubes (Kong & Anderson, 1999).

Another possibility to explain the retrograde influences from muscle to axon would be local alterations that occur at the postsynaptic membrane, leading to heterogeneous regions within the plaque (Sanes & Lichtman, 1999). For instance, the levels of AChRs, rapsyn and utrophin begin to decline at sites of synapse removal before the overlying nerve

terminal withdraws (Balice-Gordon & Lichtman, 1993; Culican *et al.*, 1998). AChRs become stabilized perinatally and their half life in the postsynaptic membrane increases from approximately 1 day to 10 days. It had been suggested that this stabilization reflects a change in the association of AChRs with basal lamina or cytoskeletal components (Salpeter & Loring, 1985). Thus, it would be possible that the lack of dystrophin and the reduction of dystrophin-related proteins seen in the *mdx*, may lead to changes in AChRs density or stabilization in neonatal fibers. However, no changes in the turnover rate of embryonic *mdx* AChRs were observed (Xu & Salpeter, 1997), and receptor density is maintained at relatively normal levels in adult *mdx* muscles (Lyons & Slater, 1991). In addition, no changes in AChRs were reported to occur in knockout mice in which different components of dystrophin-complex missing (Grady *et al.*, 1997; Akaaboune *et al.*, 2001). Thus, changes in the levels of AChRs may not be directly involved in the alterations in the time course of synapse elimination observed here.

One retrograde signal for activity-dependent suppression of polineuronal innervation in the neuromuscular junction is nitric oxide (NO). This action of NO, which is probably mediated by cGMP, may contribute to the elimination of polyneuronal innervation of muscle fibers during development (Wang *et al.*, 1995), since enhanced NO generation provides feedback information about the functional state of the neuromuscular junction to presynaptic nerve terminals (Urazaev *et al.*, 1997). In the *mdx* mice, the levels of nNOS (neuronal nitric oxide synthase) are greatly reduced; so are the levels of nNOS mRNA in *mdx* muscles (Chang *et al.*, 1996), which could impair this type of retrograde influence of the muscle to the terminal. Recently, it had been demonstrated that NO serves as a downstream mediator of agrin induced AChR aggregation and that NOS inhibitors prevented agrin induced AChR aggregation and phosphorylation of its beta subunit (Jones

& Werle, 2000). In addition to its function on AChRs clustering, it has been shown that agrin is also produced by the muscle fiber and may have functions in organizing the cytoskeletal protein components of the dystrophin-complex (Moll *et al.*, 2001). Thus, the lack of NO in *mdx* fibers might possibly interfere with other actions of agrin on the neuromuscular junction. For instance, it had been shown that nerve terminals of agrin-mutant deficient mice fail to arborize (Sanes *et al.*, 1998). Thus, it would be possible that, in the *mdx* mice, the lower number of multiply-innervated junctions could be due to a poor terminal sprouting, rather than to a faster synapse elimination process. Future studies on embryonic *mdx* muscles should help resolve this issue.

In conclusion, we show that postnatal changes in AChRs pattern of distribution, investigated in dystrophin-deficient muscles before the onset of muscle fiber degeneration-regeneration, proceeds normally. This suggests that dystrophin or an intact DGC is not essential for AChR distribution. On the other hand, the elimination of polyneuronal innervation was faster in dystrophic animals, possibly related to the increased calcium influx normally seen in dystrophic muscle and/or a mechanical instability between nerve terminals and postsynaptic membrane, due to alterations in the DGC. Another possibility raised is that developing nerve terminals in dystrophic animals present less sprouts, resulting in a lower number of multiple innervated fibers.

BIBLIOGRAPHY

Akaaboune M, Grady RM, Sanes JR, Lichtman JW. Role of postsynaptic proteins on acetylcholine receptor density and mobility studied at neuromuscular junctions in living mice. Neuroscience Meeting Abstract, 2001.

Anderson JE, Ovalle WK, Bressler BH. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the *mdx* mouse. *Anat Rec* 1987;219:249-257.

Balice-Gordon RJ, Lichtman JW. In vivo observations of pre- and postsynaptic changes during the transition from multiple to single innervation at developing neuromuscular junctions. *J Neuroscience* 1993;13(2):834-855.

Bertorini TE, Bhattacharya SK, Palmieri GMMA, Chesney CM, Pifer D, Baker B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 1982;32:1088-1092.

Bewiki GS, Nicholson LV, Yong C, O'Donnell E, Slater CR. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *NeuroReport* 1992;3:857-860.

Biroc SL, Payan DG, Fisher JM. Isoforms of agrin are widely expressed in the developing rat and may function as protease inhibitors. *Dev Brain Res* 1993;75:119-129.

Bixby JL. Ultrastructural observations on synapse elimination in neonatal rabbit skeletal muscle. *J Neurocytol* 1981;10:81-100.

Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathology* 1996;6:37-47.

Bonilla E, Samit CE, Miranda AF, Hays AP, Salviati G, DiMauro S, Kunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP. Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 1988;54:447-452.

Bowe MA, Fallon JR. The role of agrin in synapse formation. *Annu Rev Neurosci* 1995;18:443-462.

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.

Colman H, Nabekura J, Lichtman JW. Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. *Science* 1997;275:356-361.

Culican SM, Nelson CC, Lichtman JW. Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. *J. Neurosci* 1998;18:4953-4965.

Cullen MJ, Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 1988;77:69-81.

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

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

Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997;90:729-738.

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

Jones MA, Werle MJ. Nitric oxide is a downstream mediator of agrin-induced acetylcholine receptor aggregation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2000;16:649-660.

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

Lanuza MA, Garcia N, Santafe M, Nelson PG, Fenoll-Brunet MR, Tomas J. Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. *Journal of Neuroscience Research* 2001;63(4):330-340).

Leonard JP, Salpeter MM. Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. *J Cell Biol* 1979;82:811-819.

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

Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience* 2000;20:3663-3675.

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.

Mokhtarian A, Lefaucheur JP, Even PC, Sebillé A. Effects of treadmill exercise and high-fat feeding on muscle degeneration in mdx mice at the time of weaning. *Clinical Science* 1995;89(4):447-452.

Mokhtarian A, Lefaucheur JP, Even PC, Sebillé A. Hindlimb immobilization applied to 21-day-old mdx mice prevents the occurrence of muscle degeneration. *Journal of Applied Physiology* 1999;86(3):924-931.

Moll J, Barzaghi P, Lin S, Bezakova G, Lochmüller H, Engvall E, Müller U, Rüegg MA. An agrin minigene rescues dystrophic symptoms in a mouse model for congenital muscular dystrophy. *Nature* 2001;413(6853):302-307.

Ohlendorf K, Ervasti JM, Matsumura K, Kahl SK, Leveille CJ, Campbell KP. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* 1991;7:499-508.

Salpeter MM, Loring RH. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. *Prog Neurobiol* 1985;25:297-325.

Sanes JR, Apel ED, Burgess RW, Emerson RB, Feng G, Gautam M, Glass D, Grady RM, Krejci E, Lichtman JW, Lu JT, Massoulié J, Miner JH, Moscoso LM, Nguyen Q, Nichol M, Noakes PG, Patton BL, Son YJ, Yancopoulos GD, Zhou Heather. Development of the neuromuscular junction: Genetic analysis in mice. *J Physiology (Paris)* 1998;92:167-172.

Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 1999;22:389-442.

Sealok R, Butler MH, Kramarcy NR, Gao KX, Murnane AA, Douville K, Froehner SC. Localization of dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. *J Cell Biol* 1991;113:1133-1144.

Slater CR. Postnatal maturation of nerve muscle junctions in hindlimb of the mouse. *Developmental Biology* 1982;94(1):11-22.

Snyder WDL, Lichtman JW. Are neurotrophins synaptotrophins? *Mol Cell Neurosci* 1996;7:433-442.

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

Swanson GJ, Vrbova G. Effects of low calcium and inhibition of calcium-activated neutral protease (CANP) on mature nerve terminal structure in the rat sternocostalis muscle. *Brain Res* 1987;430:199-203.

Torres LFF, Duchen LW. The mutant mdx: Inherited myopathy in the mouse. *Brain* 1987;110:269-299.

Turner PR, Schultz R, Ganguly B, Steinhardt RA. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membr Biol* 1993;133:243-251.

Tyc F, Vrbova G. Stabilisation of neuromuscular junctions by leupeptin increases motor unit size in partially denervated rat muscles. *Dev Brain Res* 1995;88:186-193.

Urazaev AKH, Naumenko NV, Poletayev GI, Nikolsky EE, Wyskocil F. Acetylcholine and carbachol prevent muscle depolarization in denervated rat diaphragm. *NeuroReport* 1997;8:403-406.

Wang T, Zuopin X, Lu B. Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature* 1995;374:262-266.

Xu R, Salpeter MM. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. *J Neurosci* 1997;17:8194-8200.

LEGENDS

Figure 1. Acetylcholine receptors distribution is normal at the neuromuscular junctions of *mdx* mice, during development. Receptors were labeled with rhodamine- α -bungarotoxin. Plaques of receptors are seen 1 day after birth (A). Perforations, represented by dark areas in the plaque (B-P07) were followed by the formation of branches of receptors (C-P21), typical of adults. In a few endplates on P21, receptors were breaking apart into islands (D). Scale bar equals to 10 μ m.

Figure 2. Late neonatal innervation in the sternomastoid muscle of *mdx* mice: postnatal days 07 (A,B) and 14 (C,D). Sternomastoid muscles were stained for neurofilaments at nerve terminals (green) coupled with rhodamine- α -bungarotoxin staining of the postsynaptic clusters (red). Neuromuscular junctions innervated by two axons are seen (A,B-arrow). In C, a neuromuscular junction with islands of receptors (arrow) is seen together with normal endplates. The pattern of monoinnervation predominates on postnatal day 14 (D). Scale bar in D equals to 10 μ m. Bars in μ m.

Figure 3. Early neonatal innervation in the sternomastoid muscle of *mdx* mice (A,B e C) and control mice (D): postnatal day 01. Neurofilament staining of nerve terminals (green) and rhodamine- α -bungarotoxin for receptors (red). Nerve terminal profiles are highly intermingled at the endplate region (A, B, C). Very thin terminal profiles (arrow-B) and thicker are seen at the same time. Bulbs (arrow-C,D) are frequently present. Bars in μ m.

Figure 4. Neonatal innervation in the sternomastoid muscle of *control* mice, 07 days after birth. A, B show endplates innervated by more than one axon (arrow). C,D show the presence of bulbs (arrows). Scale bar in μm (the scale in C apply to A, B e D).

Figure 5. AChRs (red) and nerve terminal (green) distribution in adult neuromuscular junctions (P21) of control (upper panels) and *mdx* (lower panels) mice. Note the perfect colocalization of nerve terminals and receptors. Asterisk indicates the side of the endplate in which a break in the outline of the AChR patch is seen. Bar equals to 10 μm .



Figure 1.

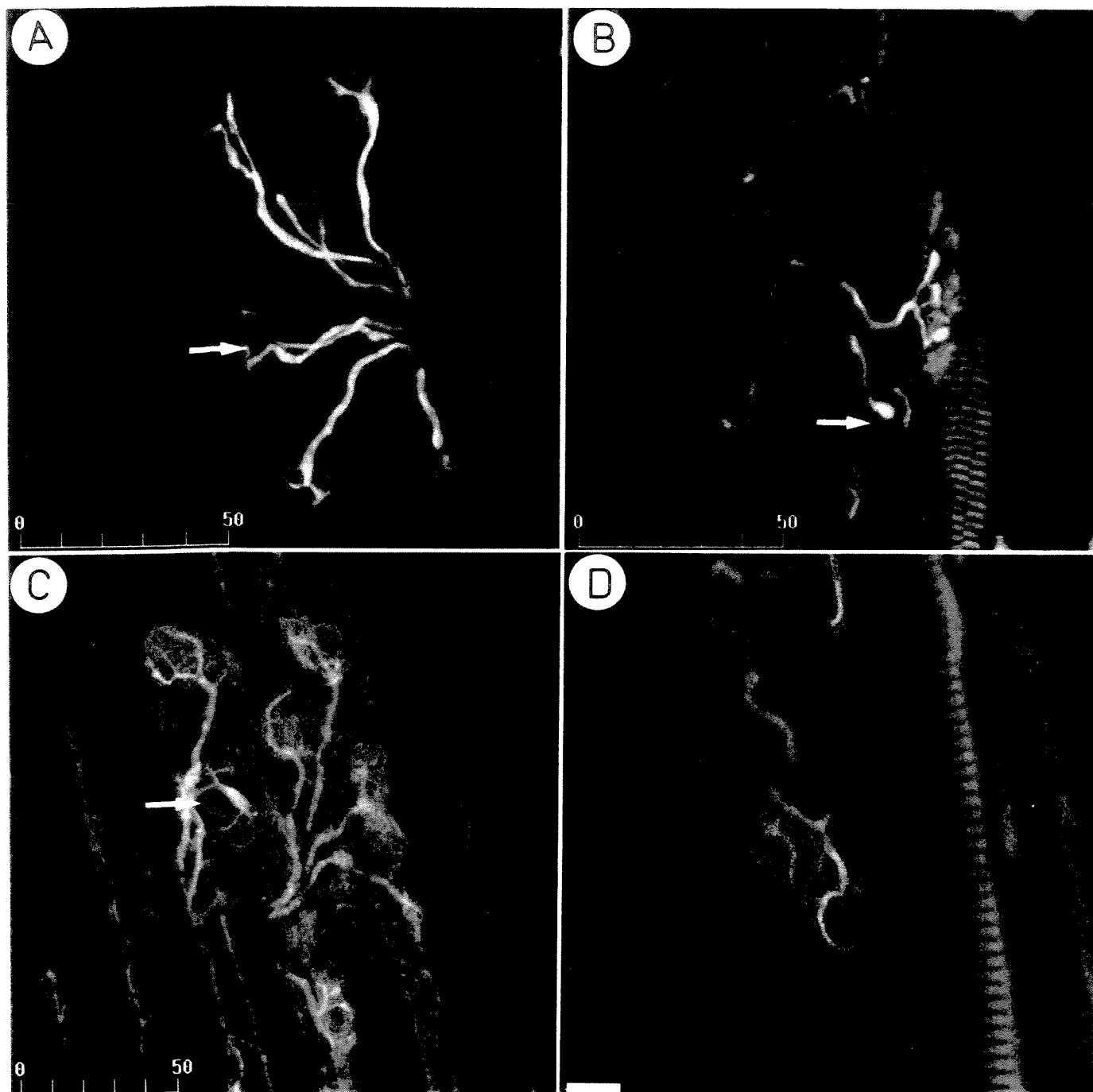


Figure 2.

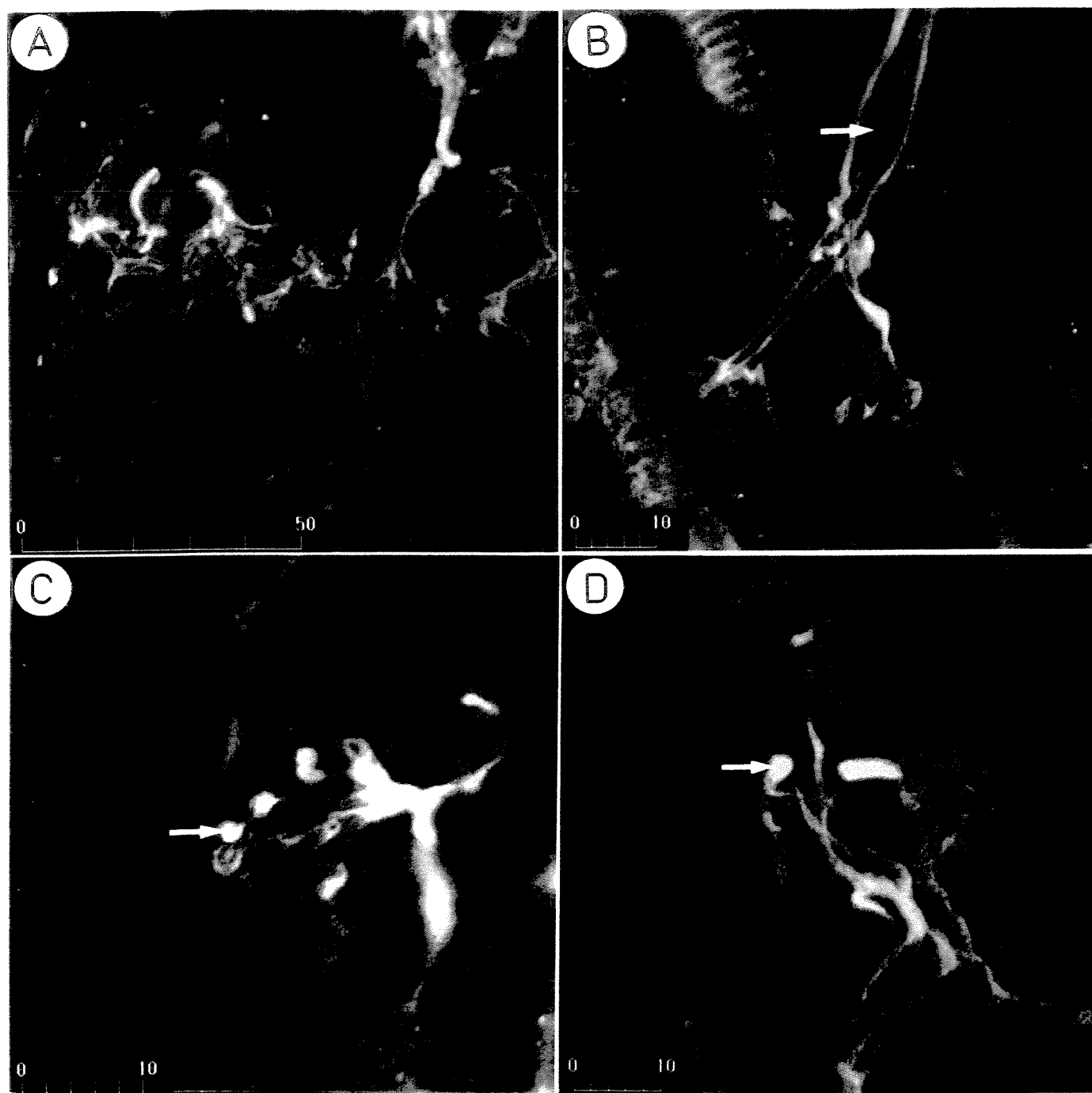


Figure 3.

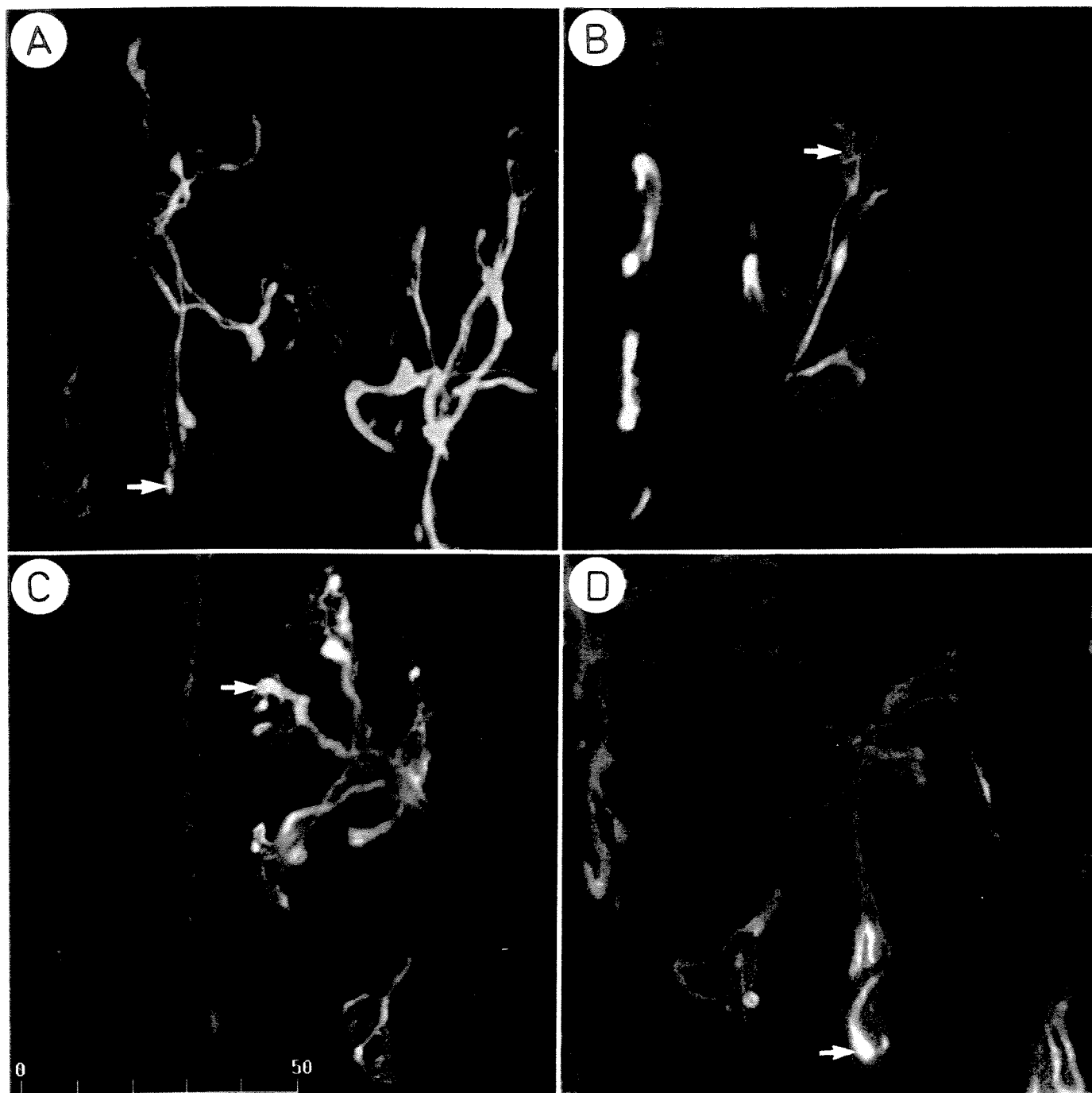


Figure 4.

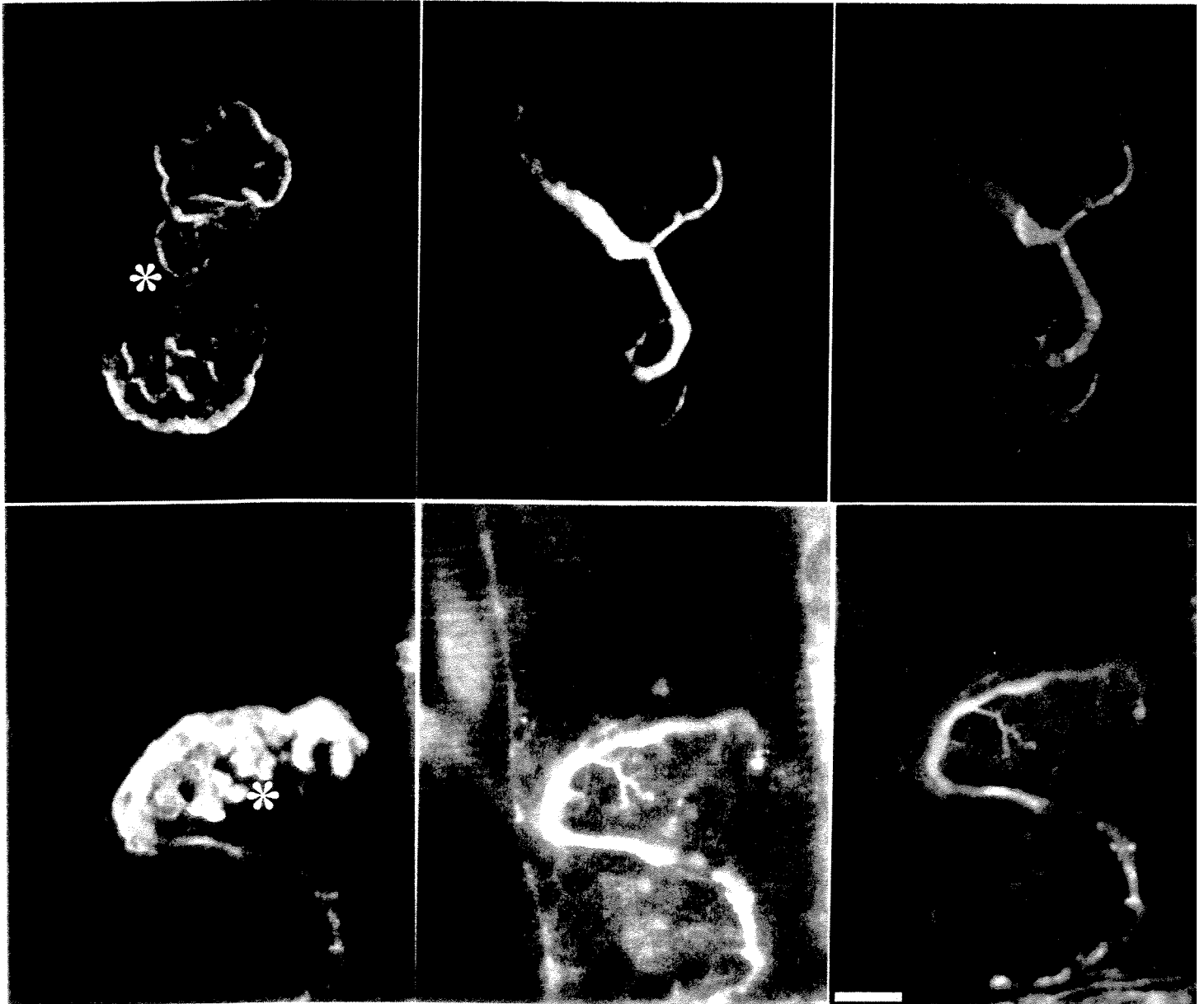


Figure 5.

Table 1. Pattern of acetylcholine receptor distribution during postnatal (P) development (days), in control (C57BL/10) and mdx mice.

C57BL/10	PLAQUE	PERFURATED	ADULT	ISLANDS
P1	98% $\pm$ 13.30	2% $\pm$ 0.71		
P7	92% $\pm$ 11.71	7,3% $\pm$ 3.05		
P14	0,66% $\pm$ 0	26% $\pm$ 4.00	73% $\pm$ 9.11	
P21			100% $\pm$ 9.05	

Values reported are mean $\pm$ SD (n= 200 endplates/age).

MDX	PLAQUE	PERFURATED	ADULT	ISLANDS
P1	83,3% $\pm$ 9.51	16,6% $\pm$ 2.16		
P7	80,6% $\pm$ 8.01	18,6% $\pm$ 1.41	0,66% $\pm$ 0	
P14		4% $\pm$ 1.73	87,3% $\pm$ 9.00	8,6% $\pm$ 1.14
P21			86,7% $\pm$ 7.90	13,3% $\pm$ 1.19

Values reported are mean $\pm$ SD (n= 200 endplates/age).

Table 2. The percentage of fibers with central cell nuclei during postnatal (P) development (days) in mdx mice.

MDX	FIBERS WITH CENTRAL NUCLEI
P7	0,62%
P14	2,20%
P21	5,23%

Table 3. Changes in AChR area (μm^2) of the neuromuscular junction during postnatal development.

MICE	P1	P7	P14	P21
MDX	132,1 $\pm$ 48,1	201,1 $\pm$ 70,2	370,5 $\pm$ 135,9	545,4 $\pm$ 161,0
C57BL/10	163,5 $\pm$ 48,6	196,6 $\pm$ 74,1	278,9 $\pm$ 79,5	410,1 $\pm$ 128,6

Values reported are mean $\pm$ SD (n= 100 endplates/age). There was no difference in AChRs area between normal and *mdx* mice ($p < 0.05$; Student's t test).

Table 4. Comparison of monoinnervation at developing nmjs in control and *mdx* mice.

MICE	P1	P7	P14	P21
MDX	58% (5.92; 200)	86,7% (0.71; 200)	100% (0; 200)	100% (0; 200)
C57BL/10	14% (11.28; 200)	41,4% (9.42; 200)	94,7% (1.75; 200)	100% (0; 200)

The percentage of end-plates with single input is presented. Numbers in parentheses: (SD, number of end-plates studied).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Padrão de distribuição dos AChRs

No presente trabalho demonstramos que as mudanças que ocorrem na distribuição dos AChRs durante o desenvolvimento dos animais distróficos são similares às observadas em animais normais (STEINBACH, 1981; BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993; MARQUES *et al.*, 2000). Nós observamos que os AChRs inicialmente aparecem como placas compactas, seguido por um período de transição, no qual surgem falhas no interior dessas placas (placas perfuradas) e a seguir estabelece-se o padrão de distribuição normal da fase adulta. Isto sugere que a distrofina pode não ser necessária durante o desenvolvimento inicial da distribuição dos AChRs. Dados da literatura parecem sustentar essa sugestão. Assim, sabe-se que estudos *in vitro* também demonstraram que a distrofina não é requisitada para a formação inicial dos agregados de AChRs (SEALOCK *et al.*, 1991; KONG & ANDERSON, 1999).

No *mdx* adulto a maioria dos AChRs encontram-se fragmentados, distribuídos em pequenas ilhas. Foi sugerido que tais alterações são típicas de fibras musculares regeneradas (LYONS & SLATER, 1991; MINATEL *et al.*, 2001). Interessante, é que no *mdx* jovem (P14 e P21) nós observamos que a maioria dos AChRs apresentavam o padrão normal de distribuição (braços contínuos). Observamos um número pequeno de junções que apresentavam os AChRs distribuídos em ilhas. No período de 14 dias, nós observamos os primeiros sinais da degeneração/regeneração muscular no animal distrófico, concordando com a literatura (ANDERSON *et al.*, 1987) e este fato pode explicar a presença de ilhas de receptores neste período. Isto sugere que a distrofina pode também não ser requisitada na distribuição normal dos AChRs no adulto. Desta forma, concluímos que a distribuição dos

AChRs durante o desenvolvimento da junção neuromuscular não é afetada pela deficiência de distrofina nos animais *mdx*.

Eliminação Sináptica

A descoberta mais importante do presente trabalho foi que no período de 1 e 7 dias de vida pós-natal, a maioria das junções neuromusculares do camundongo *mdx* já se encontra monoinervada. Desta forma, a eliminação sináptica no *mdx* ocorre mais cedo quando comparada a de um animal normal. Isto sugere que a deficiência da distrofina ou a redução de proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas no animal distrófico pode interferir no tempo da eliminação sináptica.

Duas características fundamentais parecem estar envolvidas no fenômeno da eliminação sináptica: primeiro o músculo media a interação competitiva entre os axônios e segundo, a atividade elétrica afeta a intensidade da competição. A questão central é a natureza dos sinais envolvidos e as possibilidades que foram levantadas envolvem influência retrógrada do músculo para o terminal (para revisão ver SANES & LICHTMAN, 1999).

Uma primeira possibilidade poderia ser de que o músculo libera fatores tóxicos e os axônios são capazes (ou não) de escapar destes fatores, dependendo de sua atividade. Uma sugestão é que o fator tóxico seja uma protease. Tem sido proposto que o cálcio ao ativar proteases neutras, poderia desestabilizar os terminais nervosos e promover sua retração (TYC & VRBOVA, 1995; SWANSON & VRBOVA, 1987). Desta forma, a eliminação sináptica precoce observada no animal distrófico poderia ser devida ao aumento no influxo de cálcio, o que é observado nas fibras distróficas (TURNER *et al.*, 1991).

Recentemente, foi sugerido que a atividade da proteína kinase (PKC) pode ser responsável pela modulação da eliminação sináptica em músculos neonatais (LANUZA et al., 2001). A PKC é ativada diretamente pelo influxo de cálcio ou indiretamente pelo diacilglicerol, cuja produção é estimulada pelo cálcio. Desta forma, a atividade PKC pode estar acentuada no *mdx*, acelerando a eliminação sináptica.

Foi sugerido que a agrina atua como inibidora de protease (BIROC et al., 1993). A agrina na junção neuromuscular encontra-se unida a distroglicana, a qual esta associada com o complexo do citoesqueleto, que inclui a distrofina, utrofina, distrobrevina. Assim, uma possibilidade é que no animal distrófico, devido as alterações no complexo distrofina-glicoproteínas, a agrina não seja totalmente capaz de exercer sua função como inibidora de protease.

Sabe-se que a densidade ou estabilidade de moléculas pós-sinápticas, tais como os AChRs, rapsina e utrofina, são importantes para a eliminação, visto que os níveis desta moléculas diminuem nos locais de eliminação sináptica, antes que os terminais retraiam (CULICAN et al., 1998). Pode ser possível que a deficiência de distrofina e a redução de proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas observada no *mdx*, poderia levar a mudanças na densidade dos AChRs ou na estabilização das fibras neo-natais. Entretanto, não foram observadas mudanças no turnover dos AChRs na vida embrionária do animal distrófico (XU & SALPETER, 1997), e a densidade do receptor é mantida relativamente normal nos músculos adultos distróficos (LYONS & SLATER, 1991). Adicionalmente, não foram reportadas mudanças nos AChRs em camundongos com deficiência de diferentes componentes do complexo-distrofina (GRADY et al., 1999; AKAABOUNE et al., 2001). Desta forma, mudanças no nível dos AChRs pode não ter um envolvimento direto nas alterações no tempo do curso da eliminação sináptica que observamos no camundongo *mdx*.

Um sinal retrógrado para supressão da inervação polineuronal na JNM é o óxido nítrico (NO). O NO atua informando o terminal nervoso sobre o estado funcional da JNM (URAZAEV *et al.*, 1997). Desta forma, sua ação pode contribuir para eliminação da inervação polineuronal das fibras musculares durante o desenvolvimento (WANG *et al.*, 1995). No camundongo *mdx*, o nível de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), enzima responsável pela produção do NO, está altamente reduzido (CHANG *et al.*, 1996). Consequentemente, a ação do NO pode estar comprometida no animal distrófico.

Em conclusão, nós demonstramos que a eliminação sináptica ocorreu mais cedo no animal *mdx*. Sugerimos que este fato pode ser explicado pelo aumento no influxo de cálcio normalmente observado no músculo distrófico e/ou devido a uma instabilidade mecânica entre o terminal nervoso e a membrana pós-sináptica, ocasionada por alterações no complexo distrofina-glicoproteínas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AKAABOUNE, M.; GRADY, R.M.; SANES, J.R.; LICHTMAN, J.W. Role of postsynaptic proteins on acetylcholine receptor density and mobility studied at neuromuscular junctions in living mice. Neuroscience Meeting Abstract, 2001.

ANDERSON-CEDERGREEN, E. Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstruction from serial sections. J. Ultrastruct. Res., v.1, p.1-191, 1959.

ANDERSON, M.J.; COHEN, M.W.; Nerve-induced and spontaneous redistribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. J. Physiol., v.268, p.757-773, 1977.

ANDERSON, J.E.; OVALLE, W.K.; BRESSLER, B.H. Electron microscopic and autoradiographic characterization of hindlimb muscle regeneration in the *mdx* mouse. Anat Rec. v.219, p.249-25, 1987.

ANDERSON, J.E.; GARRETT, K.; MOOR, A.; MCINTOSH, L.; PENNER, K. Dystrophy and myogenesis in mdx diaphragm muscle. Muscle Nerve, v.21, p.1153-1165, 1998.

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 Neuroscience, v.13, n.2, p.834-855, 1993.

BERTHIER, C.; BLAINEAU, S. Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. Biology of the Cell, v.89, p.413-434, 1997.

BERTORINI, T.E.; BHATTACHARYA, S.K.; PALMIERI, G.M.M.A.; CHESNEY, C.M.; PIFER, D.; BAKER, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. Neurology, v.32, p.1088-1092, 1982.

BIROC, S.L.; PAYAN, D.G.; FISHER, J.M. Isoforms of agrin are widely expressed in the developing rat and may function as protease inhibitors. Dev Brain Res, v.75, p.119-129, 1993.

BLAKE, D.J.; TINSLEY, J.M.; DAVIES, K.E. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. Brain Pathol., v.6, p.37-57, 1996.

BOCKHOLD, K.J.; ROSENBLAT, J.D.; PARTRIDGE, T.A. Aging normal and dystrophic mouse muscle: analysis of myonenicity in cultures of living single fibers. Muscle Nerve, v.21, 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 (Minneapolis), v.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, v.54, p.447-452, 1988.

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

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

BROWN, M.C.; JANSEN, J.K.S.; VAN ESSEN, D. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. J. Physiol.(Lond.), v.261, p.387-422, 1976.

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

CAMPBELL, K.P.; KAHL, S.D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. Nature, v.338, p.259-262, 1989.

CARBONETTO, S.; LINDENBAUM, M. The basement membrane at the neuromuscular junction: a synaptic mediatrix. Curr. Opin. Neurobiol., v.5, p.596-605, 1995.

CARTAUD, J.; SOBEL, A.; ROUSSELET, A.; DEVAUX, P.F.; CHANGEAUX, J.P. Consequences of alkaline treatment for the ultrastructure of the acetylcholine-receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. J. Cell Biol., v.90, p.418-426, 1981.

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

COLMAN, H.; NABEKURA, J.; LICHTMAN, J.W. Alterations in synaptic strength preceding axon withdrawal. Science, v.275, p.356-361, 1997.

COUTEAUX, R. Motor end plate structure. In: **The Structure and Function of Muscle**. Ed. G.H. Bourne, New York, Academic Press, v.2, p.483-527, 1973.

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., v.272, p.31221-31224, 1997.

CULLEN, M.J.; JAROS, E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. Acta Neuropathol., v.77, p.69-81, 1988.

CULICAN, S.M.; NELSON, C.C.; LICHTMAN, J.W. Axon withdrawal during synapse elimination at the neuromuscular junction is accompanied by disassembly of the postsynaptic specialization and withdrawal of Schwann cell processes. J. Neurosci., v.18, p.4953-4965, 1998.

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

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

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

FRANK, E.; FISCHBACH, G.D. Early events in neuromuscular junction formation in vitro: induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses. J. Cell Biol., v.83, p.143-158, 1979.

GOODEARL, A.D.; YEE, A.G.; SANDROCK, A.W.JR.; CORFAS, G.; FISCHBACH, G.D. ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction. J. Cell Biol., v.130, p.1423-1433, 1995.

GRADY, R.M.; TENG, H.; NICHOL, M.C.; CUNNINGHAM, J.C.; WILKINSON, R.S.; SANES, J.R. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. Cell v.90, p.729-738, 1997.

GRINNELL, A.D. Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junctions. Physiological Reviews, v.75, n.4, p.789-834, 1995.

HAGIWARA, Y.; MIZUNO, Y.; TAKEMITSU, M.; MATSUZAKI, T.; NONAKA, I.; OZAWA, E. Dystrophin-positive muscle fibers following transplantation into mdx nude mice. Acta Neuropathol., v.90, p.592-600, 1995.

HALL, Z.W.; SANES, J.R. Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. Cell, v.72/Neuron, p.99-121, 1993.

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

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

HOFFMAN, E.P. Clinical and histopathological features of abnormalities of dystrophin-based membrane cytoskeleton. Brain Pathol., v.6, p.49-61, 1996.

IRINTCHEV, A.; ZWEYER, M.; WERNING, A. Impaired functional and structural recovery after muscle injury in dystrophy mdx mice. Neuromuscular Disorders, v.7, p.117-125, 1997.

JACKSON, M.J.; JONES, D.A.; EDWARDS, R.H.T. Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, v.147, p.215-221, 1985.

JASMIN, B.J.; CARTAUD, A.; LUDOSKY, M.A.; CHANGEUX, J.P. Asymmetric distribution of dystrophin in developing and adult *Torpedo marmorata* electrocyte: Evidence for its association with the acetylcholine receptor-rich membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.87, p.3938-3941, 1990.

JO, S.A.; ZHU, X.; MARCHIONNI, M.A.; BURDEN, S.J. Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate Ach-receptor gene expression. Nature, v.375, p.158-161, 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., v.271, p.32321-32329, 1996.

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., v.270, p.27305-27310, 1995.

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

LANUZA, M.A.; GARCIA, N.; SANTAFE, M.; NELSON, P.G.; FENOLL-BRUNET, M.R.; TOMAS, J. Pertussis toxin-sensitive G-protein and protein kinase C activity are involved in normal synapse elimination in the neonatal rat muscle. Journal of Neuroscience Research, v.63, n.4, p.330-340, 2001.

LEFAUCHEUR, J.P.; PASTORET, C.; SEBILLE, A. A phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. Anat. Rec., v.242, p.70-76, 1995.

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

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

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

MATTHEWS-BELLINGER, J.; SALPETER, M.M. Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. J. Physiol. (Lond.), v.279, p.197-213, 1978.

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, v.3, p.502-508, 1980.

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

NIGRO, V.; PILUSO, G.; BELSITO, A.; POLITANO, L.; PUCA, A.A.; PAPPARELLA, S.; ROSSI, E.; VIGLIETTO, G.; 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 sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. Hum. Mol. Genet., v.5, p.1179-1186, 1996.

OBERC, M.A.; ENGEL, W.K. Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. Lab. Invest., v.36, p.566-577, 1977.

OHLENDIECK, K.; CAMPBELL, K.P. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. The Journal of Cell Biology, v.115, p.1685-1694, 1991.

OHLENDIECK, K.; ERVASTI, J.M.; MATSUMURA, K.; KAHL, S.K.; LEVEILLE, C.J.; CAMPBELL, K. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. Neuron, v.7, p.499-508, 1991.

PALADE, G.; PALAY, S. Electron microscopic observations of interneuronal and neuromuscular synapses. Anat. Rec., 118, p.346-356, 1954.

PASTERNAK, C.; WONG, S.; ELSON, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. J. Cell Biol., v.128, n.3, p.355-361, 1995.

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

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

PETERS, A.; PALAY, S.L.; WEBSTER, H. de F. The fine structure of the nervous system: The neurons and supporting cells. Philadelphia, Sauders, 406p., 1976.

RYBAKOVA, I.N.; AMANN, K.J.; ERVASTI, J.M. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. J. Cell Biol., v.135, p.661-672, 1996.

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

SADOUTEL-PUCCIO, H.M.; RAJALA, M.; KUNKEL, L.M. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.94, p.12413-12418, 1997.

SALPETER, M.M. Electron microscope radioautoradiography as a quantitative tool in enzyme cytochemistry. II. The distribution of DFP-reactive sites at motor endplates of a vertebrate twitch muscle. J. Cell Biol., v.42, p.122-134, 1969.

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

SANES, J.R. The synaptic cleft of the neuromuscular junction. Dev. Biol., v.6, p.163-173, 1995.

SEALOK, R.; BUTLER, M.H.; KRAMARCY, N.R.; GAO, K.X.; MURNAME, A.A.; DOUVILLE, K.; FROEHNER, S.C. Localization of dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. J Cell Biol v.113, p.1133-1144, 1991.

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

SHOTTON, D.; HEUSER, J.; REESE, B. Postsynaptic membrane folds at the frog neuromuscular junction visualized by scanning electron microscopy. Neuroscience, v.4, p.427-439, 1979.

SICINSKI, P.; GENG, Y.; RYDER-COOK, A.S.; BARNARD, E.A.; DARLINSON, M.G.; BARNARD, P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science, v.244, p.1578-1580, 1989.

SNYDER WDL, LICHTMAN JW. Are neurotrophins synaptotrophins? Mol Cell Neurosci, v.7, p.433-442, 1996.

STEINBACH, J.H. Developmental changes in acetylcholine receptor aggregates at rat skeletal neuromuscular junctions. Dev. Biol., v.84, 267-276, 1981.

SUNADA, Y.; CAMPBELL, K.P. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. Current. Opinion in Neurology, v.8, p.379-384, 1995.

SWANSON, G.J.; VRBOVA, G. Effects of low calcium and inhibition of calcium-activated neutral protease (CANP) on mature nerve terminal structure in the rat sternocostalis muscle. Brain Res, v.430, p.199-203, 1987.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. Acta Neuropathol, v.69, p.91-95, 1986.

THOMPSON, W.J. Activity and synapse elimination at the neuromuscular junction. Cell Mol. Neurobiol., v.5, p.167-182, 1985.

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

TYC, F.; VRBOVA, G. Stabilisation of neuromuscular junctions by leupeptin increases motor unit size in partially denervated rat muscles. Dev Brain Res, v.88, p.186-193, 1995.

TURNER, P.R.; SCHULTZ, R.; GANGULY, B.; STEINHARDT, R.A. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx mice. J. Membr. Biol., v.133, p.243-251, 1993.

UNWIN, N. Neurotransmitter action: Opening of ligand-gated channels. Cell, v.72, p.31-41, 1993.

URAZAEV, A.K.H.; NAUMENKO, N.V.; POLETAYEV, G.I.; NIKOLSKY, E.E.; WYSKOCIL, F. Acetylcholine and carbachol prevent muscle depolarization in denervated rat diaphragm. NeuroReport, v.8, p.403-406, 1997.

VILQUIN, J.T.; BRUSSER, V.; ASSELIN, I.; KINOSHITA, I.; GINGRAS, M.; TREMBLAY, J.P. Evidence of mdx mouse skeletal muscle fragility in vivo by eccentric running exercise. Muscle Nerve, v.21, p.567-576, 1998.

YANG, B.; IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O.; MOOMAW, C.R.; SLAUGHTER, C.A.; CAMPBELL, K.P. Heterogeneity of the 59 kDa dystrophin-associated protein revealed by cDNA cloning and expression. J. Biol. Chem., v.269, p.6040-6044, 1995.

YEADON, J.; LIN, H.; DYER, S.; BURDEN, S. Dystrophin is a component of the subsynaptic membrane. J. Cell Biol., v.115, p.1069-1076, 1991.

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

WEINBERG, C.B.; HALL, Z.W. Junctional form of acetylcholinesterase restored at nerve-free endplates. Dev. Biol., v.68, p.631-635, 1979.

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. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York, Ed. MacMillan Publishing Company, p.66-235, 1985.

WROGEMANN, K.; PENA, S.D.J. Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. Lancet, v.1, p.672-673, 1976.

XU, R.; SALPETER, M.M. Acetylcholine receptors in innervated muscles of dystrophic mdx mice degrade as after denervation. J Neurosci, v.17, p.8194-8200, 1997.

Obs: *De acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)

6023 Agosto/2000.