

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ZARIF TORRES REHDER MENDES

**DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE
ACETILCOLINA E TERMINAIS NERVOSOS NA
JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE FIBRAS
MUSCULARES REGENERADAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Marques

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

MENDES, ZARIF TORRES REHDER

M522d Distribuição dos receptores de acetilcolina e terminais nervosos na junção neuromuscular de fibras musculares regeneradas / Zarif Torres Rehder Mendes. --
Campinas, SP:[s.n.], 2004.

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

1. Músculos -- Regeneração. 2. Nervos -- Receptores. 3. Acetilcolina.
I. Maria Júlia Marques. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 07 de maio de 2004

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Júlia Marques (Orientadora)

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus

Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

DEDICATÓRIA

*À Deus,
Pela minha família*

*Aos meus pais, Germano e Dirlene,
Pelo amor e dedicação de sempre*

*Ao Sérgio,
Pela compreensão, amor e apoio em todas as horas*

*Ao João Otávio,
Pelas alegrias e colaboração nestes nove meses*

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques**, pela orientação e ensinamentos valiosos durante estes dois anos.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto**, pelos conhecimentos e considerações dadas no exame de qualificação.

À **Profa. Evanisi Tereza Palomari** e à **Profa. Ivanira José Bechara**, pelas importantes sugestões dadas no exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus**, ao **Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini** e à **Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato**, pelas importantes considerações no exame de pré-banca deste trabalho.

Às amigas **Cândida Luiza**, **Elaine Minatel**, **Adriana Pertille**, **Viviane Urbini**, **Ana Elisa Stroppa** e **Ana Paula**, pela ajuda, amizade e alegrias em todos os momentos.

Ao **Marco Aurélio Ribeiro de Paula** e **Norivaldo Celestino**, pela colaboração na parte experimental deste trabalho.

Às **Sras. Ana Floriano Rodrigues**, **Lourdes Pinheiro** e **Lilian Alves Senne Panagio**, pela atenção e ajuda durante todo o mestrado

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

Aos funcionários, **Paulo Bernardes, Paulo dos Santos e Carlos Gonçalves**, pela colaboração no bom funcionamento do Departamento.

A todos os **docentes e alunos** do Departamento de Anatomia, pela amizade e agradável convívio nestes dois anos.

À **CAPES, FAPESP, CNPQ e FAEP**, pela concessão de bolsas e financiamento do projeto.

Muito obrigada a todos

SUMÁRIO

Abreviaturas

Resumo

1. Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	4
1.2 Junção Neuromuscular.....	5
1.2.1 Compartimento Pré-Sináptico.....	5
1.2.2 Compartimento Extracelular.....	7
1.2.3 Compartimento Pós-Sináptico.....	9
1.3 Interações Tróficas entre Nervo e Músculo.....	12
1.3.1 Interações entre o Terminal Nervoso e o Receptor de Acetilcolina.....	13
1.3.2 Interações entre o Terminal Nervoso e a Acetilcolinesterase.....	15
1.4 Degeneração e Regeneração Muscular através de Anestésicos Locais.....	18
2. Materiais e Métodos.....	20
2.1 Animais.....	21
2.2 Tratamento com Cloridrato de Lidocaína.....	21
2.3 Delineamento Experimental.....	22
2.3.1 Fibras Musculares Regeneradas.....	22
2.3.2 Fibras Musculares Regeneradas e Desnervadas.....	24
2.3.3 Fibras Musculares Desnervadas.....	25
2.4 Microscopia de Varredura Confocal a Laser.....	26
3. Resultados.....	27

3.1 Fibras Musculares Regeneradas.....	28
3.2 Fibras Musculares Regeneradas e Desnervadas.....	29
3.3 Fibras Musculares Desnervadas.....	30
4. Legenda.....	31
5. Figuras.....	34
Figura 1.....	35
Figura 2.....	36
Figura 3.....	37
Figura 4.....	38
6. Discussão.....	39
7. Referências Bibliográficas.....	43
8. Trabalho a ser submetido à publicação.....	50
Abstract.....	52
Introduction.....	53
Materials and Methods.....	54
Results.....	58
Discussion.....	59
References.....	63
Legends.....	65

ABREVIATURAS

AChRs – receptores de acetilcolina

JNM – junção neuromuscular

ACh - acetilcolina

AChE - acetilcolinesterase

STN – músculo esternomastóideo

DABCO – 1,4-diazabicyclo [2.2.2.] octano

PBS – tampão fosfato

FITC – fluoresceína isotiocianato

IgG – imunoglobulina

Rh-BTX - α -bungarotoxina conjugada à rodamina

NCAM – molécula de adesão celular neural

MDX – distrofia muscular ligada ao cromossomo x

mRNA – RNA mensageiro

RESUMO

No presente trabalho estudamos o padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs) e terminais nervosos em animais C57BL/10, após longo período de regeneração muscular. A degeneração-regeneração muscular foi induzida pelo anestésico local cloridrato de lidocaína no músculo esternomastóideo. Após 90 e 150 dias, os músculos foram retirados e os AChRs e terminais nervosos marcados com rodamina- α -bungarotoxina e anti-neurofilamento, respectivamente e observados através de microscopia de fluorescência confocal. Em todas as junções superficiais da fibra regenerada observada (n=416 junções) os receptores estavam distribuídos em ilhas e a fibra muscular apresentava núcleo central, caracterizando sua regeneração. Os terminais possuíam finas arborizações com dilatações em suas extremidades, situadas no centro das ilhas dos receptores. O padrão de distribuição da acetilcolinesterase foi semelhante ao observado para os AChRs. Nas fibras musculares regeneradas e desnervadas (n=900 junções) os AChRs não estavam distribuídos em ilhas. Esses resultados mostram que os receptores colinérgicos, após longo tempo de regeneração muscular, mantêm o padrão de distribuição em ilhas e o terminal nervoso parece determinar este padrão, provavelmente em consequência de brotamentos intraterminais que ocorrem em presença de regeneração muscular.

1.INTRODUÇÃO

O camundongo da linhagem *mdx* (“x chromosome-linked muscular dystrophy”) apresenta ausência da distrofina, proteína estrutural do sarcolema que, associada com outros componentes, desempenha importante papel na manutenção da estabilidade da fibra muscular (HOFFMAN *et al.*, 1987; BONILLA *et al.*, 1988).

Sugere-se que, com a ausência da distrofina, ocorra aumento da entrada de cálcio na fibra muscular (TURNER *et al.*, 1991) causando degeneração, que nos camundongos jovens da linhagem *mdx* é intercalada com ciclos de regeneração muscular. Além da falta da distrofina, o camundongo *mdx* possui, tal como humanos portadores da distrofia muscular progressiva, altos níveis séricos de piruvato kinase e creatina kinase, sendo utilizado como modelo experimental para o estudo da distrofia muscular de Duchenne (BULFIELD *et al.*, 1984).

As junções neuromusculares (JNM) dos animais distróficos apresentam alteração no padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs), os quais mostram-se fragmentados, originando ilhas de receptores (TORRES & DUCHEN, 1987; LYONS & SLATER, 1991). Esta alteração poderia ser explicada pela ausência da distrofina. Entretanto, mudanças similares são vistas em fibras regeneradas de animais normais, sendo sugerido que este padrão alterado dos receptores seria típico do músculo regenerado e não decorrente da falta de distrofina (MINATEL *et al.*, 2001). Contudo, as alterações no padrão de distribuição dos AChRs em fibras regeneradas normais foram verificadas após curto período de regeneração (21 dias), o que nos levou a formular a hipótese de que, após longo período de regeneração muscular, os AChRs poderiam voltar ao seu padrão normal, o que os diferenciaria do *mdx*.

No presente trabalho verificamos se os receptores voltam ao seu padrão normal de distribuição após um longo período de regeneração muscular (90 e 150 dias). Adicionalmente, verificamos o papel do terminal nervoso no estabelecimento destas alterações, estudando a distribuição dos receptores em fibras musculares regeneradas e desnervadas.

1.1 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos: 1) verificar se os receptores de acetilcolina apresentam padrão normal de distribuição após longo tempo de regeneração da fibra muscular, 2) verificar se ocorrem mudanças na distribuição da acetilcolinesterase, presente na lâmina basal juncional e 3) verificar se, na ausência do terminal nervoso, os AChRs de fibras regeneradas normais também apresentam padrão de distribuição alterado.

1.2. JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

A junção neuromuscular (JNM) é a região de contato entre o terminal nervoso motor e a fibra muscular. É uma região anatômica e funcionalmente diferenciada para a transmissão de um sinal do terminal nervoso para a fibra muscular. Apesar de algumas variações que possam existir na morfologia das JNMs, elas possuem três compartimentos: (1) o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes o terminal nervoso e a célula de Schwann terminal, que envolve a porção não sináptica do terminal; (2) o compartimento extracelular, preenchido pela lâmina basal juncional e (3) o compartimento pós-sináptico, que compreende o sarcolema juncional com os receptores de acetilcolina e o sarcoplasma juncional, que proporciona suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica. No músculo voluntário dos vertebrados, o neurotransmissor é a acetilcolina (ACh), o receptor de acetilcolina (AChR) é do tipo nicotínico e o espaço sináptico contém a acetilcolinesterase (AChE), entre outros componentes (ENGEL, 1994).

1.2.1. COMPARTIMENTO PRÉ-SINÁPTICO

O compartimento pré-sináptico compreende a célula de Schwann terminal e o botão terminal ou terminal nervoso. Os terminais nervosos são arborizações do axônio terminal, com as terminações levemente dilatadas, que se alojam em depressões na superfície das fibras musculares, denominadas fendas sinápticas primárias (para revisão vide SANES & LICHTMAN, 1999).

O terminal nervoso contém abundantes vesículas sinápticas, vesículas elétricas, mitocôndrias, neurofilamentos, retículo endoplasmático liso, grânulos de glicogênio e lisossomas, entre outros componentes. Estudos morfométricos de JNMs de humanos e ratos, em estado de repouso, indicam que as mitocôndrias são responsáveis por 15% do volume do terminal nervoso e suprem a energia necessária para a síntese, estocagem e liberação dos transmissores. As mitocôndrias e outras organelas são preferencialmente encontradas no centro e na região superior do terminal (para revisão vide SANES & LICHTMAN, 1999).

As vesículas sinápticas apresentam diâmetro médio de 50 a 60 nm e representam a espécie predominante de vesículas no terminal nervoso que possui, em média, 300.000 ou mais vesículas sinápticas em cada terminal. Além da ACh, as vesículas sinápticas contêm trifosfato de adenosina (ATP), trifosfato de guanosina, íons cálcio e magnésio e proteoglicanas específicas da vesícula (WHITTAKER, 1984).

As vesículas são mais abundantes nas proximidades da membrana pré-sináptica, formando pequenos grupos adjacentes a uma região intramembranosa densa, conhecida como zona ativa. Nessa região, existem partículas protéicas que atravessam a membrana, formando canais de cálcio voltagem-dependentes. Evidências indicam que a liberação do neurotransmissor pelo impulso nervoso depende do influxo de cálcio para dentro do terminal nervoso através desses canais. Cada zona ativa encontra-se alinhada com o ápice das dobras juncionais, local em que os receptores de acetilcolina estão em alta densidade (para revisão vide HALL & SANES, 1993).

As vesículas sinápticas se movimentam até as zonas ativas, fundem-se com a membrana pré-sináptica e liberam ACh no espaço sináptico, por um mecanismo de

exocitose. Após a liberação do neurotransmissor, elas reciclam, separando-se da membrana por endocitose e sendo preenchidas novamente com ACh (HEUSER & REESE, 1981).

Recobrando os botões terminais identificam-se os processos citoplasmáticos das células de Schwann. Estas são denominadas células de Schwann terminais e protegem os terminais de possíveis lesões químicas e mecânicas, participando do reparo e manutenção da junção (para revisão vide HALL & SANES, 1993).

1.2.2. COMPARTIMENTO EXTRACELULAR

O espaço sináptico é situado entre as membranas pré e pós-sinápticas. O espaço é arbitrariamente dividido em fenda sináptica primária e fendas sinápticas secundárias. A fenda primária é limitada pelo axolema de um lado e, no lado oposto, por um plano tangencial imaginário que passa pelos ápices das dobras juncionais. A fenda primária é preenchida pela lâmina basal e faz comunicação com o espaço extracelular não juncional. As fendas secundárias são espaços entre as dobras juncionais e cada fenda secundária comunica-se com a fenda primária.

A lâmina basal cobre as membranas pré e pós-sinápticas, tendo papel importante no desenvolvimento e na regeneração da JNM e em especificar a arquitetura molecular e as propriedades fisiológicas de ambas membranas. Assim, a lâmina basal sináptica contém fatores que guiam a regeneração do terminal nervoso mesmo na ausência da fibra muscular e induzem a regeneração das dobras juncionais e inserção dos receptores de ACh nas dobras, mesmo na ausência do terminal nervoso (BURDEN *et al.*, 1979; McMAHAN & SLATER, 1984).

Embora muitas moléculas da lâmina basal da JNM, como o colágeno IV ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), fibronectina e laminina B2 não se localizam exclusivamente na região sináptica (SANES *et al.*, 1990), várias proteínas específicas estão presentes apenas na região sináptica, como: a AChE (SANES & HALL, 1979); o indutor de atividade do receptor de acetilcolina (ARIA) (GOODEARL *et al.*, 1995); a s-laminina; a agrina, proteína necessária para a diferenciação pós-sináptica e o colágeno IV ($\alpha 3$ e $\alpha 4$) (SANES *et al.*, 1990).

Cada evento da transmissão neuromuscular deve ser rapidamente cessado para o músculo se preparar para o próximo potencial elétrico. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por esta sinalização, hidrolizando a ACh rapidamente e permitindo aos AChRs tornarem-se receptivos novamente. As moléculas de AChE são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso do músculo. Como o RNA mensageiro (mRNA) da AChE é preferencialmente concentrado no sarcoplasma subsináptico, isso poderia assegurar um número adequado de moléculas de AChE na fenda sináptica, já que ela se fixa à matriz extracelular na região próxima àquela onde foi liberada (ROTUNDO & FAMBROUGH, 1994).

As múltiplas formas de AChE são classificadas de acordo com suas subunidades. Essas formas podem ser separadas por cromatografia de gel ou por ultracentrifugação. De acordo com a estrutura, a AChE é classificada em globular (G) e assimétrica (A). As formas globulares G1, G2 e G4 são monômeros, dímeros e tetrâmeros, respectivamente, de subunidades ativas enzimaticamente. A forma assimétrica consiste de um a três tetrâmeros (G4) unidos à cauda de colágeno, que fixa as subunidades à lâmina basal. A cauda é uma hélice tripla envolvendo três cadeias polipeptídicas, ricas em prolina e glicina, como é

típico do colágeno. As formas assimétricas são designadas A4, A8 e A12, dependendo do número de subunidades catalíticas (ROTUNDO & FAMBROUGH, 1994).

Em todos tecidos onde a forma da AChE assimétrica é encontrada, a espécie mais encontrada é a A12, com quantidades pequenas de A8 e A4. Não está claro ainda se as formas A8 e A4 são estáveis e funcionalmente significantes ou se são intermediárias da degradação da molécula A12. É essa forma assimétrica que está presente na JNM de músculos adultos de mamíferos e participa da transmissão neuromuscular (ROTUNDO & FAMBROUGH, 1994).

O número de moléculas de AChE na junção é aproximadamente o mesmo que o número de AChRs, aproximadamente $2-4 \times 10^7$ por junção em várias espécies de mamíferos (SALPETER, 1969).

1.2.3. COMPARTIMENTO PÓS-SINÁPTICO

A região pós-sináptica consiste do sarcoplasma, que compreende o citoplasma da fibra muscular e do sarcolema pós-sináptico, contendo as dobras juncionais. As dobras juncionais produzem uma amplificação da superfície da membrana pós-sináptica em cerca de 3-7 vezes quando comparada com a superfície da membrana pré-sináptica e, por estarem separadas pelas fendas sinápticas secundárias também aumentam o volume do espaço sináptico (MATTHEWS-BELLINGER & SALPETER, 1978).

As dobras juncionais têm cerca de $1\mu\text{m}$ de profundidade e são molecularmente divididas em duas regiões: o ápice, onde os receptores de AChRs estão agrupados em uma densidade de aproximadamente $10^4 \mu\text{m}^2$ e o fundo das dobras, onde estão os canais de sódio

responsáveis pela geração do potencial de ação (para revisão vide HALL & SANES, 1993). 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).

Os receptores são pentâmeros dispostos em torno de canais iônicos responsáveis pela recepção e transdução de sinais (UNWIN, 1993). A despolarização do terminal nervoso libera quantidade suficiente de ACh para produzir um pico de sua concentração na fenda sináptica (KUFFLER & YOSHIKAMI, 1975). Algumas moléculas de ACh são hidrolizadas pela AChE na fenda antes de alcançar o receptor. A ligação da ACh com o receptor é muito rápida, limitada apenas pela proporção da difusão. Os locais ligados ao neurotransmissor devem proporcionar energia suficiente para uma pequena mudança conformacional dos AChRs associada com a abertura do canal. Após a ACh dissociar do receptor, ela é rapidamente destruída pela AChE (LINDSTROM, 1994).

Existem duas formas de receptores: uma forma extrajuncional imatura, presente na fibra embrionária ou na fibra desnervada, composta pelas subunidades, $\alpha 2$, β , δ e γ (γ AChR); e pela forma juncional madura, presente na JNM da fibra inervada, consistindo das subunidades $\alpha 2$, β , δ e ϵ (ϵ AChR) (SCHUETZE & ROLE, 1987).

Durante o desenvolvimento da JNM, os receptores aparecem estruturalmente distribuídos em placas compactas e permanecem com esta forma até aproximadamente 2 a 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, em braços contínuos (STEINBACH, 1981; BALICE-GORDON & LICHTMAN, 1993).

Os AChRs e canais de sódio são ancorados por proteínas do citoesqueleto. Uma proteína que faz parte do citoesqueleto é a distrofina, encontrada principalmente na face citoplasmática do sarcolema, ligada aos miofilamentos da fibra muscular e ao complexo de glicoproteínas da membrana, formando o complexo distrofina-glicoproteína. Os componentes integrais deste complexo são a distrofina, o complexo distroglicana, o complexo sarcoglicana, α -distrobrevina, as sintrofínas e “sarcosplan”. Há também um componente de ligação extracelular (laminina-2), componentes intracelulares (actina-F, sincoilin e filamina 2) e moléculas sinalizadoras associadas ao complexo (calmodulina, Grb2 e nNOS) (RANDO, 2001). O complexo distrofina-glicoproteínas faz a conexão entre o citoesqueleto subsarcolemal e a lâmina basal (CAMPBELL & KAHL, 1989; ERVASTI & CAMPBELL, 1991). Sugere-se que a distrofina, unida às proteínas, estabiliza e previne a formação de falhas no sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento muscular, mantendo assim a integridade da fibra (ENGEL *et al.*, 1994).

A distrofina, ou o complexo citoesquelético intacto, parecem ser requeridos para a estabilização neuronal dos AChRs na JNM adulta, visto que no camundongo *mdx* a velocidade de degradação dos AChRs está aumentada (XU & SALPETER, 1997). Experimentos mostram que a distribuição dos AChRs encontra-se alterada no animal *mdx*, sendo que esta remodelação provavelmente esteja associada com a degeneração e regeneração da fibra e não com a falta da distrofina (LYONS & SLATER, 1991).

O posicionamento das zonas ativas em relação às dobras juncionais, a densidade e a distribuição do AChR no ápice das dobras e a distribuição uniforme da AChE por toda

lâmina basal sináptica proporcionam interação eficaz para a transmissão neuromuscular (SALPETER, 1987).

A característica mais evidente do sarcoplasma juncional é a presença de diversos núcleos arredondados ou ovalados, denominados de núcleos de placa motora.

1.3. INTERAÇÕES TRÓFICAS ENTRE NERVO E MÚSCULO

Os motoneurônios e os músculos por eles inervados são fortemente dependentes um do outro para o desenvolvimento e manutenção das suas características estruturais. A desnervação do músculo interfere drasticamente na atividade neuromuscular e na troca de substâncias tróficas entre as duas células.

Interações tróficas entre nervo e músculo são particularmente evidentes durante a sinaptogênese, quando especializações estruturais e funcionais se desenvolvem em ambas as células e na matriz extracelular entre elas.

O contato nervo-músculo ocorre logo após o aparecimento dos miotubos (fusão dos mioblastos). A transmissão neuromuscular começa aos 14 ou 15 dias de vida uterina e 1 a 2 dias após ocorre acúmulo dos AChRs na JNM. A AChE sináptica aparece 1 a 2 dias após o AChRs começarem a se acumular (GRINNELL, 1994). O axônio, em desenvolvimento, libera pequenas quantidades de ACh espontaneamente (YOUNG & POO, 1983) mas, após o contato com o músculo, o terminal nervoso aumenta a liberação de ACh (SUN & POO, 1987). Esse aumento ocorre devido ao efeito trófico do músculo no nervo, pois tanto no desenvolvimento, como na fibra madura, o músculo exerce poderosa influência no nervo que o inerva.

O terminal nervoso exerce importante influência no músculo durante toda vida, como pode ser claramente demonstrado com a desnervação. A desnervação remove o suprimento de substâncias tróficas do nervo para o músculo, interrompendo a atividade elétrica e contrátil da fibra muscular e causando atrofia (GRINNELL, 1994).

Muito se tem para aprender sobre as interações entre o nervo e o músculo, mas este fenômeno é importante não apenas na construção e manutenção das sinapses e na função neuromuscular normal, como também em estados patológicos que envolvem essas interações, como, por exemplo, nas distrofias musculares.

1.3.1. INTERAÇÕES ENTRE O TERMINAL NERVOSO E O RECEPTOR DE ACETILCOLINA

Estudos da distribuição do mRNA de diferentes subunidades do AChR sugerem que, em mamíferos, esses precursores são regulados por substâncias tróficas neurais e pela atividade elétrica das fibras musculares (SCHUETZE & ROLE, 1987). Antes da inervação, os mRNAs das subunidades α , β , δ , e γ são produzidos por núcleos presentes em toda fibra. A inervação suprime a produção de mRNA de α , β e δ , pelo núcleo extrajuncional (mas não pelo núcleo subsináptico) e suprime a produção da subunidade γ por toda fibra (MERLIE & SANES, 1985). Ao mesmo tempo, a inervação induz a produção do mRNA da subunidade ϵ seletivamente pelo núcleo subsináptico, levando a expressão da forma adulta do AChR na JNM (GRINNELL, 1994).

Mesmo sabendo que o nervo induz agregação localizada e estabilização dos AChRs, não se sabe como ele realiza ambas funções. Há evidência que a agregação localizada

envolve a secreção, pelo nervo, da proteína agrina que após ser secretada é inserida na lâmina basal no local de contato (COHEN & GODFREY, 1992), onde retém seu efeito biológico por um tempo, mesmo após a desnervação. Entretanto, a permanência da agrina na lâmina basal é dependente do nervo (REIST *et al.*, 1987). A agrina interage com receptores específicos na membrana celular do músculo de uma maneira dependente de cálcio para induzir a agregação do receptor no local de contato com o terminal nervoso. Além da agrina, outros fatores como o fator de crescimento fibroblástico, também induzem a agregação do AChR. Parece que a ação desses fatores é mediada pela fosforilação do AChR pela tirosina kinase (BAKER & PENG, 1993).

A estabilização dos AChRs, uma vez agregados na junção, parece ser dependente do influxo de cálcio devido à atividade elétrica (ROTZLER *et al.*, 1991). Na JNM adulta innervada, a vida média do AChR é de aproximadamente 8 dias, enquanto o receptor extrajuncional embriogênico, ou presente no músculo desnervado, tem uma vida média de aproximadamente 1 dia (SHYNG & SALPETER, 1990), mas retorna ao normal com a inervação (ENGEL, 1994). Assim, o contato com o nervo tem efeito profundo na expressão dos AChRs na fibra muscular, regulando a abundância e composição das subunidades, local de inserção e velocidade de degradação na membrana.

Durante a embriogênese, os AChRs começam a se acumular nas fibras musculares perto do tronco nervoso principal em crescimento, quando o nervo está vários micrômetros distante do músculo. Tais grupos de AChRs não se formam na ausência do nervo (DAHME & LANDMESSER, 1991).

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) é um fator trófico amplamente distribuído no sistema nervoso, que provavelmente influencia a síntese e

inserção dos AChRs no local de contato com o terminal (NEW & MUDGE, 1986). Uma outra glicoproteína conhecida como ARIA (indutor de atividade do receptor de acetilcolina) também parece exercer influência trófica (MARTINOU & MERLIE, 1991).

A importância dos sinais de organização presentes na matriz extracelular sináptica tem sido mostrada particularmente em experimentos com regeneração. Após lesão nervosa e muscular, o axônio e músculo degeneram, enquanto as células de Schwann e a lâmina basal sobrevivem e influenciam na regeneração de ambos (BURDEN *et al.*, 1979). Mesmo quando a regeneração muscular é evitada, axônios ainda crescem para o local sináptico original e fatores associados com a lâmina basal direcionam a diferenciação do terminal (SANES *et al.*, 1978). Em experimentos onde as fibras musculares regeneram na ausência de nervo, nota-se que este não é necessário para o acúmulo de AChRs ou para o aparecimento de dobras juncionais e que a formação dessas especializações pode ser direcionada por elementos associados com a lâmina basal sináptica ou pelas células de Schwann (BURDEN *et al.*, 1979). Isto sugere, portanto, a influência da agrina e/ou de outros componentes da lâmina basal juncional (possivelmente receptores para ARIA ou CGRP) na regeneração (GOLDMAN *et al.*, 1991).

1.3.2. INTERAÇÕES ENTRE O TERMINAL NERVOSO E A ACETILCOLINESTERASE

Durante o desenvolvimento, antes da fusão dos mioblastos, apenas a forma globular da AChE é expressa. Seguindo a formação dos miotubos e início das atividades espontâneas do músculo, a forma assimétrica aparece (ROTUNDO & FAMBROUGH,

1994). Dentro de poucos dias após a inervação, há aumento da síntese e acúmulo da AChE e síntese diminuída da AChE extrajuncional (ENGEL, 1994).

De acordo com experimentos usando inervação ectópica, Lomo & Slater (1980) mostraram que a atividade muscular estimula a síntese ou estabilização da AChE juncional em locais do músculo que foram previamente determinados pelo contato com o nervo, sugerindo que o nervo exerce um efeito local, especificando a região em que a acetilcolinesterase aparece e um efeito não local, talvez mediado pela atividade muscular, regulando a quantidade da AChE juncional.

A atividade muscular é um pré-requisito para a biossíntese e/ou agrupamento da AChE assimétrica. Sob uma condição que bloqueie essa atividade, a AChE assimétrica desaparece, enquanto a forma globular é apenas levemente afetada (RUBIN *et al.*, 1980; FERNANDEZ-VALLE & ROTUNDO, 1989). A inervação não é necessária para o aparecimento de nenhuma forma molecular; entretanto, pode exercer profunda influência na quantidade de AChE sintetizada, na abundância relativa de cada forma molecular e nos seus locais de acúmulo na superfície da célula muscular (ROTUNDO & FAMBROUGH, 1994).

Quando um músculo é experimentalmente reinervado num local distante da JNM original (inervação ectópica), uma nova sinapse se forma e a AChE acumula após aproximadamente uma semana. A forma assimétrica também acumula na JNM antiga, que não foi reinervada, mostrando que a presença do nervo não é necessária para o acúmulo da AChE na JNM, uma vez que a sinapse já tenha sido formada (WEINBERG & HALL, 1979).

Em experimento utilizando o músculo sóleo do rato, foi possível mostrar que apenas um contato transitório entre o nervo e a fibra muscular desnervada é suficiente para determinar o local de deposição da AChE, que ocorrerá uma semana depois. Mas essa deposição apenas ocorrerá se o músculo for estimulado a se contrair por inervação em outro local ou por estímulos elétricos, sugerindo que a atividade muscular tem papel essencial na deposição da AChE na JNM (LOMO & SLATER, 1980). Porém, a restauração da AChE foi vista no músculo desnervado de rato (20-30 dias de desnervação), indicando que seu aparecimento pode ocorrer na ausência de inervação e sem transmissão neuromuscular funcional (DECKER & BERMAN, 1990).

Com a desnervação, a proporção do desaparecimento da AChE varia de uma espécie para outra. No rato, a perda completa da enzima pode ocorrer após vários dias, enquanto em outros animais, ela pode persistir por vários meses após a degeneração do terminal nervoso. Vários fatores estão provavelmente envolvidos na perda da AChE juncional, incluindo a proteólise local e a não reposição da enzima (FERNANDEZ & DUELL, 1980).

O fator neural que aumenta a síntese de AChE na sinapse é provavelmente a proteína agrina (HALL & SANES, 1993). Se uma região de sinapse é desnervada no início de sua formação e o músculo estimulado, a AChE ainda aparece no local sináptico. Isto indica a transferência do sinal neural para a lâmina basal logo no início da sinaptogênese e mostra novamente que a atividade muscular é também requerida para o aparecimento da AChE no local sináptico (LOMO, 1980).

1.4. DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR ATRAVÉS DE ANESTÉSICOS LOCAIS

Com o objetivo de estudar as fibras musculares regeneradas de animais normais foi necessário induzir experimentalmente a degeneração. Para isso, utilizamos o anestésico local cloridrato de lidocaína.

Sabe-se que os anestésicos locais são potentes agentes miotóxicos e podem produzir, em função da dose, extensa e rápida necrose de fibras musculares esqueléticas (BENOIT & BELT, 1970), observada logo após a aplicação do anestésico (JONES, 1987; NONAKA *et al.*, 1983).

A patogênese da mionecrose deve-se inicialmente a lesão sarcolemal, seguida de entrada súbita e abundante do íon cálcio extracelular para o sarcoplasma. O íon cálcio, em excesso, produz hipercontração das miofibrilas, lise de lisossomas com liberação de enzimas, ativação de proteases e conseqüentemente mionecrose.

O músculo apresenta excelente capacidade de regeneração em resposta às lesões químicas e físicas (GROUNDS, 1991). A extensão e o sucesso da regeneração variam conforme a natureza da lesão mas, em todas situações, o processo envolve revascularização, infiltração celular, fagocitose de fibras necrosadas, proliferação de células precursoras do músculo e, finalmente, a reinervação.

Após a aplicação do anestésico, fibras musculares lesadas são observadas entre as normais, principalmente na superfície da fibra e desaparecem as estrias transversais. Macrófagos e a centralização dos núcleos das fibras musculares são observados após 14 a 24 horas da injeção do anestésico. Em geral, os primeiros indícios morfológicos do

processo de regeneração muscular começam a aparecer aproximadamente 36 horas após a injeção do anestésico. Nesse período, a presença de mioblastos caracteriza o processo regenerativo, mas macrófagos ainda são encontrados entre eles. Por volta do terceiro ou quarto dia, pode se observar população de miotubos. Após 16 a 32 dias da lesão, as fibras alcançam seu tamanho normal e os núcleos permanecem centrais, caracterizando as fibras musculares regeneradas (FOSTER & CARLSON, 1980).

A capacidade de regeneração muscular depende principalmente da sobrevivência das células satélites (CARLSON, 1986). Estas células são mononucleadas, fusiformes, localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema (REGER & CRAIG, 1968). Outra característica das células satélites é que elas se mostram resistentes aos anestésicos locais (NONAKA *et al.*, 1983). Além das células satélites, o restabelecimento rápido na lesão por anestésico ocorre devido aos tecidos de suporte, principalmente o vascular, que ficam intactos. A regeneração começa na periferia da lesão, onde o suprimento vascular é facilitado.

A fusão dos mioblastos em miotubos e o crescimento destes é feito no interior de “tubos” de lâmina basal muscular (VRACKO & BENDITT, 1972). A lâmina basal muscular desempenha papel de suporte para as células satélites e a formação dos novos miotubos, mantendo condições favoráveis ao processo de regeneração e impedindo que fibroblastos e fibras colágenas interfiram neste processo (CARLSON & FAULKNER, 1983).

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 47 camundongos adultos da linhagem C57BL/10 de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da Unicamp e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia (IB), com ração e água *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

2.2 TRATAMENTO COM CLORIDRATO DE LIDOCAÍNA

O método utilizado para indução da degeneração-regeneração das fibras musculares foi a injeção intramuscular do anestésico local cloridrato de lidocaína (2%, sem vasoconstritor, solução estéril injetável, Astra Química e Farmacêutica Ltda), conforme descrito anteriormente (MINATEL *et al.*, 2001). Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de virbaxyl (2%, Virbac) e francotar (Virbac) (1:1). Foi feita uma incisão mediana na região ventral do pescoço do camundongo, desde o ápice da mandíbula até a incisura esternal. A pele e as glândulas salivares submandibulares foram afastadas lateralmente. O músculo esternomastóideo (STN) esquerdo foi exposto e recebeu 0,06 ml de cloridrato de lidocaína (0,03 ml em cada extremidade). O músculo STN contralateral serviu como controle, não recebendo a injeção. A pele foi suturada com fio de poliéster siliconizado nº5 e os animais ficaram sob aquecimento até a recuperação, mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, IB, por períodos diferentes até a data da retirada dos músculos.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 FIBRAS MUSCULARES REGENERADAS

- Marcação de AChRs e terminais nervosos

Após 90 (n=11) e 150 (n=8) dias da aplicação de cloridrato de lidocaína, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% (0,2ml do anestésico para cada 20g de peso corporal) intraperitoneal e feita perfusão cardíaca com 20ml de solução tampão (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), seguido de 20ml de paraformaldeído 2%. Após, os músculos foram expostos, o tecido conjuntivo retirado e os músculos fixados “in situ” durante 10 minutos com paraformaldeído 2%. A seguir, os STNs direito e esquerdo foram retirados e presos pelas extremidades com alfinetes entomológicos em cubas. Os músculos foram lavados várias vezes com PBS e permaneceram em solução de glicina 0,1M no agitador orbital durante 20 minutos, com o objetivo de se inativar o fixador. Após esse período, foram novamente lavados com PBS e incubados com collagenase 1% (tipo I, Sigma) durante 20 minutos, no agitador, para facilitar a retirada do tecido conjuntivo. Após lavadas com PBS, os AChRs foram marcados com alfa-bungarotoxina conjugada à rodamina (Rh-BTX; Molecular Probes, 1:100 em PBS) durante 30 minutos. Depois foram lavados e incubados com Triton 1% durante 1 hora, para permeabilização das fibras musculares. Após lavadas com PBS, os músculos ficaram por 12-18 horas em solução bloqueadora (125 µl de triton X-100, 1ml de soro albumina bovina-Sigma em 23,8ml de PBS) a 4°C, com a finalidade de bloquear ou diminuir a marcação

inespecífica do anticorpo primário. A seguir, a solução bloqueadora foi trocada 2 a 3 vezes e os músculos incubados com o anticorpo primário (anti-neurofilamento; Sigma; NF-200; 1:100 em solução bloqueadora) por 12-15 horas a 4°C. Os músculos foram então lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário (anti-mouse-IgG-FITC; Sigma; 1:100 em solução bloqueadora) no agitador orbital, por 3 horas. Após esse período, foram lavados e montados inteiros em lâmina sob lamínula, em meio de montagem para fluorescência DABCO (Sigma), sendo analisados posteriormente ao microscópio confocal (BioRad MRC 1024- Faculdade de Engenharia de Alimentos e microscópio Zeiss- Faculdade de Ciências Médicas- UNICAMP).

- Análise histológica

Após 150 dias da injeção do anestésico local, 4 animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% e perfundidos via cardíaca com 20ml de PBS, seguido de 20ml de formalina 10%. Após a retirada do tecido conjuntivo, os músculos STNs esquerdo e direito foram retirados e colocados em formalina 10% por 2 horas. A seguir, os músculos foram lavados em água corrente por 24 horas, sendo depois desidratados em séries de etanol, durante 2 horas. Após essa etapa, foi feita a pré-inclusão do material em historesina pura e álcool (1:1) durante 2 horas a 4°C e a inclusão com solução A (historesina pura e ativador), por 12 horas em dissecador a vácuo, a 4°C. Na polimerização, os músculos foram colocados em cápsulas preenchidas com solução B (solução A e endurecedor). Estas cápsulas foram então colocadas em estufa a 60°C. Após três dias, o material foi retirado da estufa e realizados cortes de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE), para posterior observação ao microscópio de luz. Esta análise teve por objetivo contar o

número de fibras musculares regeneradas, as quais possuem como característica o núcleo centralizado. Também pudemos verificar se após longo tempo de regeneração muscular, os núcleos das fibras musculares voltam para a periferia da fibra.

- Marcação da acetilcolinesterase

Os animais foram sacrificados 21 (n=3 animais), 90 (n=2) e 150 (n=2) dias após a aplicação de cloridrato de lidocaína no STN esquerdo. A distribuição da acetilcolinesterase foi estudada utilizando-se a técnica da pararosanilina (STRUM & HALL-CRAGGS, 1982). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% intraperitoneal e realizou-se perfusão cardíaca com 20ml de tampão fosfato 0,1M, seguido de 20ml de fixador Karnovsky (glutaraldeído 2% e paraformaldeído 1% em tampão fosfato 0,1M). Os STNs direito e esquerdo foram expostos, retirados e pós-fixados com Karnovsky, durante 1 hora, a 4°C. Depois, colocados por 1 hora a 4°C na seguinte solução: 8,8ml de tampão citrato, 1,0ml de indoxil acetato e 0,2ml de pararosanilina hexazotizada. Após esse período, os músculos foram montados inteiros em lâmina sob lamínula em meio de montagem DABCO e observados ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400 -Departamento de Anatomia-Instituto de Biologia).

2.3.2 FIBRAS MUSCULARES REGENERADAS E DESNERVADAS

- Marcação dos AChRs e terminais nervosos

Com este grupo (n=7), verificamos a influência da inervação no padrão de distribuição dos AChRs em fibras regeneradas utilizando, além da técnica de aplicação de

cloridrato de lidocaína, a desnervação do STN esquerdo. Para evitar a reinervação, foi retirado um fragmento do nervo de aproximadamente 1mm. Após 21 dias, os músculos direito e esquerdo foram retirados e os terminais nervosos e AChRs marcados (conforme descrito), sendo observados ao microscópio confocal.

- **Análise histológica**

Após observação destes músculos (vide item acima) ao microscópio confocal, os mesmos foram submetidos a técnicas histológicas de rotina (HE), para certificarmos a presença de fibras regeneradas.

- **Marcação da Acetilcolinesterase**

Os animais (n=4) foram sacrificados 30 dias após o experimento, onde foi realizada a desnervação e aplicação da lidocaína no STN esquerdo. Estudou-se a distribuição da AChE utilizando a técnica da pararosanilina (já descrita), sendo os músculos observados ao microscópio de luz.

2.3.3 FIBRAS MUSCULARES DESNERVADAS

- **Marcação dos AChRs e terminais nervosos**

Este grupo (n=2 animais) serviu como controle para as fibras desnervadas-regeneradas, possibilitando a comparação do padrão de distribuição dos AChRs do músculo regenerado e desnervado com o músculo apenas desnervado.

O nervo do músculo STN esquerdo foi seccionado e, após 21 dias, os STNs direito e esquerdo foram retirados e terminais nervosos e AChRs marcados, sendo observados ao microscópio confocal.

- Marcação da Acetilcolinesterase

Os músculos STNs direito e esquerdo foram retirados e a AChE marcada com a técnica da pararosanilina, 30 dias após a desnervação do STN esquerdo (n=4).

2.4 MICROSCOPIA DE VARREDURA CONFOCAL A LASER

Os músculos STNs foram observados utilizando-se o sistema confocal da Zeiss (Faculdade de Ciências Médicas) e da Bio-Rad (MRC 1024 UV), sendo este último equipado com lasers Argônio-Kriptônio (Ar-Kr) e Ultra-Violeta (UV), acoplado a um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 100 Zeiss). No sistema confocal Bio-Rad foi utilizada a objetiva de 40X (1.2 NA, imersão em água). Para a microscopia confocal, a linha de 568nm foi utilizada para excitar a rodamina e a linha 488 nm para excitar a fluoresceína. A observação concomitante da fluoresceína e rodamina foi feita com a utilização dos filtros de emissão HQ 598/40, HQ 522/35 e filtros barreira T1/E2, supridos pelo fabricante. O brilho e o contraste foram mantidos constantes para todos os grupos. Imagens de um único plano focal ou de um grupo de imagens de vários planos focais foram adquiridas com auxílio do software do fabricante (Laser Sharp OS/2, BioRad) e salvas em um disco óptico. As imagens obtidas foram impressas em papel fotográfico Kodak, em impressora Codonics acoplada ao sistema confocal.

3.RESULTADOS

3.1 FIBRAS MUSCULARES REGENERADAS

- Distribuição dos AChRs e terminal nervoso

Após 90 (Fig.1 A, B) e 150 (Fig.1 C, D) dias da injeção do anestésico local, o padrão de distribuição dos AChRs e terminais nervosos apresenta-se alterado quando comparado com o padrão de animais sem tratamento. Nas junções neuromusculares normais (n=744 junções), os receptores são distribuídos em estruturas alongadas contínuas, lembrando a forma de um “pretzel” (MARQUES *et al.*, 2000), a qual denominamos “braços contínuos”. A distribuição do terminal nervoso acompanha a disposição dos receptores, onde seus prolongamentos recobrem os braços contínuos dos mesmos (Fig.4 A).

Nas junções de fibras regeneradas (n=416 junções), os receptores apresentam fragmentações dos braços juncionais, originando pequenas ilhas ou aglomerados de receptores. As ilhas apresentam uma área central escura (Fig.1 B, D). Os terminais nervosos possuem finas arborizações com dilatações nas suas extremidades, que preenchem o centro das ilhas de receptores (Fig.1 A, C).

- Análise histológica

Na análise histológica, foi observada centralização dos núcleos das fibras musculares regeneradas (Fig.2 B), 150 dias após a injeção do anestésico local. A centralização nuclear foi encontrada em cerca de 28% das fibras, sendo vista principalmente nas 3 ou 4 primeiras camadas superficiais de fibras musculares, utilizadas para observação ao microscópio confocal. Nas camadas profundas, como nos músculos controle (STN direito), foram observados núcleos periféricos (Fig.2A).

- Distribuição da Acetilcolinesterase

Em fibras musculares regeneradas, após 90 (Fig.3 B) e 150 (Fig.3 C) dias da injeção de lidocaína, a distribuição da acetilcolinesterase apresentou-se alterada. Ela se mostrou distribuída em ilhas nas 200 junções neuromusculares vistas, diferenciando-se do padrão de braços contínuos observado nas fibras musculares normais (n=426 junções; Fig.3 A).

3.2 FIBRAS MUSCULARES REGENERADAS E DESNERVADAS

- Distribuição dos AChRs

Em fibras musculares regeneradas-desnervadas (n=900 junções), os AChRs não estavam distribuídos em ilhas (Fig.4 B, C). Eles apresentaram disposição semelhante à observada na fibra desnervada normal (Fig.4D).

- Análise histológica

A análise histológica dos mesmos músculos observados ao microscópio confocal (descritos no item acima), mostrou que as fibras musculares superficiais estavam regeneradas, pela presença de núcleo central (Fig.2 C). O diâmetro das fibras desnervadas-regeneradas apresentou-se aparentemente diminuído.

- Distribuição da Acetilcolinesterase

Em fibras musculares regeneradas e desnervadas, a AChE não se apresentou distribuída em ilhas (Fig.3 D; n=60 JNM). Sua disposição foi semelhante à encontrada na fibra apenas desnervada.

3.3 FIBRAS MUSCULARES DESNERVADAS

- Distribuição dos AChRs

Em fibras musculares desnervadas, os receptores não estavam distribuídos em ilhas (n=342 junções, Fig.4 D), assemelhando-se ao receptor do músculo regenerado-desnervado (comparar com a Fig.4 B, C). Observou-se aparente atrofia muscular quando comparado ao músculo innervado.

- Distribuição da Acetilcolinesterase

Na fibra muscular desnervada (não mostrada; n=50), a AChE apresentou padrão semelhante ao visto no músculo regenerado-desnervado (Fig.3 D), não se distribuindo no padrão de ilhas.

4.LEGENDA

Figura 1. Distribuição dos AChRs e terminais nervosos em camundongo C57Bl/10, 90 (A,B) e 150 (C,D) dias após injeção de lidocaína, vistos ao microscópio confocal. Nas figuras A e C são observados, através da marcação com anti-neurofilamento, terminais nervosos (verde) e suas finas arborizações com bulbos nas extremidades (seta), que preenchem o centro das ilhas de receptores (em vermelho; marcação com rodamina- α -bungarotoxina). Em B e D, AChRs distribuídos em ilhas, com a área central mais escura. Escala: 20 μ m (A); 12,5 μ m (B,C); 10 μ m (D).

Figura 2. Em A, músculo STN direito (controle) do animal C57Bl/10 apresentando fibras com núcleos periféricos. Fibra muscular regenerada 150 dias após injeção de lidocaína, caracterizada pela presença do núcleo central (Fig.B). Em C, fibra muscular regenerada e desnervada, 21 dias após injeção de lidocaína e desnervação. Nota-se diminuição do diâmetro da fibra e centralização nuclear. HE. Escala: 30 μ m.

Figura 3. Na junção controle (A), mostra-se o padrão da AChE (marcação com pararosanilina) em braços contínuos no animal C57Bl/10 sem tratamento. Após 90 (B) e 150 (C) dias da injeção de lidocaína a AChE aparece distribuída em ilhas, diferentemente do padrão apresentado pela fibra que regenera sem inervação (D; 30 dias). Observação ao microscópio de luz. Escala: 10 μ m.

Figura 4. Observamos na junção controle (A), a distribuição dos AChRs em braços contínuos (vermelho; marcação com rodamina- α -bungarotoxina), recobertos pelo terminal

nervoso (verde; anti-neurofilamento). Na fibra regenerada e desnervada (B,C; 21 dias) nota-se que os AChRs não se encontram em ilhas, apresentando padrão semelhante ao visto na fibra desnervada (D; 21 dias). Os músculos foram observados ao microscópio confocal.

Escala: 10 μ m.

5.FIGURAS

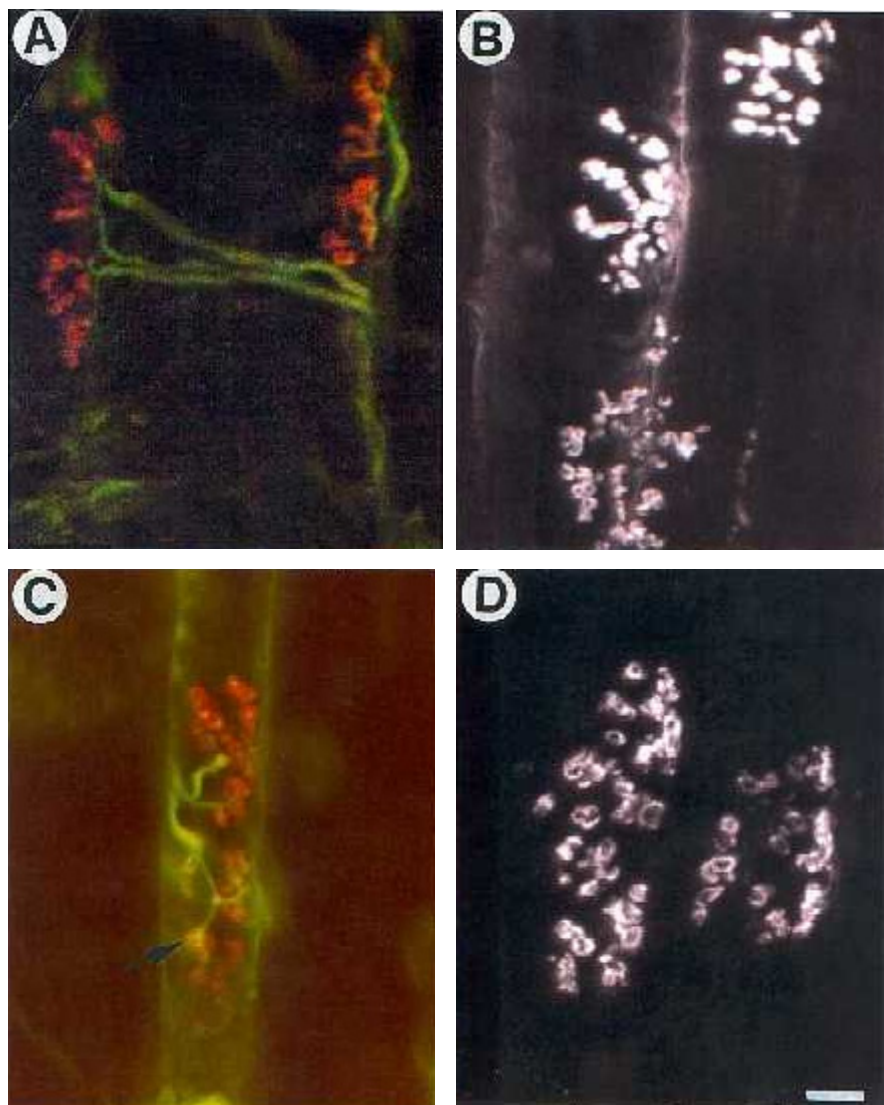


Figura 1

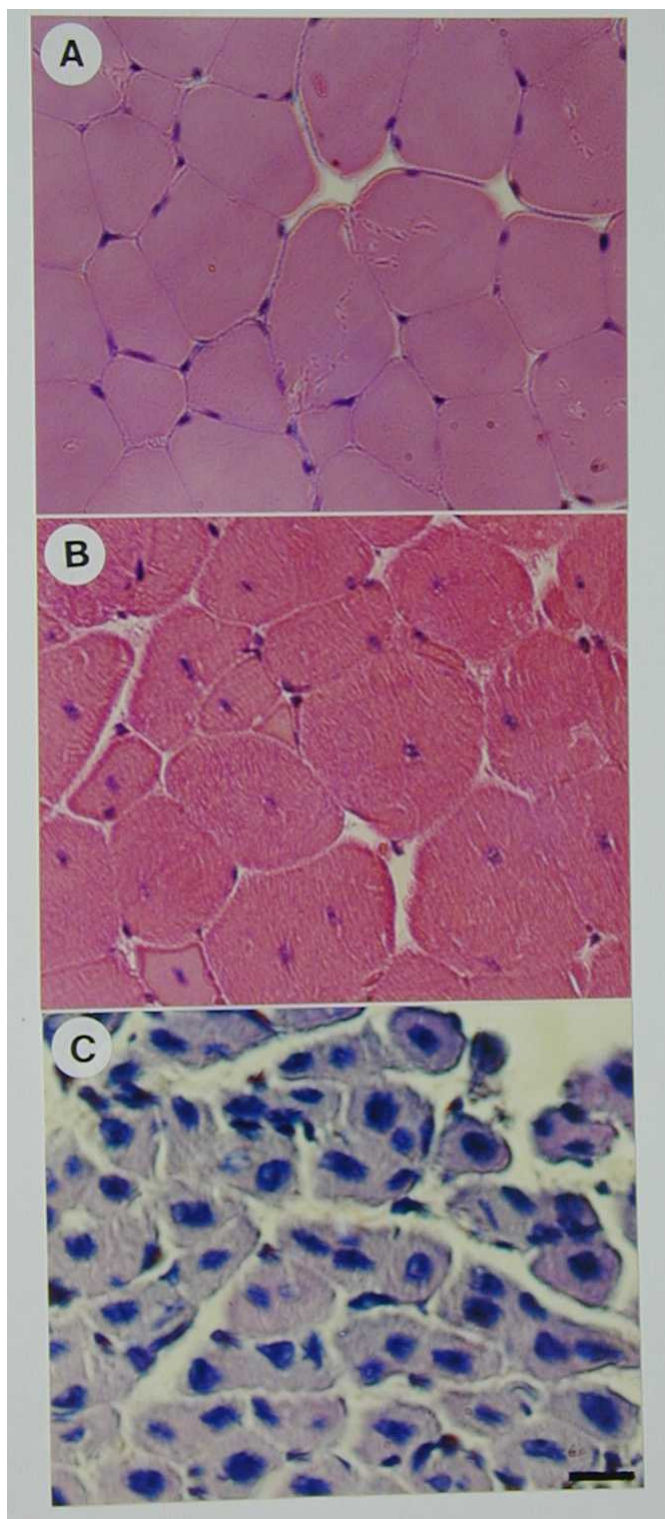


Figura 2

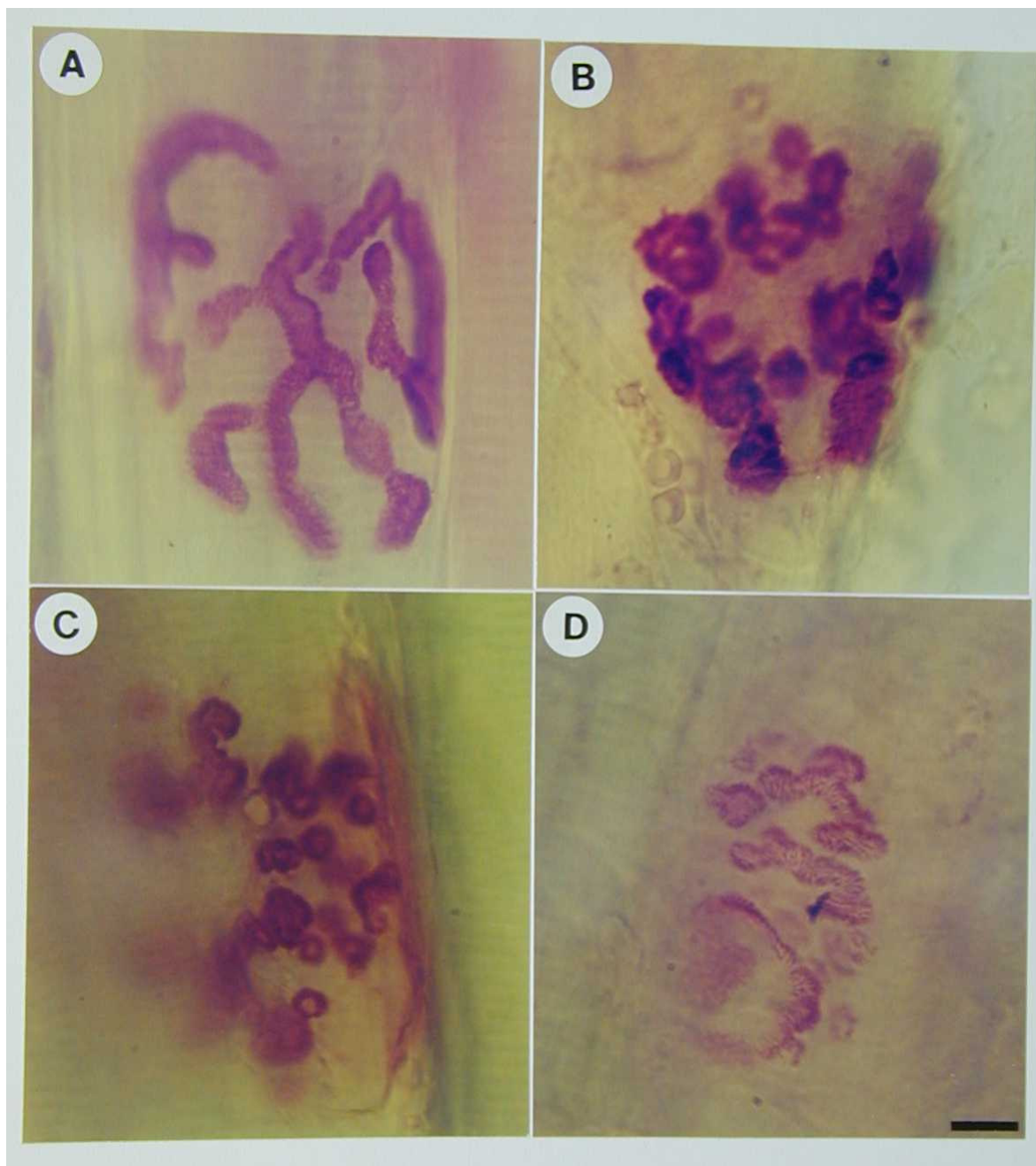


Figura 3

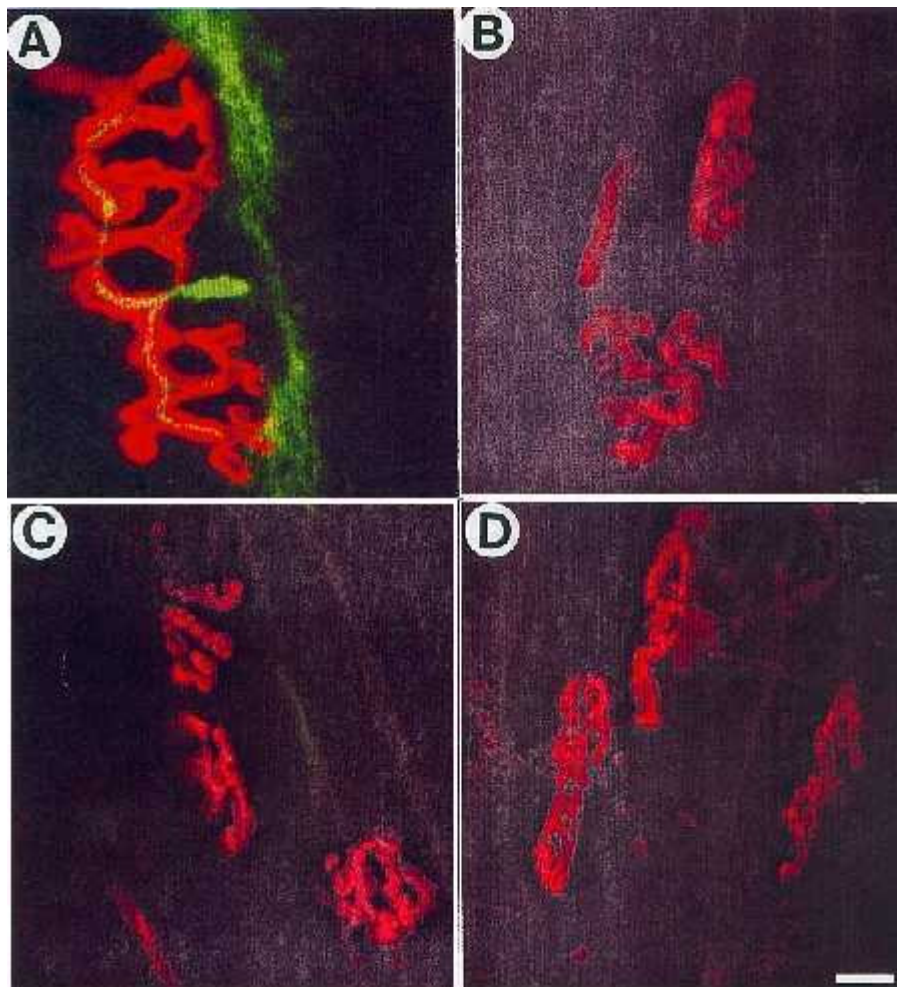


Figura 4

6.DISSCUSSÃO

No presente trabalho, estudamos a distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs) e dos terminais nervosos na junção neuromuscular do músculo esternomastóideo, após longo tempo de regeneração (150 dias).

Vários procedimentos são comumente utilizados para a indução da degeneração-regeneração da fibra muscular, destacando-se o congelamento, esmagamento e lesão causada por anestésico local (NONAKA *et al.*, 1983). O método utilizado neste trabalho foi o uso do anestésico local cloridrato de lidocaína, tal como descrito em outro trabalho de nosso laboratório (MINATEL *et al.*, 2001). Através do uso do anestésico há hipercontração e necrose da fibra, possivelmente pela lesão sarcolemal seguida da entrada excessiva do íon cálcio extracelular para o sarcoplasma (BENOIT & BELT, 1970). Com sua ação isolada no músculo, o anestésico permite que tecidos de suporte permaneçam intactos, principalmente o suprimento vascular e tecido nervoso, permitindo rápida regeneração muscular. No presente trabalho, observamos núcleos centrais após 90 e 150 dias do uso de cloridrato de lidocaína, mostrando que este método é adequado para indução da regeneração e reproduz, no animal normal, alterações semelhantes às que ocorrem na degeneração-regeneração no animal distrófico.

Em fibras musculares adultas, os AChRs são distribuídos na forma de braços contínuos, cobertos pelo terminal nervoso. Com o processo de degeneração-regeneração do músculo, há alterações no padrão de distribuição de componentes pré e pós-sinápticos da fibra muscular. Através da microscopia de fluorescência confocal, observamos que, após 90 e 150 dias de regeneração, os AChRs apresentam-se em ilhas e os terminais nervosos possuem finas arborizações com bulbos nas extremidades, semelhantes aos animais *mdx*, as quais foram sugeridas ser brotamentos intraterminais (SANTO NETO *et al.*, 2003).

Portanto, concluímos que os AChRs não voltam ao seu padrão normal de distribuição em braços contínuos, mesmo após longo tempo de regeneração da fibra muscular. O presente resultado confirma o que foi observado por Minatel *et al.*, 2001 em relação ao padrão dos receptores após curto tempo de regeneração muscular (21 dias), reforçando a sugestão de que a distribuição em ilhas dos receptores de acetilcolina no animal *mdx* é decorrente do processo de degeneração-regeneração e, provavelmente, não está relacionada à ausência da distrofina (LYONS & SLATER, 1991; MINATEL *et al.*, 2001).

Com a regeneração muscular, há também alterações na disposição da AChE, enzima presente na lâmina basal sináptica, apresentando esta um padrão de distribuição semelhante ao observado no AChR, em ilhas. Como a AChE apresenta-se envolvida na transmissão neuromuscular e tem sua produção parcialmente induzida pelo terminal nervoso (DECKER & BERMAN, 1990), verificamos a influência do nervo na disposição das alterações apresentadas pela fibra muscular regenerada.

Através da desnervação observamos que, diferentemente do músculo que regenera na presença do nervo, no músculo regenerado sem inervação os AChRs não se agrupam no padrão de ilhas. Nestes músculos, foi observada a disposição dos receptores, como também da AChE, de forma similar à encontrada na fibra muscular apenas desnervada. Isto sugere que o nervo é o responsável pelo padrão em ilhas dos AChRs na fibra muscular regenerada, após injeção de lidocaína. Essa influência nervosa sobre os receptores também foi mostrada em experimento com lesão mecânica do músculo, onde os receptores se organizam de acordo com a distribuição do terminal (RICH & LICHTMAN, 1989).

No músculo regenerado do animal *mdx* (SANTO NETO *et al.*, 2003), bem como em fibras que expressam grandes quantidades de N-CAM (WALSH *et al.*, 2000) foram vistos brotamentos intraterminais. Sugere-se que o estímulo a esses brotamentos seja originado pela própria fibra muscular em regeneração, possivelmente pela N-CAM, um sinal molecular produzido por esta fibra. Observamos a presença destes brotamentos na fibra regenerada normal e sugerimos que eles sejam os responsáveis pela disposição em ilhas dos AChRs, pois quando o músculo regenera, os receptores se agrupam de acordo com o terminal, distribuindo-se em pequenos grupos em torno dos brotamentos intraterminais e apresentando o padrão de ilhas.

Outra possibilidade para explicar essa remodelação da junção neuromuscular, seria a produção aumentada de fatores tróficos, como o fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1), pois este apresenta-se aumentado em fibras regeneradas (KELLER *et al.*, 1999) e parece promover brotamento nervoso (CARONI *et al.*, 1994).

Concluimos que os receptores de acetilcolina mantêm o padrão de distribuição em ilhas após longo tempo de regeneração muscular induzida pela lidocaína, devido influência de mecanismos dependentes do nervo. É possível que moléculas produzidas durante a regeneração muscular, como a N-CAM e IGF-1, induzam brotamentos intraterminais que modulam a estrutura sináptica. Acreditamos que o padrão em ilhas se mantenha por longo tempo devido a forte adesão entre terminal nervoso, lâmina basal e fibra muscular, provavelmente sem prejuízo funcional para esta sinapse. Seria interessante verificar se a remodelação dos AChRs na fibra distrófica é também um mecanismo dependente do nervo.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, L.P.; PENG, H.B. Tyrosine phosphorylation and acetylcholine receptor cluster formation in cultured *Xenopus* muscle cells. J Cell Biol, v.120, p.185-195, 1993.

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

BENOIT, P.W.; BELT, W.D. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine). J Anat, v.107, p.547-556, 1970.

BONILLA, E.; SAMITT, 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.

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.

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

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

CARLSON, B.M. Regeneration of entire skeletal muscle. Fed Proc Bethesda, v.45, n.5, p.1456-1460, 1986.

CARLSON, B.M.; FAULKNER, J.A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury. Med Sci Sports Exercise, v.15, n.3, p.187-198, 1983.

CARONI P, SCHNEIDER C, KIEFER MC, ZAPF J. Role of muscle insulin-like growth factors in nerve sprouting: suppression of terminal sprouting in paralyzed muscle by IGF-binding protein-4. J Cell Biol, v.125, p.893-902, 1994.

COHEN, M.W.; GODFREY, E.W. Early appearance of and neuronal contribution to agrin-like molecules at embryonic frog nerve-muscle synapses formed in culture. J Neurosci, v.12, p.2982-2992, 1992.

DAHM, L.M.; LANDMESSER, L.T. The regulation of synaptogenesis during normal development and following activity blockage. J Neurosci, v.11, p.238-255, 1991.

DECKER, M.M.; BERMAN, H.A. Denervation-induced alterations of acetylcholinesterase in denervated and nondenervated muscle. Exp Neurol, v.109, p.247-255, 1990.

ENGEL, A.G. The Neuromuscular Junction. In: ENGEL, A.G. and ARMSTRONG, C.F. Myology (vol.1). New York: McGraw-Hill, Inc, 1994. p.261-302. ISBN 0070195587.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBERCK, K.H. Muscular Dystrophies. In: ENGEL, A.G. and ARMSTRONG, C.F. Myology (vol.2). New York: McGraw-Hill, Inc, p.1133-1187, 1994. ISBN 0070195595.

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

FERNANDEZ, H.L.; DUELL, M.J. Protease inhibitors reduce effects of denervation on muscle endplate acetylcholinesterase. J Neurochem, v.35, p.1166-1171, 1980.

FERNANDEZ-VALLE, C.; ROTUNDO, R.L. Regulation of acetylcholinesterase synthesis and assembly by muscle activity. Effects of tetrodotoxin. J Biol Chem, v.264, p.14043-14049, 1989.

FOSTER, A.H.; CARLSON, B.M. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. Anesth Analg, v.59, p.727-736, 1980.

GOLDMAN, D.; CARLSON, B.M.; STAPLE, J. Induction of adult-type nicotinic acetylcholine receptor gene expression in noninnervated regenerating muscle. Neuron, v.7, p.649-658, 1991.

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.

GRINNELL, A.D. Trophic interaction between nerve and muscle. In: ENGEL, A.G. and ARMSTRONG, C.F. Myology (vol.1). New York: McGraw-Hill, Inc, 1994. p.303-332. ISBN 0070195587.

GROUND, M.D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. Pathol Res Pract, v.187, p.1-22, 1991.

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

HEUSER, J.E.; REESE, T.S. Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. J Cell Biol, 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.

JONES, S.W. Presynaptic mechanisms at vertebrate neuromuscular junction. In: SALPETER, M. M. The Vertebrate Neuromuscular Junction. New York: Alan R. Liss, Inc. 1987. p. 187-245.

KELLER HL, SCHNEIDER BSP, EPPHIMER LA, CANNON JG. Association of IGF-I and IGF-II with myofiber regeneration in vivo. Muscle Nerve, v.22, p.347-354, 1999.

KUFFLER, S.; YOSHIKAMI, D. The number of transmitter molecules in a quantum: An estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. J Physiol, v.251, p.465-482, 1975.

LINDSTROM, J. Acetylcholine receptors: structure, function, synthesis, destruction and antigenicity. In: ENGEL, A.G. and ARMSTRONG, C.F. Myology (vol.1). New York: McGraw-Hill, Inc, 1994. p.585-606. ISBN 0070195587.

LOMO, T. What controls the development of neuromuscular junctions. Trends Neurosci, v.3, p.126-129, 1980.

LOMO, T.; SLATER, C.R. Control of junctional acetylcholinesterase by neural and muscular influences in the rat. J Physiol, v.303, p.191-202, 1980.

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. J Neurosci, v.20, p.3663-3675, 2000.

MARTINOU, J.C.; MERLIE, J.P. Nerve-dependent modulation of acetylcholine receptor ϵ -subunit gene expression. J Neurosci, v.11, p.1291-1299, 1991.

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.

McMAHAN, U.J.; SLATER, C.R. The influence of basal lamina on the accumulation of acetylcholine receptors at synaptic sites in regenerating muscle. J Cell Biol, v.98, p.1453-1473, 1984.

MERLIE, J.P.; SANES, J.R. Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. Nature (Lond), v.317, p.66-68, 1985.

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

NEW, H.V.; MUDGE, A.W. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. Nature, v.323, p.809-811, 1986.

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

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

REGER, J.F.; CRAIG, A.S. Studies on the fine structure of muscles fibers and associated satellite cells in hypertrophic human deltoide muscle. Anat Rec, v.162, p.483-500, 1968.

REIST, N.E.; MAGILL, C.; McMAHAN, U.J. Agrin-like molecules at synaptic sites in normal, denervated, and damaged skeletal muscles. J Cell Biol, v.105, p.2457-2469, 1987.

RICH, M.; LICHTMAN, J.W. Motor nerve terminal loss from degenerating muscle fibers. Neuron, v.3, p.677-688, 1989.

ROTUNDO, R.L.; FAMBROUGH, D.M. Function and molecular structure of acetylcholinesterase. In: ENGEL, A.G. and ARMSTRONG, C.F. Myology (vol.1). USA: McGraw-Hill, 1994. p.607-623.

ROTZLER, S.; SCHRAMEK, H.; BRENNER, H.R. Metabolic stabilization of endplate acetylcholine receptors regulated by Ca influx associated with muscle activity. Nature, v.349, p.337-339, 1991.

RUBIN, L.L.; SCHEUTZE, S.M.; WEILL, C.L.; FISCHBACH, G.D. Regulation of acetylcholinesterase appearance at neuromuscular junctions in vitro. Nature (London), v.283, p.264-267, 1980.

SALPETER, M.M. Vertebrate neuromuscular junction: General morphology, molecular organization, and function consequences. In: _____. The Vertebrate Neuromuscular Junction. New York: Alan R. Liss, Inc. 1987. p.1-54.

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.

SANES, J.R.; HALL, Z.W. Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. J Cell Biol, v.83, p.357-370, 1979.

SANES, J.R.; ENGVALL, E.; BUTKOWSKI, R.; HUNTER, D.D. Molecular heterogeneity of basal laminae: Isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. J Cell Biol, v.111, p.1685-1699, 1990.

SANES, J.R.; MARSHALL, L.M.; McMAHAN, U.J. Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. J Cell Biol, v.78, p.176-198, 1978.

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

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

SCHUETZE, S.M.; ROLE, L.W. Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors. Annu Rev Neurosci, v.10, p.403-457, 1987.

SHYNG, S.L.; SALPETER, M.M. Effect of innervation on the degradation rate of junctional acetylcholine receptors synthesized in denervated skeletal muscles. J Neurosci, v.10, p.3905-3915, 1990.

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

STRUM, J.M.; HALL-CRAGGS, E.C.B. A method demonstrating motor endplates for light and electron microscopy. J Neurosci Methods, v.6, p.305-309, 1982.

SUN, Y.A.; POO, M.M. Evoked release of acetylcholine from the growing embryonic neuron. Proc Natl Acad Sci USA, v.84, p.2540-2544, 1987.

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

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

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

VRACKO, R.; BENDITT, E.P. Basal lamina: The scaffold for orderly cell replacement. J Cell Biol, v.55, p.406-419, 1972.

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

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

WHITTAKER, V.B. The structure and function of cholinergic synaptic vesicles. Biochem Soc Trans, v.12, p.561, 1984.

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.

YOUNG, S.H.; POO, M.M. Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurons. Nature, v.305, p.634-637, 1983.

8. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers.

By Zarif T. R. Mendes, Elaine Minatel, Humberto Santo Neto and Maria Julia Marques

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

Acknowledgments: This work was supported by the Fundação de Amparo do Estado de São Paulo (FAPESP, grant n° 95/6110-2; 01/08853-5; 01/00570-4). H.S.N. and M.J.M. are recipients of fellowships from Conselho Nacional de Pesquisas (300061/99-4;301053/91-0). Z.T.R. is recipient of a fellowship from Conselho Nacional de Pesquisas. We thank Prof. Stephen Hyslop, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas, for reviewing the manuscript.

All correspondence should be addressed to:

Dr. Maria Julia Marques

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

fax: 55-19-3289-3124

email:marques@unicamp.br

phone: 55-19-3788-6395

Running title: AChRs distribution in long-term regenerated fibers

Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers.

ABSTRACT

Mdx mice have deficiency of dystrophin and cycles of muscle fiber regeneration. Changes in the distribution of acetylcholine receptors have been reported at the neuromuscular junction of *mdx* and may be a consequence of muscle fiber regeneration. At the present, we verified whether the distribution of receptors is still altered in long-term regenerated muscle fibers from C57Bl/10 mice. The left sternomastoid muscle of adult mice was injected with 60 μ l of lidocaine hydrochloride to induce degeneration-regeneration. Some animals had the STN denervated at the time of lidocaine injection. After 90 and 150 days, receptors were labeled with rhodamine- α -bungarotoxin for confocal observation. For both periods studied, receptors were distributed into clusters. In denervated-regenerated fibers, receptors were distributed as branches, similar to normal denervated muscles. This suggests that nerve-dependent mechanisms are involved in the changes in receptor distribution seen in regenerated muscle fibers, after lidocaine treatment and a similar phenomenon might explain the changes in receptor distribution seen in dystrophic muscle fibers.

Key words: acetylcholine receptors, *mdx* mice, muscle fiber regeneration, nerve terminal, neuromuscular junction.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is characterized by progressive muscle wasting that begins at about three years of age. The deficient gene product in DMD has been identified as dystrophin, a membrane-associated protein (Hoffman et al., 1987; Bonilla et al., 1988), which is closely associated with other membrane glycoproteins (Campbell et al., 1989), constituting the dystrophin-glycoprotein complex (DGP). The relationship between the protein's absence and subsequent muscle pathology is still not understood. It is generally accepted that dystrophin acts as a structural protein, so that its absence results in a weakened cell membrane that can be more easily damaged (Hutter et al., 1991; Pasternak et al., 1995), but more recent views focus on the roles of the dystrophin-glycoprotein complex might have as a signaling system involved in the regulation of cell survival (for a review see Rando, 2001).

Mdx mutant mice, which carry a point mutation on the X-chromosome (Sicinski et al., 1989) have a profound deficiency of the membrane-associated protein dystrophin (Hoffman et al., 1987). These animals also display acute muscle fiber necrosis followed by regeneration (Tanabe et al., 1986), thus being a model to study the mechanisms underlying muscle fiber degeneration and regeneration and the effects of the absence of dystrophin on the assemblage of the muscle fiber components.

At the neuromuscular junction, adult *mdx* mice show changes in acetylcholine receptor distribution (Torres and Duchen, 1987; Lyons and Slater, 1991). These alterations may not be related to the absence of dystrophin, but rather may be typical of regenerated muscle fibers (Lyons and Slater, 1991; Minatel et al., 2001). In fact, regenerated fibers that express normal levels of dystrophin show changes in AChR distribution that are similar to

those seen in *mdx* mice (Minatel et al., 2001), suggesting that the alterations in AChRs distribution were not a direct consequence of dystrophin deficiency, but rather a secondary consequence of muscle fiber regeneration. To strength this hypothesis, it would be necessary to show that receptors do not attain the branched-adult pattern with muscle maturation, being still altered after a long period of regeneration, after lidocaine.

At the present, we verified whether the pattern of distribution of AChRs is still altered after long-term muscle regeneration. We evaluated if the changes in receptors could be related to alterations in synaptic basal lamina molecules or the nerve terminal, by examining acetylcholinesterase distribution, as well as AChRs distribution in non-innervated-regenerated fibers. We observed that AChRs distribution is still altered in long-term regenerated fibers after lidocaine and that the nerve terminal plays a role in determining this altered pattern of receptor distribution.

Materials and Methods

Animals

Male adult C57Bl/10 mice (2 months old) were obtained from breeding colonies established in our animal care facility. The animals were housed according to Institutional guidelines and had access to food and water *ad libitum*. Forty-seven mice were used for light microscopy observation of muscle fiber regeneration and AChE and confocal microscopy observation of AChRs and nerve terminals.

Intramuscular injection of lidocaine hydrochloride

The mice were anesthetized with a mixture (1:1) of ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis) and thiazine hydrochloride (Rompun, Bayer) at a dose of 0,02 g/ ml. The ventral surface of the neck was shaved and a midline incision was made from the apex of the mandible to the sternal notch. The left sternomastoid (STN) muscle was exposed by lateral reflection of the salivary glands and received two intramuscular injections of lidocaine hydrochloride (30 µl each). The contralateral side served as a control. The skin was sutured with interrupted Ethicon 5.0 sutures and the wound then carefully cleaned.

Light microscopy

150 days (n=4 mice) after lidocaine injection, the 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 PBS and calcium-formalin. The STNs were removed, fixed for 2 hours in calcium-formalin, dehydrated and embedded in historesin. Transversal sections 5 µm thick were stained with HE and examined with a light microscope. The number of normal and regenerated (indicated by the presence of central cell nuclei) muscle fibers was counted using a hand counter.

Confocal microscopy

Ninety (n=11) and 150 (n=8) days after lidocaine injection, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate and perfused

intracardiacally with PBS followed by freshly prepared cold fixative (2% formaldehyde in PBS). Right and left STN muscles were removed, placed in a sylgard dish and washed with PBS. The STN muscle was used because it is a thin and flat muscle, suitable to perform a whole mount preparation and viewed under the confocal microscope and much is known about the distribution of the AChRs in this muscle (Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Marques and Santo Neto, 1998; Marques et al., 2000). The muscles were incubated with rhodamine-alpha-bungarotoxin (Rh-BTX; Molecular Probes, 1 μ g/ml) for receptors and anti-neurofilament 200 (Sigma; 1:100 in blocking solution) followed by anti-mouse IgG-fluorescein (Sigma; 1:100), for nerve terminal staining. After washing with PBS, the muscles were mounted in DABCO (mounting media for fluorescence microscopy, Sigma) 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 and UV lasers was 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 injured muscles. Two Zeiss microscope objectives, a 40X 1.4 NA water immersion objective and a 63X 1.4 NA oil immersion objective, were used for confocal imaging.

Acetylcholinesterase staining

21 (n=3), 90 (n=2) and 150 days (n=2) after lidocaine injection, the animals had their STNs incubated for acetylcholinesterase (AChE) observation as described by Strum

and Hall-Craggs, 1982. In short, the mice were perfused intracardiacally with 0.1M phosphate buffer, followed by a solution of 2% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C. The whole STN was excised and immediately immersed in the same fixative solution at 4°C. After fixation for 1-2 hours the muscle was transferred directly to an ice-cold incubation medium for the cytochemical localization of AChE activity at the neuromuscular junctions sites. The incubation medium, prepared immediately before its use, consisted of 1.0ml of indoxyl acetate and 0.2 ml of hexazotized pararosaniline in 8.8 ml citrate buffer kept cold in crushed ice. After 1 hour, the muscle was washed in citrate buffer for 2 hours at room temperature and the osmiophilic properties of the reaction product remain localized at the synaptic cleft and allow identification of acetylcholinesterase, under a stereomicroscope. The muscles were mounted on a slide in DABCO, covered with coverslip, observed under a Nikon microscope and photographed with a camera.

Muscle denervation

Some animals (n=11) were anesthetized and had their left sternomastoid muscle denervated by a cut lesion of the nerve to the STN and at the same time the muscle was injected with lidocaine hydrochloride, as above described. After 21 days, 7 mice had their muscles processed for AChRs and nerve terminal staining as described for confocal microscopy observation and after 30 days, 4 mice had their muscles processed for AChE staining as described above. No nerve terminal staining was detected in these animals. After confocal observation, the same muscles were stained with HE for evaluation of regeneration. Six mice had their left sternomastoid muscle denervated as described, but did

not receive lidocaine treatment. After 21 days, two of these had their muscles processed for AChRs labeling and confocal observation and after 30 days, the other 4 mice had their muscles processed for AChE staining.

Results

Muscle regeneration

150 days after lidocaine injection, regenerative process was predominant and there were no signs of ongoing necrosis. Cross-sections showed that the regenerating muscle fibers had returned almost to their initial size and most of the fibers had dense and still centrally placed nuclei. Cross sections of regenerated-denervated muscles showed that denervated fibers did not attain their initial size and displayed centrally placed nuclei (Fig.2).

AChRs and nerve terminal distribution

After 90 and 150 days of lidocaine injection, regenerated muscle fibers still displayed almost all of their AChRs breaking apart into islands or patches of receptors (n=416 endplates; Fig. 1), in a pattern similar to that previously described after a short time period of muscle regeneration (21 days; see Minatel et al., 2001). In long-term regenerated fibers, for both time periods, the pattern of nerve terminal distribution was complicated by the presence of fine arborizations with bulbous enlargements at their tips (Fig. 1), similar to that observed for the *mdx* mice (see Santo Neto et al., 2003). The control neuromuscular junctions displayed continuous branches of receptors covered by processes of nerve terminals (Fig.4).

In the absence of innervation, AChRs in regenerated fibers were not distributed into islands (n=900 endplates; Fig. 4). The pattern of receptor distribution was not so affected as that of the regular innervated regenerated fibers (compare Figures 1 and 4) and it was very close to that observed in denervated fibers without lidocaine (Fig. 4; n=342).

AChE distribution

In normal fibers, AChE distribution was seen as regular and continuous branches, at most of the endplates seen (n=426), resembling the normal AChRs pattern of distribution (Fig. 3). In regenerated muscle fibers after 90 and 150 days of lidocaine injection, AChE displayed a patchy distribution in almost all of the junctions examined (n=200). In denervated-regenerated fibers, the majority of the junctions did not show AChRs distributed in islands (n=60; Fig. 3). Their pattern of distribution was similar to that seen in denervated only fibers (n=50).

Discussion

The pattern of acetylcholine receptor distribution changes during the first two weeks after birth, going from an oval plaque to a branched form (Lyons and Slater, 1991; Steinbach, 1981; Balice-Gordon and Lichtman, 1993; Marques et al., 2000). The branched form is typically seen in adults, while some alterations can be detected during aging (Balice-Gordon, 1997) or under pathological conditions such as diabetes (Marques and Santo Neto, 2002) and muscular dystrophy (Lyons and Slater, 1991), when receptors break apart into islands.

In the dystrophin-deficient fibers of the *mdx* mice, receptor distribution is dramatically affected and one possibility to explain this situation was that the lack of dystrophin would difficult the anchorage of the components of the postsynaptic membrane. However, since these changes were seen in regenerated muscle fibers, it was also possible that they were due to fiber regeneration, rather than the absence of dystrophin (Torres and Duchen, 1987; Lyons and Slater, 1991).

Regenerated fibers that normally express dystrophin also display changes in the pattern of AChR distribution comparable to those seen in the *mdx* muscle fiber (Rich and Lichtman, 1989; Minatel et al., 2001), which agrees with the idea that muscle fiber regeneration leads to alterations in the assemblage of sarcolemmal postsynaptic molecules. At the present, we observed that the pattern of AChRs and nerve terminal distribution is still altered after longer periods of muscle regeneration, suggesting that the process of muscle regeneration involves long-lasting changes at the neuromuscular junction assemblage.

One possibility would be that during degeneration, proliferation of connective tissue would affect the structure of synaptic basal lamina. The synaptic basal lamina contains molecules that are specific and important for the formation and maintenance of neuromuscular junction structure, mainly s-laminin and acetylcholinesterase (for a review see Sanes and Lichtman, 1999). AChE is involved in neuromuscular transmission, being partially produced by the muscle fiber and induced by the nerve terminal (Decker and Berman, 1990). We observed that its distribution is also altered in regenerated fibers, in a manner similar to that of the receptors, i.e. patches or islands, which is expected, since in normal fibers AChE also colocalizes with the branches of receptors. Thus, muscle fiber

regeneration also leads to alterations in the distribution of a molecule at the synaptic basal lamina. Since the production of AChE is partially dictated by the nerve terminal, it would be possible that the nerve terminal is, at least in part, involved in the alterations of regenerated muscle fibers observed here.

To test this hypothesis, we denervated the muscle at the time of lidocaine injection, so that muscle fiber regeneration and neuromuscular formation would proceed without the influences of nerve terminal, only with the basal lamina synaptic clues left by the previous fiber. Under this situation, receptor distribution was branched-shaped, as well as that of AChE, comparable to that observed in normal denervated muscles. In myotubes in culture, the AChR pretzel-shape is also attained without the influences of nerve, although being headed by the plaque-shape form (Kummer et al., 2002), not seem at the present. This shows that innervation is involved in the alterations of receptor distribution seen in regenerated fibers after lidocaine, which is in agreement with earlier reports of *in vivo* observations of the sternomastoid muscle after several cut lesions (Rich and Lichtman, 1989).

During muscle fiber degeneration, nerve terminals retract (Rich and Lichtman, 1989) and sprout (Van Mier and Lichtman, 1994) until they reach the regenerated fiber. At the present, we observed that nerve terminals contain fine arborizations with bulbs at their tips and these bulbs colocalize with the dark holes in the center of AChRs islands. This pattern of distribution is similar to that seen in the *mdx* mice, being suggested that they represent intraterminal sprouts (Santo Neto et al., 2003). Thus, it would be possible that, in a first place, these sprouts direct the AChRs and AChE to aggregate to one site, inducing the remodeling of the receptors as seen in regenerated fibers after lidocaine.

The neural cell adhesion molecule (NCAM) is involved in myoblast fusion (Charlton et al., 2000), expressed during the early phases of muscle regeneration (Figarella-Branger et al., 1999) and leads to extensive intraterminal sprouting (Walsh et al., 2000). Thus, increases in NCAM could explain the changes in nerve terminal architecture and as a consequence, in AChRs distribution, as seen here. The increased production of trophic factors, such as the insulin-like growth factor (IGF), could also explain the remodeling of the neuromuscular junction observed here. IGF-1 is significantly increased following muscle injury, exclusively within regenerated fibers (Keller et al., 1999) and seems to promote nerve sprouting (Caroni et al., 1994; Flint et al., 1999). Disruptions in the exchange of trophic factors between neuromuscular junction components have also been proposed to explain the dynamic changes in aged-junctions (Balice-Gordon, 1997), which show alterations in receptor distribution similar to those observed in regenerated fibers (Balice-Gordon and Lichtman, 1990). In fact, IGF-1 has been suggested to play a central role in the changes of ageing skeletal muscle (Grounds, 2002). Thus, it would be possible that neuromuscular synapses react in a similar way in the face of different “abnormal” conditions, such as regeneration, pathologies or ageing. These rearrangements seem to be long lasting, though, and this may be explained by recent evidences pointing for a decrease in synapse plasticity as a function of age (Gan et al., 2003).

In conclusion, we have shown that nerve-dependent mechanisms induce long-lasting remodeling of the acetylcholine receptors at the postsynaptic membrane of normal regenerated muscle fibers, after lidocaine treatment. It is possible that molecules produced during muscle regeneration, such as NCAM and IGF-1, modulate synaptic structure and nerve terminal-AChRs interactions. This new pattern of synaptic structure is maintained

over time, possibly due to the strong adhesion established between the nerve terminal, synaptic basal lamina and muscle fiber and it would be interesting to verify if the remodeling of AChRs in the dystrophin-deficient fiber is also a nerve-dependent mechanism.

References

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

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 Neurosci* 1993;13:834-855.

Balice-Gordon RJ. Age-related changes in neuromuscular innervation. *Muscle Nerve Suppl* 1997;5:S83-S87.

Bonilla E, Samitt 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.

Caroni P, Schneider C, Kiefer MC, Zapf J. Role of muscle insulin-like growth factors in nerve sprouting: suppression of terminal sprouting in paralysed muscle by IGF-binding protein-4. *J Cell Biol* 1994;125:893-902.

Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989;338:259-262.

Charlton CA, Mohler WA, Blau HM. Neural cell adhesion molecule (NCAM) and myoblast fusion. *Dev Biol* 2000;221:112-119.

Decker MM, Berman HA. Denervation-induced alterations of acetylcholinesterase in denervated and nondenervated muscle. *Exp Neurol* 1990;109:247-255.

Figarella-Branger D, Pellissier JF, Bianco N, Karpati G. Sequence of expression of MyoD1 and various cell surface and cytoskeletal proteins in regenerating mouse muscle fibers following treatment with sodium dihydrogen phosphate. *J Neurol Sci* 1999;170:151-160.

Flint PW, Shiotani A, O'Malley BW. IGF-1 gene transfer into denervated rat laryngeal muscle. *Arch Otolaryngol Head & Neck Surg* 1999;125:274-279.

Gan WB, Kwon E, Feng G, Sanes JR, Lichtman JW. Synaptic dynamism measured over minutes to months: age-dependent decline in an autonomic ganglion. *Nature Neurosci* 2003;6:956-960.

Grounds MD. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: a central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology* 2002;3:19-24.

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

Hutter OF, Burton FL, Bovell DL. Mechanical properties of normal and *mdx* mouse sarcolemma: bearing on function of dystrophin. *J Muscle Res Cell Motil* 1991;12:585-589.

Keller HL, Schneider BSP, Eppihimer LA, Cannon JG. Association of IGF-I and IGF-II with myofiber regeneration in vivo. *Muscle Nerve* 1999;22:347-354.

Kummer TT, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR. Formation of a mature, branched postsynaptic apparatus in aneural muscle. Program No.28.5. 2002. Society for Neuroscience Meeting.

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

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

Marques MJ, Santo Neto H. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of non-obese diabetic mice. *Anat Rec* 2002;267:112-119.

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

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.

Pasternak C, Wong S, Elson EL. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 1995;128:355-361.

Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001;24:1575-1594.

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

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

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

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

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

Strum JM, Hall-Craggs ECB. A method demonstrating motor endplates for light and electron microscopy. *J Neurosci. Methods* 1982;6:305-309.

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

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

Van Mier P, Lichtman JW. Regenerating muscle fibers induce directional sprouting from nearby nerve terminals: studies in living mice. *J Neurosci* 1994;14:5672-5686.

Walsh FS, Hobbs C, Wells DJ, Slater CR, Fazeli S. Ectopic expression of NCAM in skeletal muscle of transgenic mice results in terminal sprouting at the neuromuscular junction and altered structure but not function. *Mol Cell Neurosci* 2000;15:244-261.

LEGENDS

Figure 1. AChRs and nerve terminal distribution in long-term regenerated fibers. 90 (A,B) and 150 (C,D) days after lidocaine injection. For both time-periods, AChRs were distributed into islands with a darker center (A,C-red; B,D). Receptors in regenerated fibers were usually brighter (B), probably due to muscle fiber atrophy. Nerve terminals (A,C-green) showed fine arborizations with bulbs at their tips, filling the center of receptor islands (C-arrow). Scale bar: 20 μ m (A); 12,5 μ m (B, C); 10 μ m (D).

Figure 2. In A, normal muscle fibers with peripheral nuclei. 150 days after lidocaine injection (B) regenerated fibers were characterized by central cell nuclei. In denervated muscles, 21 days after lidocaine injection (C), regenerated fibers displaying small diameter and centrally placed nuclei were seen. The small diameter can be partially explained by the lack of innervation, which is necessary for the normal growth of the fiber. HE. Scale bar: 30 μ m.

Figure 3. AChE distribution in regenerated fibers. In control endplates (A), AChE is distributed in continuous branches. After 90 (B) and 150 (C) days, AChE shows a patchy pattern of deposition. Denervated-regenerated fibers (D) show a branch-type distribution of AChE. Pararosaniline staining for AChE. Scale bar: 10 μ m.

Figure 4. AChR distribution in regenerated-denervated muscle fibers. In control junctions, receptors are distributed in continuous branches (A). In the absence of innervation, regenerated fibers showed receptors distributed in branches in about 95% of the endplates (B,C), in a pattern very similar to that seen in denervated fibers only (D). Scale bar: 10 μ m.