

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ELAINE CRISTINA LEITE PEREIRA

**DISTRIBUIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
NEURONAL NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE
CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS DA LINHAGEM *mdx***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Elaine Cristina Leite Pereira
e aprovada pela Comissão Julgadora
23/03/2000 M. J. Marques

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Júlia Marques

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	P414d
V.	Ex.
TOMBO BC/	41537
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PRECIS	21511,00
DATA	14-07-00
CPD	

CM-00142186-5

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

Pereira, Elaine Cristina Leite

P414d

Distribuição da óxido nítrico sintase neuronal na junção neuromuscular de camundongos distróficos da linhagem *mdx*/Elaine Cristina Leite Pereira. Campinas, SP.[s.n.], 2000.

81f. illus.

Orientadora: Maria Júlia Marques

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

1. Camundongos *mdx*. 2. Óxido nítrico sintase neuronal. 3. Junção neuromuscular. 4. Microscopia confocal. I. Marques, Maria Júlia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 23/03/00

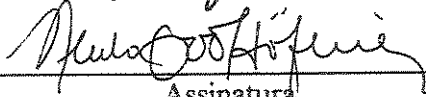
BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Profª Drª Maria Júlia Marques (Orientadora)


Assinatura

Profª Drª Maria Alice da Cruz Höfling


Assinatura

Profª Drª Tania de Fátima Salvini


Assinatura

Suplente:

Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos

Assinatura

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Orminda pela minha
formação para vida e para os estudos.

Ao Marcelo pelo carinho, apoio e compreensão em todas as
horas.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Maria Júlia Marques pela valiosa orientação, confiança, respeito e incentivo durante toda a realização do trabalho.

À FAPESP (Proc.# 98/11698-7) e à Capes pela concessão de bolsas e financiamento do projeto, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

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

À Profª Drª Valéria Helena Alves Cagnon Quitete e à Profª Drª Maria do Carmo Alberto-Rincon, pelas considerações pertinentes no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos, pelas importantes considerações no exame de qualificação, que contribuíram para minha formação profissional e pelas sugestões dadas durante a pré-banca examinadora.

Aos Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula, pelo auxílio e colaboração imprescindíveis durante a realização da parte experimental deste trabalho.

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

Às Sras. Lourdes Pinheiro, Silvia Helena Burghi kalaf, Ana Floriano Rodrigues, Odete de Camargo Fabiano, Lilian Alves Senne Panagio e Helena Regina Gomes, pela atenção que dispensaram durante todo o mestrado.

Às amigas Elaine Minatel, Regiane Luz Carvalho e Ana Cecília Nastrini Delgado, pela amizade, companheirismo, respeito e constante apoio.

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

À Deus por me dar forças para continuar a trilhar este caminho.

Muito obrigada à todos

SUMÁRIO

ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	4
1.2. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	5
1.2.1. Aspectos Clínicos	5
1.2.2. Patogênese	5
1.3. Distrofina	7
1.4. Modelos Experimentais	10
1.5. Óxido Nítrico	12
1.6. Óxido Nítrico Sintase	13
1.7. Óxido Nítrico Sintase Neuronal	14
1.8. Junção Neuromuscular	17
1.8.1. Morfologia e Organização Ultraestrutural da Junção Adulta	17
1.8.2. Compartimento Pré-Sináptico e Estruturas Associadas	18
1.8.3. Compartimento Pós-Sináptico	19
1.8.4. Compartimento Extra-Celular	21
1.8.5. Alterações Morfofuncionais na Junção Neuromuscular do Camundongo <i>mdx</i>	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. ANIMAIS	25
2.2. OBTENÇÃO DOS MÚSCULOS	25
2.2.1. Procedimentos Cirúrgicos	25
2.3. IMUNOMARCAÇÃO	26
2.3.1. Marcação da nNOS e AChRs	26
2.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
2.5. ANÁLISE DOS DADOS	29
2.6. MICROSCOPIA DE VARREDURA LASER CONFOCAL	30
2.6.1. Princípios Básicos da Confocalidade da Imagem	32

3. RESULTADOS.....	34
3.1. ANIMAIS NORMAIS.....	35
3.2. ANIMAIS DISTRÓFICOS	39
3.3. ANIMAIS DESNERVADOS	39
4. DISCUSSÃO.....	44
4.1. DISTRIBUIÇÃO DA nNOS.....	45
4.2. ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DA nNOS NO CAMUNDONGO <i>MDX</i>	49
4.3. EXPRESSÃO DA nNOS APÓS DESNERVAÇÃO.....	51
4.4. IMPORTÂNCIA FUNCIONAL DO ÓXIDO NÍTRICO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR	52
4.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ABREVIATURAS

AChRs - receptores de acetilcolina

DMD - distrofia muscular de Duchenne

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

FITC - fluoresceína isotiocianato

IgG - imunoglobulina

JNM - junção neuromuscular

NO - óxido nítrico

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

PBS - tampão fosfato

Rh-BTx - α -bungarotoxina conjugada à rodamina

SC - célula de Schwann

STN - músculo esternomastóide

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar a distribuição da óxido nítrico sintase na junção neuromuscular (JNM) de camundongos normais e da linhagem *mdx* usando um anticorpo específico contra a enzima óxido nítrico sintase neuronal (anti-nNOS) e verificar possíveis alterações na expressão desta enzima nos músculos dos camundongos distróficos da linhagem *mdx*. Os músculos esternomastóide de camundongos adultos das linhagens *mdx* e C57BL/10 foram marcados com rodamina- α -bungarotoxina para observação dos receptores de acetilcolina (AChRs) e com anticorpo primário monoclonal anti-nNOS para localização da nNOS. A microscopia confocal de fluorescência demonstrou que a nNOS estava localizada no sarcolema dos músculos esqueléticos de camundongos normais e *mdx*. Na JNM a nNOS foi detectada na região pré-sináptica, cobrindo os braços dos AChRs. Nos animais *mdx*, a expressão da nNOS estava reduzida no sarcolema e na região pré-sináptica. Em músculos controles desnervados, a nNOS continuou presente na região pré-sináptica e no sarcolema. Não foram observadas alterações qualitativas na expressão da enzima nos músculos desnervados. Esses resultados mostram que a nNOS está presente na região pré-sináptica da JNM, provavelmente nas células de Schwann terminais e que a expressão da nNOS na JNM dos animais *mdx* está diminuída. A associação entre a nNOS e componentes juncionais, tais como as células de Schwann terminais, pode abrir novas perspectivas nos estudos da biologia dos músculos distróficos.

Palavras-Chave: nNOS, *mdx*, junção neuromuscular, microscopia confocal, células de Schwann

ABSTRACT

The aim of the present investigation was to study the distribution of nitric oxide synthase at the neuromuscular junction (NMJ) of *mdx* and normals animals by using a specific antibody against the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and verify whether nNOS expression was altered in dystrophic skeletal muscle of *mdx* mice. Sternomastoid muscles of adult *mdx* and C57BL/10 mice were labelled with rhodamin- α -bungarotoxin for acetylcholine receptors (AChRs) detection and with anti-nNOS for nNOS observation. Fluorescence confocal microscopy demonstrated that nNOS immunoreactivity was mainly localized at the sarcolemma of normal and dystrophin-deficient skeletal muscles from *mdx* mice. At the NMJ, immunostaining was detected at the pre-synaptic region covering AChRs. In *mdx* animals, nNOS expression was greatly reduced in both sarcolemma and the pre-synaptic region. In controls denervated muscles, nNOS immunostaining was still present at the pre-synaptic region and at the sarcolemma. No qualitative changes in nNOS expression were observed in denervated muscles. These results show that nNOS is expressed at the pre-synaptic region of the NMJ, probably by terminal Schwann cells and that in muscles of *mdx* animals the junctional nNOS expression is also reduced. The association between nNOS and neuromuscular junction components, such as terminal Schwann cells, may open new perspectives to the better understanding of the biology of dystrophic muscles.

Key Words: nNOS, *mdx*, neuromuscular junction, confocal microscopy, Schwann cells

1. INTRODUÇÃO

As distrofias musculares englobam um grupo de patologias geneticamente determinadas, caracterizadas por alterações degenerativas progressivas das fibras musculares estriadas esqueléticas, cardíacas e lisas (SCHMALBRUCH, 1982). Dentre as distrofias, a mais comum e mais grave é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que acomete uma em cada 3300 crianças do sexo masculino. Os primeiros sinais da doença começam a aparecer na infância, por volta dos 2-3 anos de idade, quando a criança começa a ter dificuldades na marcha, culminando com a falência cárdio-respiratória por volta dos 20 anos (EMERY, 1993).

Na DMD o principal fator responsável pela patogênese da doença parece ser a falta da distrofina, um componente estrutural da membrana sarcoplasmática de músculos normais (para revisão veja TINSLEY *et al.*, 1994; BLAKE *et al.*, 1996). Sugere-se que a ausência da distrofina, observada nas distrofias musculares, leva a uma instabilidade da membrana (MENKE & JOCKUSH, 1991), facilitando a entrada de íons cálcio para a fibra muscular (TURNER *et al.*, 1991). O excesso de cálcio causa hipercontração e ativação de proteases e fosfolipases endógenas, levando à necrose da fibra muscular (CARPENTER & KARPATI, 1979; WELLER *et al.*, 1990; STEDMAN *et al.*, 1991; DICK & VRBOVA, 1993)

Recentemente foi sugerido que o óxido nítrico (NO), molécula mensageira gasosa que desempenha um amplo papel na regulação dos sistemas biológicos (para revisão veja SCHUMAN & MADISON, 1994; BREDT & SNYDER, 1994), também possa estar envolvido na patogênese da DMD (SNYDER, 1995; BRENMAN *et al.*, 1995). Acredita-se no envolvimento do NO na DMD pelo fato da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), enzima responsável pela produção do NO nos músculos esqueléticos, ter sido encontrada ligada ao sarcolema extrajuncional através da distrofina e proteínas a ela associadas, participando do complexo distrofina-glicoproteínas da membrana

(GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). A falta da distrofina leva a uma redução das proteínas a ela associadas no sarcolema de pacientes com DMD e em camundongos da linhagem *mdx* (MATSUMURA *et al.*, 1992), dentre elas a nNOS (CHANG *et al.*, 1996, GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

Os camundongos *mdx* (X-linked muscular dystrophy) constituem um modelo experimental da DMD, pois também apresentam ausência de distrofina (HOFFMAN *et al.*, 1987). A mesma alteração no gene que codifica a distrofina também foi identificada em outras espécies animais, como o cão e o gato (VALENTINE *et al.*, 1986; GASGHEN *et al.*, 1992).

Existem estudos na literatura referindo a diminuição, ou ausência da expressão da nNOS no sarcolema das fibras musculares de camundongos *mdx* e de humanos com DMD (CHANG *et al.*, 1996; GROZDANOVIC *et al.*, 1996; GROZDANOVIC & GOSRRAU, 1998; CAPANNI *et al.*, 1998), embora existam resultados contraditórios com relação à expressão da enzima em pacientes com DMD (YANG *et al.*, 1997).

No que se refere à sua distribuição, a nNOS localiza-se no sarcolema extrajuncional, estando também presente na região da junção neuromuscular (PARK *et al.*, 1996; GATH *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 1997; GROZDANOVIC & GOSRRAU, 1998). Dependendo da técnica, da espécie animal e do anticorpo utilizado, a nNOS juncional tem sido encontrada no compartimento pré-sináptico (OLIVER *et al.*, 1996), nas células de Schwann terminais (DESCARRIES *et al.*, 1998) e no sarcolema pós-sináptico (KUSNER & KAMINSKI, 1996; GROZDANOVIC *et al.*, 1997; RIBERA *et al.*, 1998; GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). Contudo, até o momento ainda não está clara a localização da enzima na região juncional, bem como se a sua expressão está diminuída nesta região, em animais distróficos. Acreditamos que os dados conflitantes existentes até o momento sejam devidos às técnicas utilizadas para análise, que permitem observar apenas secções da JNM e

não toda a região da junção.

1.1. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos:

- 1) Estudar a distribuição da nNOS na junção neuromuscular (JNM) de camundongos normais e da linhagem *mdx*, através da microscopia confocal.
- 2) Detectar de forma qualitativa, possíveis alterações na expressão da enzima na região juncional de músculos de animais normais desnervados e animais distróficos.

1.2. Distrofia Muscular de Duchenne

1.2.1. Aspectos Clínicos

Baseado em suas observações, DUCHENNE descreveu em 1861 uma doença aparentemente restrita a crianças do sexo masculino que levava a óbito por progressiva fraqueza da musculatura esquelética e que posteriormente recebeu o seu nome (ENGEL *et al.*, 1994).

Sabe-se hoje que a DMD é uma doença degenerativa progressiva das fibras musculares e que atinge 1 em 3300 crianças do sexo masculino nascidas vivas. Em média, 1 em 3 casos é resultado de mutação no óvulo da mãe ou da avó da criança.

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. As frustradas tentativas de andar são seguidas por freqüentes quedas. O quadro clínico é caracterizado pelo aumento do volume das panturrilhas e por um andar cauteloso, devido à fraqueza muscular progressiva. Aos 12 anos, freqüentemente a criança não consegue mais andar. A fraqueza inicia-se nos músculos proximais, estendendo-se até os músculos mais distais. Nas fases terminais restam apenas movimentos dos dedos, da língua e dos músculos da respiração. Em torno de 20 anos o paciente vai a óbito por broncopneumonia e/ou falência cardíaca (ENGEL *et al.*, 1994).

1.2.2. Patogênese

Por muitos anos acreditou-se que a patogênese da doença era devida a um comprometimento dos vasos sangüíneos intramusculares. Em um terço dos casos, a doença era atribuída a alterações

cognitivas. O primeiro indício sobre o mecanismo da patogênese da doença foi encontrado com estudos que usaram microscopia eletrônica, os quais observaram pequenas descontinuidades no sarcolema da fibra muscular distrófica (MORKI & ENGEL, 1975). Sugeriu-se que através desses espaços na membrana havia um maior influxo de Ca^{++} na fibra muscular, com subsequente ativação de proteases e fosfolipases que degeneram a fibra muscular (ENGEL *et al.*, 1994).

A DMD começou a ser melhor entendida quando concluiu-se que o gene para essa patologia deveria ser recessivo e ligado ao cromossomo X, pois a distrofia só afetava homens. Hoje é sabido que a anormalidade genética está localizada no braço curto do cromossomo X (*locus* Xp21). Este gene é atualmente o maior já descoberto, medindo aproximadamente 2.4 megabases de DNA, ou seja, cerca de 1% do total do cromossomo X. O gene apresenta 2.10^6 pares de bases e 79 exons, codificando a proteína chamada distrofina. Devido ao tamanho e complexidade do gene, é elevada a taxa de mutação, deleções ou duplicações (TINSLEY *et al.*, 1994). Isto resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, produzindo geralmente uma proteína instável e facilmente degradada por proteases endógenas (SEIXAS *et al.*, 1997).

Uma vez que a doença afeta somente os músculos (DUBOWITZ & CROME, 1969; TOMLINSON *et al.*, 1974), não é sabido até o momento se há envolvimento nervoso. Descobertas recentes têm sugerido que proteínas possivelmente envolvidas na patogênese das distrofias, como a nNOS, têm regulação nervosa (GROZDANOVIC & GOSSRAU, 1998). Acredita-se que a nNOS possa participar da modulação fisiológica da liberação de acetilcolina e, em analogia com o sistema nervoso central, o NO produzido pela nNOS pode estar envolvido no desenvolvimento e regeneração da junção neuromuscular (RIBERA *et al.*, 1998).

1.3 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). A molécula consiste de uma longa cadeia de 120 nm de comprimento, formada por uma tripla hélice de 2700 aminoácidos (McCOMAS, 1996).

Inicialmente não era clara a localização da distrofina na fibra muscular. Os primeiros estudos de imunolocalização da distrofina em músculos esqueléticos mostraram que ela estava localizada no sarcolema (ARAHATA *et al.*, 1988; BONILLA *et al.*, 1988; ZUBRZYCKA-GRAARN, 1988; SAMIT & BONILLA, 1990). Imunoeletromicroscopia e estudos com criofratura também indicavam a presença da distrofina no sarcolema (WATKINS *et al.*, 1988; CARPENTER *et al.*, 1990; CULLEN *et al.*, 1990; BYERS *et al.*, 1991; CULLEN *et al.*, 1991; SQUARZONI *et al.*, 1992; WAKAYAMA *et al.*, 1993). Atualmente sabe-se que a molécula encontra-se 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 (Fig. 1A). O complexo distrofina-glicoproteínas está organizado em distroglicanas, sarcoglicanas e complexo sintrofina (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

Estudos subseqüentes mostraram a presença da distrofina na junção neuromuscular (JNM) (Fig. 1B) de mamíferos e na membrana pós-sináptica da eletroplaca do *Torpedo marmorata* (JASMIN *et al.*, 1990; YEADON *et al.*, 1991; para revisão veja BERTHIER & BLAINEAU, 1997).

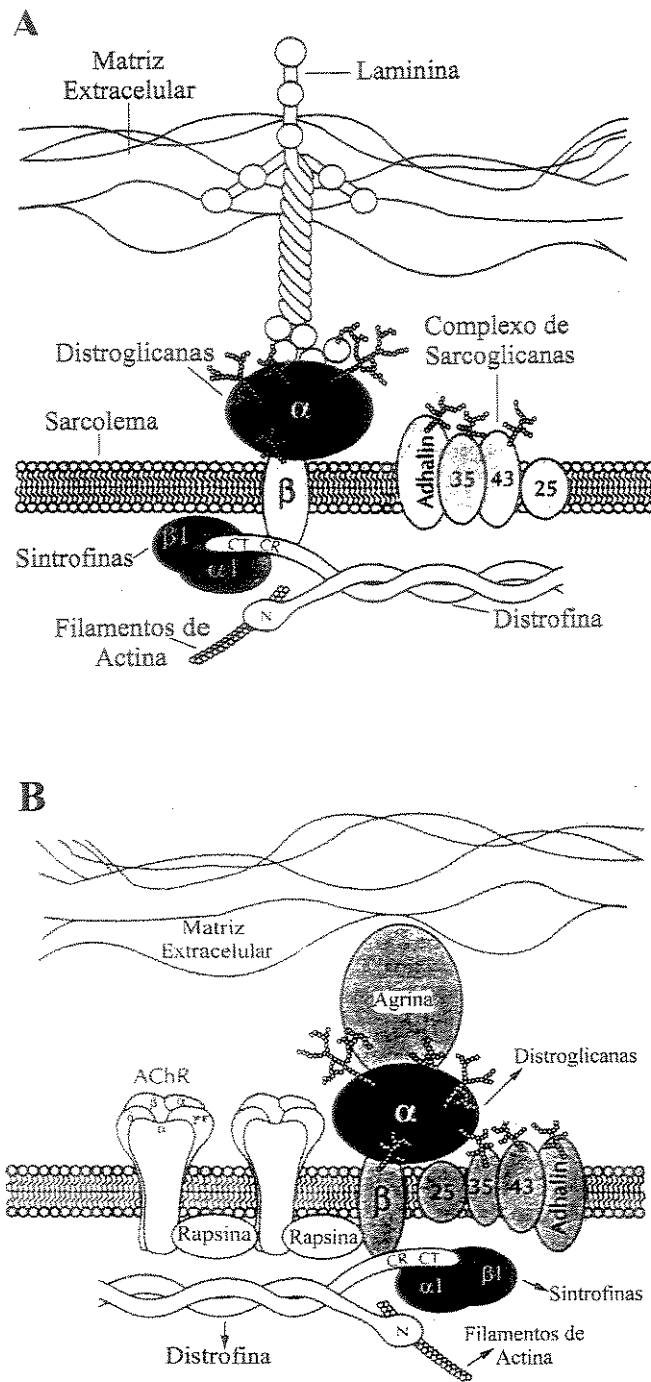


Figura 1. Organização molecular do complexo distrofina glicoproteínas no sarcolema extrajuncional (Fig. 1A) e na junção neuromuscular (Fig. 1B). CT: Domínio carboxi terminal, CR: Domínio rico em cisteína, N: Domínio amino terminal. Adaptado de Sunada & Campbell, *Curr. Op. Neurology*, 8, p.379-384, 1995.

Diferentemente dos músculos esqueléticos que só expressam a distrofina de 427 kDa, o SNC expressa outros tipos de distrofina, localizados na densidade pós-sináptica. Esses tipos de distrofina são variantes codificadas pela parte 3' do gene da distrofina, geradas por ligações alternativas e pelo uso de diferentes promotores internos. A densidade pós-sináptica é uma região densa do citoesqueleto submembranoso, encontrada nas membranas pós-sinápticas do SNC.

Os produtos do gene da distrofina, chamados Dps, são distrofinas de menor massa molecular, sendo atualmente conhecidas as Dp40, Dp71, Dp116, Dp140 e Dp260 (RIVIER *et al.*, 1996; De STEFANO *et al.*, 1997; RIVIER *et al.*, 1997). As distrofinas curtas perdem o domínio N-terminal que se liga à actina e à maioria da cadeia longa da distrofina, mas conserva o domínio rico em cisteína e o domínio C-terminal da distrofina. Esses dois domínios conservados interagem com o complexo de proteínas associado à distrofina, formando uma ligação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular. As distroglicanas são o centro desta ligação, as β -distroglicanas ligam o domínio rico em cisteína da distrofina às glicoproteínas subsarcolemais e a α -distroglicana se liga à laminina. Estudos têm identificado os tipos de distrofina no SNC de diferentes espécies. A distrofina de 427 kDa e Dp116 foi observada nas células de Schwann perineuronais de nervos periféricos e a Dp71 nos axônios de *Torpedo marmorata* (RIVIER *et al.*, 1997). As Dp116 e 140 foram encontradas nas SCs perineuronais do gânglio cervical superior de camundongos, associadas à membrana plasmática na PSD e à organelas citoplasmáticas, como o retículo endoplasmático (De STEFANO *et al.*, 1997).

A distrofina presente nos músculos esquelético, cardíaco e liso, bem como a encontrada em regiões do cérebro como o hipocampo e corpo amigdalóide, são similares, diferindo apenas em ligações do domínio amino terminal, o que sugere uma explicação para a deficiência mental observada em 30 % dos pacientes com DMD (HOFFMAN *et al.*, 1987; ENGEL *et al.*, 1994).

A expressão da distrofina é regulada durante a miogênese. No músculo esquelético ela é primeiro detectada no citoplasma dos miotúbulos embrionários. Subseqüentemente, durante o desenvolvimento fetal, a expressão da distrofina aumenta e a proteína adquire a localização no sarcolema (WESSELS *et al.*, 1991; CLERK *et al.*, 1992).

Em vista da sua localização e constituição, a distrofina é considerada uma proteína do citoesqueleto muscular, funcionando como ligação entre o aparato contrátil e o sarcolema (TINSLEY, *et al.*, 1994), estabilizando e prevenindo formação de falhas no sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento muscular, mantendo assim a integridade das fibras musculares (GRAMOLINI & JASMIN, 1998).

1.4. Modelos Experimentais

Camundongos *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) são utilizados como um modelo experimental da DMD, pois também apresentam ausência de distrofina (HOFFMAN *et al.*, 1987; STEDMAN *et al.*, 1991; PARTRIDGE, 1991). Tal como observado na DMD, os camundongos da linhagem *mdx* apresentam uma miopatia degenerativa hereditária ligada ao cromossomo X, com altos níveis séricos de piruvato kinase (PK; EC 2.7.1.40) e de creatina kinase (CK; EC 2.7.3.2) (BULFIELD *et al.*, 1984). Entretanto, a miopatia do *mdx* contrasta com a doença humana, pois machos e fêmeas são afetados (TORRES & DUCHEN, 1987) e seus músculos regeneram sucessivamente após um período de necrose, não havendo substituição do tecido muscular por tecido adiposo. Na distrofia humana há uma degeneração progressiva das fibras musculares (CHANG *et al.*, 1996), porém é comum encontrar pequenos grupos de fibras em regeneração perto

das áreas necróticas (ENGEL *et al.*, 1994).

Após 18 meses de idade, a patologia do *mdx* apresenta-se progressiva e com sinais clínicos da distrofia humana, ou seja, degeneração progressiva, distúrbios locomotores, deposição de tecido adiposo e diminuição da sobrevida. Entretanto, o músculo diafragma do *mdx* começa a apresentar degeneração e fibrose semelhante aos músculos de pacientes com DMD mais cedo, em torno de 30 dias de idade (STEDMAN *et al.*, 1991; LEFAUCHEUR *et al.*, 1995; SEIXAS *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 1998).

Além dos camundongos *mdx* existem dois outros modelos animais com deficiência de distrofina: a distrofia muscular ligada ao cromossomo X canina e a felina (VALENTINE *et al.*, 1986; GASGHEN *et al.*, 1992). No cão a doença parece ser mais severa, com início e evolução mais rápida que a distrofia humana (PASTERNAK *et al.*, 1995). Em camundongos e gatos a fibrose do tecido muscular é moderada e o processo de regeneração é maior. No gato, apesar do processo de fibrose ser mais brando, ele desenvolve hipertrofia muscular exagerada com evolução fatal (GASGHEN *et al.*, 1992). Em certas aves, como a galinha, o pato e o peru, e alguns mamíferos, tais como a marta, o hamster e o carneiro, a distrofia muscular tem característica autossômica recessiva, não estando relacionada à deficiência de distrofina (SEIXAS *et al.*, 1997).

O conhecimento de outras espécies, além da humana, que apresentem deficiência de distrofina é importante para análise comparativa das consequências patológicas originadas pela ausência do complexo distrofina-glicoproteínas. Isto auxilia na compreensão do porque a falta de distrofina e das proteínas associadas, leva a uma doença devastadora no homem e no cachorro e uma doença relativamente suave no camundongo e no gato.

1.5. Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que durante muitos anos, foi conhecido apenas como constituinte da fumaça liberada pelos carros, estando associado à destruição da camada de ozônio (HÖLSCHER, 1997). Originalmente os efeitos biológicos do NO foram descritos na inibição da contração da musculatura lisa vascular (para revisão veja NATHAN, 1992). No sistema nervoso central (SNC), o NO foi identificado inicialmente nos neurônios do cerebelo e posteriormente, como mensageiro neuronal das sinapses do SNC. A maioria das ações do NO são mediadas através da estimulação da guanilil ciclase que cataliza a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (CHAO *et al.*, 1997). Muitos estudos mostram o NO presente no hipocampo, envolvido nos fenômenos de aprendizado e memória, ou seja, na plasticidade sináptica (para revisão veja SCHUMAN & MADISON, 1994).

As funções e os órgãos alvo do NO não são ainda completamente esclarecidos. Sabe-se que ele desempenha diferentes papéis em vários sistemas, incluindo o sistema imune, através de ações citotóxicas e bactericidas dos macrófagos (MARLETTA *et al.*, 1989) e no sistema cardiovascular, regulando a pressão arterial através do relaxamento dos vasos sanguíneos. No sistema nervoso autônomo foi encontrado nos neurônios do plexo mioentérico participando das respostas fisiológicas do esôfago, estômago, duodeno e corpos cavernosos do pênis (NATHAN, 1992). Além disso, o NO tem sido relacionado a diversos estados patológicos, como o choque séptico, hipertensão, acidentes vasculares cerebrais e doenças neurodegenerativas (para revisão veja BREDT & SNYDER, 1994).

Nos músculos estriados esqueléticos, a produção do NO está envolvida no desenvolvimento do músculo normal, agindo como molécula mensageira para fusão dos mioblastos (LEE *et al.*, 1994) e na patofisiologia da degeneração muscular em algumas doenças (TEWS *et al.*, 1997), além de

outros efeitos, tais como modulação da força de contração, da função mitocondrial e limitação do consumo de oxigênio (GATH *et al.*, 1996).

Como o NO é um gás, não pode ser estocado ou inativado após sua liberação por mecanismos regulatórios convencionais (BREDT & SNYDER, 1994). Por isso, a maioria das pesquisas procuram identificar a óxido nítrico sintase (NOS), enzima que catalisa a formação do NO, sendo então uma evidência de que o NO está sendo produzido (KUSNER & KAMINSKI, 1996).

1.6. Óxido Nítrico Sintase

O NO é formado no meio intracelular pela ação da óxido nítrico sintase (NOS; EC 1.14.13.39), enzima que cataliza a oxidação do grupo guanidina da L-arginina, num processo que consome cinco elétrons, resultando na formação de citrulina e NO, de forma Ca^{++} /calmodulina dependente (SCHUMAN & MADISON, 1994).

Diversos tipos de NOS foram identificadas nos macrófagos, neutrófilos, hepatócitos, células da glia (SCHUMAN & MADISON, 1994), nos músculos estriados esqueléticos (KOBZIK *et al.*, 1994) e na junção neuromuscular (GATH *et al.*, 1996, RIBERA *et al.*, 1998). Três tipos principais de NOS têm sido mais estudadas, a tipo endotelial (eNOS ou tipo III), chamada de constitutiva, originalmente descoberta nas células endoteliais, a tipo neuronal (nNOS, bNOS ou tipo I), originalmente descoberta nos neurônios e também considerada constitutiva e a macrofágica (tipo II) ou induzível, originalmente descoberta nos macrófagos (BREDT & SNYDER, 1994; GROSS & WOLIN, 1995).

Os três tipos de NOS foram encontrados nos músculos estriados esqueléticos da maioria dos mamíferos (FÖRSTERMANN *et al.*, 1998). A nNOS está presente no sarcolema das fibras musculares (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999), entretanto discute-se a localização da enzima na junção neuromuscular. A eNOS foi encontrada no sarcoplasma e mitocôndrias das fibras musculares de ratos, sendo sugerido que o NO produzido por ela provoca redução da taxa de liberação de cálcio e diminuição da força contrátil, como na musculatura vascular (KOBZIK *et al.*, 1994; TEWS *et al.*, 1997). Uma pequena quantidade de iNOS foi encontrada nos músculos esqueléticos de humanos (PARK *et al.*, 1996) e no sarcolema pós-sináptico da JNM de humanos e ratos (YANG *et al.*, 1997), mas a sua síntese pode ter sido induzida por citocinas, inflamações e outros processos patológicos (WILLIAMS *et al.*, 1994; YANG, *et al.*, 1997).

1.7. Óxido Nítrico Sintase Neuronal

A expressão da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) foi identificada inicialmente nos corpos celulares dos neurônios (BREDT & SNYDER, 1994) e posteriormente também em outros tipos celulares, tais como células epiteliais, células da mácula densa e fibras musculares (CHAO *et al.*, 1997). Atualmente acredita-se que os músculos esqueléticos são quantitativamente a mais importante fonte de nNOS (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

O NO é produzido nos músculos estriados esqueléticos pela nNOS e por um subtipo de nNOS chamada nNOS μ , a qual exibe uma atividade catalítica similar a nNOS. A nNOS μ foi identificada somente nos músculos esquelético e cardíaco, e sua expressão é induzida coincidentemente com a fusão dos miotúbulos em cultura de células (SILVAGNO *et al.*, 1996).

Nas fibras musculares, a nNOS é expressa no sarcolema, interagindo com um complexo de proteínas associadas à distrofina, mais especificamente ligada a $\alpha 1$ -sintrofina através de interações do tipo PDZ (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). O termo PDZ deriva das três proteínas onde esses domínios foram inicialmente identificados: proteína 95 da densidade pós-sináptica (PSD-95), proteína do disco largo da junção septada de *Drosophila* (Dlg) e a proteína 1 da zona ocludens (ZO-1) das junções tipo “tight” do tecido epitelial (CHO *et al.*, 1992). Interações tipo PDZ são domínios onde ocorrem ligações específicas entre moléculas envolvidas em vias de transmissão de sinais, funcionando como um módulo de reconhecimento de proteínas nos sítios de comunicação célula-célula, como nas junções sinápticas (HILLIER *et al.*, 1999). O domínio PDZ da $\alpha 1$ -sintrofina se liga ao domínio PDZ contido na região N-terminal da nNOS, ligando a enzima ao sarcolema.

O complexo distrofina-glicoproteínas também é encontrado no compartimento pós-sináptico da JNM (BERTHIER & BLAINEAU, 1997), entretanto há controvérsias com relação à presença da nNOS no compartimento pré-sináptico. Alguns autores acreditam que em músculos distróficos a nNOS seja deslocada para o citoplasma, sugerindo que essa alteração na localização da enzima promova a interação do NO com superóxidos, contribuindo para necrose da fibra muscular (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

A localização da nNOS tem variado dependendo da espécie estudada, das técnicas de processamento dos tecidos e da forma de análise. Assim, por exemplo, a enzima foi observada exclusivamente no sarcolema das fibras musculares do tipo II (KOBZIK *et al.*, 1994), igualmente no sarcolema das fibras do tipo I e II (GROZDANOVIC *et al.*, 1995; GROZDANOVIC *et al.*, 1996), no sarcolema e citoplasma das fibras do tipo I e II, com predomínio nas fibras do tipo I (FRANDSEN *et al.*, 1996). Entretanto, estudos recentes indicam que o aumento da atividade da

nNOS e o fenótipo da fibra muscular não estão funcionalmente relacionados (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

Na junção neuromuscular, também não está claro se a enzima é expressa no terminal nervoso (OLIVER *et al.*, 1996; RIBERA *et al.*, 1998), nas células de Schwann terminais (DESCARRIES *et al.*, 1998) ou no compartimento pós-sináptico (KUSNER & KAMINSKI, 1996; GROZDANOVIC *et al.*, 1997; YANG, *et al.*, 1997; GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). Em músculos desnervados, as dúvidas permanecem, pois há relatos do aumento da expressão da enzima (RIBERA *et al.*, 1998) e diminuição da expressão da nNOS após desnervação (OLIVER *et al.*, 1996).

O acúmulo da nNOS nos sítios sinápticos juncionais, da mesma forma que no SNC, sugere um papel do NO na transmissão neuromuscular. Entretanto não há dados até o momento sobre os mecanismos que regulam a atividade da nNOS na JNM. Sabe-se que a nNOS é uma enzima Ca^{++} /calmodulina dependente e que provavelmente o influxo de íons Ca^{++} seja mais um fator na cascata de eventos que levam ao aumento da nNOS (GROZDANOVIC & GROSSRAU, 1998). Alguns autores vêm sugerindo uma sequência de eventos análoga ao do SNC para produção do NO na junção neuromuscular, onde o NO poderia servir como um mensageiro retrógrado, provavelmente com ação mediada pelo GMPc, podendo estar envolvido na eliminação da polinervação das fibras musculares durante o desenvolvimento (GROZDANOVIC & GOSSRAU, 1998; GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

Os músculos esqueléticos são a maior fonte de nNOS no organismo humano. O fato dela estar ausente no sarcolema de pacientes com distrofia muscular de Duchenne é um aspecto clínico importante que leva ao estudo desta enzima, pois sugere que a nNOS possa estar envolvida na patogênese molecular desta doença (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). Entretanto, não é sabido se a nNOS está envolvida na patogênese atuando como uma enzima que sintetiza NO ou

como uma proteína estrutural da membrana, parte do complexo estrutural do complexo-distrofina-glicoproteínas.

1.8. Junção Neuromuscular

1.8.1. Morfologia e Organização Ultraestrutural da Junção Adulta

A estrutura, função e organização da junção neuromuscular (JNM) dos vertebrados têm sido extensamente discutidas na literatura desde 1840 (SALPETER, 1987). Entretanto, os estudos modernos da organização ultraestrutural e molecular tiveram início há aproximadamente 40 anos (para revisão veja PALADE & PALAY, 1954; ANDERSON-CEDERGREEN, 1959; COUTEAUX, 1973; SHOTTON *et al.*, 1979; CARTAUD *et al.*, 1981). O conhecimento da morfologia e função da junção neuromuscular tem aumentado, juntamente com o aprimoramento e aquisição de novas técnicas para a sua observação e análise.

Descreve-se na junção neuromuscular dos vertebrados um compartimento pré-sináptico, um compartimento pós-sináptico e entre os compartimentos pré e pós-sinápticos um compartimento extracelular. O compartimento pós-sináptico é constituído pelas dobras da membrana da fibra muscular e pelo sarcoplasma subjacente à essa região, chamado de sarcoplasma pós-juncional. .

1.8.2. Compartimento Pré-Sináptico e Estruturas Associadas

Os músculos esqueléticos são inervados por axônios de motoneurônios, cujos corpos celulares estão na coluna anterior da medula espinhal. Após a formação dos plexos nervosos, os axônios se dirigem aos músculos, nos quais penetram pelo hilo neurovascular. A seguir, dividem-se em numerosos feixes intramusculares que caminham entre as fibras musculares. Os axônios motores abandonam o feixe nervoso intramuscular passando a se chamar axônios pré-terminais. Próximo do contato com a fibra muscular os axônios pré-terminais perdem sua bainha de mielina e sofrem finas arborizações com as terminações levemente dilatadas, chamadas de botões terminais ou terminais nervosos. Os terminais nervosos acomodam-se em depressões na superfície das fibras musculares denominadas fendas sinápticas primárias e são cobertos por prolongamentos citoplasmáticos das células de Schwann (para revisão veja 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 1000 a 50.000 moléculas do neurotransmissor acetilcolina (ACh)(WEINER & TAYLOR, 1985). Muitas vesículas estão agrupadas próximas de placas densas na superfície interna da membrana pré-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 reabsorvidas pela superfície pré-sináptica, para formação de novas vesículas (HEUSER & REESE, 1981). No terminal também são encontradas, em menor número, vesículas elétron-densas que contém neuropeptídeos, tal como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MATTEOLI *et al.*, 1990). O terminal nervoso também possui numerosas mitocôndrias para suprir a energia necessária para síntese, estocagem e liberação de transmissores.

Em contraste com o terminal nervoso, o axônio pré-terminal não apresenta zonas ativas, contém poucas vesículas e mitocôndrias, sendo preenchido por filamentos do citoesqueleto (HALL & SANES, 1993).

As células de Schwann (SCs) da JNM são especializadas, denominadas de células de Schwann terminais. As células de Schwann pré-terminais formam a bainha de mielina nos axônios e as terminais recobrem os terminais nervosos, protegendo o terminal de lesões químicas e mecânicas. Três evidências sugerem que as SCs terminais podem desempenhar outros papéis além de proteção da JNM. Primeiro, após lesão axonal elas emitem prolongamentos citoplasmáticos e fagocitam os restos dos terminais degenerados e participam da remodelação axonal (REYNOLDS & WOOLF, 1992). Segundo, exibem transporte de cálcio em resposta a despolarizações no axônio, evidenciando que são sensíveis a sinais elétricos (JAHRONI *et al.*, 1992; REIST & SMITH, 1992). E também adquirem a habilidade de sintetizar e secretar ACh após desnervação e são capazes de transmitir sinais elétricos ao músculo (BIRKS *et al.*, 1960; BROCKES *et al.*, 1984).

1.8.3. Compartimento Pós-Sináptico

O compartimento pós-sináptico é composto pelo sarcolema imediatamente abaixo do terminal nervoso. O sarcolema pós-sináptico é pregueado, contendo as dobras juncionais. As dobras juncionais têm cerca de 1 μm de profundidade e o espaço contido dentro das dobras é chamado de fenda sináptica secundária. Abaixo da membrana pós-sináptica há um aglomerado de núcleos denominados núcleos subsinápticos, que são morfológicamente diferentes dos não sinápticos e

contém genes que transcrevem proteínas da membrana sináptica (para revisão veja HALL & SANES, 1993).

As aberturas das dobras juncionais estão alinhadas com as zonas ativas do compartimento pré-sináptico. Existem duas regiões diferentes na dobra juncional: o ápice, onde os 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 (HALL & SANES, 1993). Os AChRs são pentâmeros dispostos em torno de canais iônicos que se abrem quando a ACh liga-se a eles, sendo responsáveis pela recepção e transdução de sinais químicos (para revisão veja 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 à distrofina. No topo das dobras juncionais também existem 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 unem o citoesqueleto abaixo do sarcolema à membrana basal (OHLENDIECK *et al.*, 1991; MAN *et al.*, 1991; BEWICK *et al.*, 1992).

São descritos vários complexos de proteínas ligados ao citoesqueleto da JNM, que parecem estar envolvidos no seu desenvolvimento e organização funcional. Muitas dessas proteínas estão localizadas no sarcolema pós-sináptico. Dentre elas estão os canais de sódio voltagem-sensíveis, β -integrina, utrofina, desmina, espectrina, actina, entre outras, como a molécula neuronal de adesão celular (NCAM), exclusivamente encontrada na JNM adulta, exceto na regeneração muscular (RIEGER *et al.*, 1985; COVAULT & SANES, 1986; KNUDSEN, 1990) e indutor de atividade do receptor de acetilcolina (ARIA), que é um fator neuronal envolvido no acúmulo específico de AChRs na JNM (DUCLERC & CHANGEUX, 1995; GRINNEL, 1995),

Como a JNM compreende uma pequena fração da fibra muscular, progressos na identificação dos componentes e novas moléculas dependem de avanços nas técnicas como a imunocitoquímica, o isolamento e clonagem de proteínas, juntamente com o aprimoramento da microscopia óptica e eletrônica.

1.8.4. Compartimento Extra-Celular

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

Embora a membrana basal sináptica seja indistinguível morfológicamente da extrasináptica, a sináptica é bioquimicamente especializada, pois contém proteínas distintas (SANES, 1995; CARBONETTO & LINDENBAUM, 1995), tais como a agrina, que desempenha papel na agregação dos AChRs (HOCH *et al.*, 1994), a acetilcolinesterase que inativa o neurotransmissor e outras como a S-laminina, ARIA, collagenases III e IV, heparan sulfato e o fator de crescimento de fibroblastos (HALL & SANES, 1993).

1.8.5. Alterações Morfofuncionais na Junção Neuromuscular do Camundongo *mdx*

O desenvolvimento das junções neuromusculares dos camundongos distróficos *mdx* é semelhante ao do animal normal. 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).

A arquitetura do terminal nervoso é diferente no *mdx*. Frequentemente o terminal aparece mais complexo, com um grande aumento no número de botões terminais (LYONS & SLATER 1991). Contudo, aparentemente possui quantidades normais de mitocôndrias e vesículas sinápticas (TORRES & DUCHEN, 1987).

As alterações no terminal parecem ocorrer paralelamente à diminuição da complexidade da membrana pós-sináptica, onde observam-se as principais alterações estruturais da JNM do *mdx*. Quando o animal tem cerca de 4-6 semanas de vida, começa a ser percebida uma redução no número e profundidade das fendas sinápticas secundárias (TORRES & DUCHEN, 1987) e uma redistribuição similar acontece com os AChRs e com a AChE. Os AChRs tendem a se apresentar em pequenos aglomerados com poucos μms de diâmetro, diferentemente da distribuição em braços contínuos observada em junções normais. Essa redistribuição das moléculas pós-sinápticas é observada somente em fibras musculares com núcleo central. Possivelmente as alterações pós-sinápticas são reflexo da lesão recorrente na região da JNM, devido aos repetidos ciclos de necrose seguido de regeneração (LYONS & SLATER, 1991).

Apesar das anormalidades morfológicas, as propriedades fisiológicas da junção não apresentam diferenças significativas em relação a camundongos normais. A resposta pós-sináptica à liberação de uma única vesícula sináptica, chamada potencial de placa terminal em miniatura (PPTM)

é normal no *mdx*. A quantidade de vesículas necessárias para gerar um potencial de placa motora, a amplitude, a frequência, o decurso temporal do PPTM e o número de AChRs na membrana pós-sináptica no camundongo *mdx* também não diferem dos normais. Esses resultados indicam que a atividade do terminal nervoso e da membrana pós-sináptica permanecem normais (LYONS & SLATER, 1991). As alterações na região juncional de pacientes com DMD são similares ao do *mdx* (ENGEL *et al.*, 1994).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

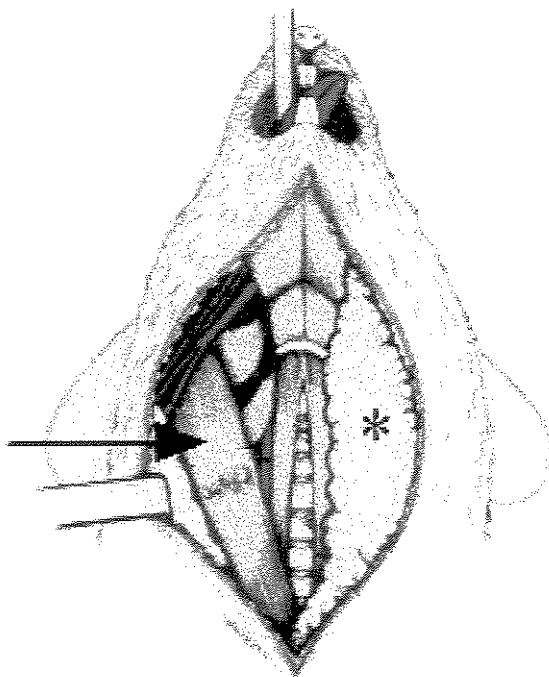
Foram utilizados camundongos adultos de 3 a 5 meses de idade de ambos os sexos da linhagem *mdx*, adquiridos no Biotério do Departamento de Imunologia, ICB, USP. Os camundongos controle pertenciam à linhagem C57BL/10, adquiridos no Biotério Central da UNICAMP, os quais são heterozigotos para o gene que desencadeia a distrofia muscular e que deram origem à linhagem *mdx* (BULFIELD, *et al.*, 1984). Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia, IB, UNICAMP em caixas plásticas padrão, com condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) com ração e água *ad libitum*.

2.2. Obtenção dos Músculos

2.2.1. Procedimentos Cirúrgicos

Após pesagem e anestesia com hidrato de cloral 10 % intra-peritoneal na dosagem de 0.2 ml/20g de peso corporal, os animais eram perfundidos via cardíaca com 20 ml de tampão fosfato (PBS; 14 g de fosfato de sódio monobásico, 4,3 g de fosfato de potássio bibásico anidro e 72 g de cloreto de sódio em 1 litro de água destilada, pH 7.5), seguida por 20 ml de fixador paraformaldeído 4 % em PBS. A seguir, a pele da região ventral do pescoço era aberta por uma incisão longitudinal na linha mediana, desde o ápice da mandíbula até a incisura esternal. As glândulas submandibulares eram então visualizadas e rebatidas lateralmente e os músculos esternomastóide (STNs) de ambos os lados expostos (Fig. 2).

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



Após fixação *in situ* com paraformaldeído 4 % por 15 minutos, os músculos STNs eram lavados com PBS, retirados cuidadosamente e presos pelas extremidades proximal e distal com alfinetes entomológicos em cubas contendo Sylgard, em PBS. A seguir procedia-se a marcação da nNOS e dos receptores de acetilcolina (AChRs).

2.3. Imunomarcção

2.3.1. Marcação da nNOS e AChRs

Os músculos foram incubados com glicina 0.1 M por 20 minutos em agitador orbital (Fanem 255-B), à temperatura ambiente, para inativação do fixador. A seguir, os músculos foram incubados

com colagenase tipo I (Sigma C-0130, 1 mg/ml) por 10 minutos em agitador, à temperatura ambiente, para que o tecido conjuntivo que restava preso ao músculo se soltasse. Após serem lavados com PBS, os músculos foram incubados por 30 minutos em agitador, à temperatura ambiente, com α -bungarotoxina conjugada à rodamina (Rh-BTx, Molecular Probes T-1175, 1 μ l:100 μ l em PBS), para marcação dos AChRs. Após várias lavagens com PBS, os músculos foram incubados com Triton X-100 1 % (Sigma T-9284) durante 1 hora em agitador, para permeabilização do tecido. A seguir, os músculos ficaram de 4 a 6 horas em solução bloqueadora (125 μ l de Triton X-100, 1 ml de Soro Albumina Bovina (Sigma P-0834), diluídos em 23.8 ml de PBS) no agitador, com objetivo de bloquear ligações inespecíficas do anticorpo primário. Os músculos foram então incubados por 12 horas com anticorpo primário anti-nNOS, monoclonal anti-nitric oxide synthase–Brain (Sigma N-2280; 1 μ l:100 μ l em solução bloqueadora), à 4°C. Após 7-8 lavagens sucessivas com PBS (20 ml) durante 30 minutos, era colocado o anticorpo secundário, anti-mouse-IgG-FITC (Sigma F-0257, 1 μ l:100 μ l em solução bloqueadora) durante 3 horas no agitador, à temperatura ambiente. Os músculos foram lavados com PBS e montados inteiros em lâmina e lamínula em meio especial de montagem para fluorescência (DABCO – Sigma D-2522). Foi adicionado ao meio de montagem o marcador de DNA nuclear DAPI (Sigma D-9542), o que possibilitou a visualização dos núcleos celulares das células presentes na JNM.

2.4. Grupos Experimentais

Grupo 1 - Marcação da nNOS e AChRs: Neste grupo foram utilizados 10 animais, sendo 5 *mdx* e 5 C57BL/10, totalizando 20 músculos.

Foram analisadas em média 7 a 8 junções por músculo. Os STNs dos animais *mdx* e dos controles foram marcados segundo o protocolo já descrito para observação dos AChRs e da nNOS. Este grupo teve por objetivo verificar possíveis alterações na expressão da enzima nos músculos de animais *mdx*, bem como estudar o padrão de distribuição da enzima na região juncional dos controles e *mdx*.

Grupo 2 – Controle do Anticorpo Primário: Foram utilizados 5 animais C57BL/10, totalizando 10 músculos. Os procedimentos para obtenção e processamento dos músculos foram idênticos aos já descritos anteriormente, exceto o fato de não terem sido incubados com o anticorpo primário anti-nNOS. Durante essa etapa, os músculos permaneciam em solução bloqueadora pelo mesmo período de 12 horas, à 4°C. A seguir, foram obedecidos os mesmos passos do protocolo já descrito. Não foram observadas estruturas marcadas neste grupo, indicando que a marcação com anticorpo primário utilizado neste estudo era específica.

Grupo 3 – Desnervação: Neste grupo foram utilizados 5 animais C57BL/10 com STN do lado esquerdo desnervado. O objetivo foi verificar a importância da inervação para a expressão da enzima. Os músculos STNs do lado esquerdo dos animais foram desnervados e o direito usado como controle. Os animais foram anestesiados via intra-peritoneal com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar®, Parke-Davis) e cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer) na proporção de 1:1 e dose de 0.1 ml/26 g de peso corporal. O músculo STN esquerdo era exposto e o seu nervo seccionado. Após 14 dias, os músculos eram retirados e marcados conforme já descrito, para visualização dos AChRs e nNOS.

Os músculos dos animais C57BL/10 e *mdx*, e os músculos dos animais C57BL/10

desnervados e não desnervados foram processados de forma idêntica e simultânea.

2.5 Análise dos Dados

Os músculos 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 40X (1.2NA) de imersão em água, 63X (1.4NA) de imersão em óleo e 100X (1.4NA) de imersão em óleo. A linha 488 nm do laser Ar-Kr foi utilizada para excitar a fluoresceína (nNOS), a linha 568 nm para a rodamina (AChRs) e a linha 351 nm do UV para o DAPI (núcleos celulares). A observação concomitante de DAPI+FITC foi possível com a utilização de filtros de emissão OG 515 e 455/30 e filtros barreira UBHS/E2. A observação concomitante da FITC+Rodamina com a utilização dos filtros de emissão HQ 598/40, HQ522/35 e filtros barreira T1/E2 supridos pelo fabricante. O brilho e o contraste foram mantidos constantes para todos os grupos nos valores de 1076 (brilho - rodamina) e 940 (brilho - FITC) e 5 (contraste - rodamina e FITC). A abertura confocal usada variou de 1.5 a 2.0 mm e o zoom máximo de 1.85 para objetiva de 63X. Imagens de um único plano focal, ou um grupo de imagens de vários planos focais, foram adquiridas com auxílio do software Laser Sharp OS/2 (Bio-Rad) e salvas em disco óptico ou em Zip™ drive. As imagens obtidas foram exportadas com o formato .TIF e editadas em Adobe Photoshop Versão 4.0.1. A documentação foi feita em impressora Codonics acoplada ao sistema confocal, em papel fotográfico Kodak ou em impressora Epson Stylus Color 640.

2.6. Microscopia de Varredura Laser Confocal

A microscopia de fluorescência é uma das técnicas mais úteis em microscopia óptica devido a combinação de vantagens ópticas e espectroscópicas associadas à ferramentas da bioquímica e imunocitoquímica. A grande variedade de marcadores fluorescentes disponíveis atualmente permite um rastreamento das funções e da organização celular (LAURENT *et al.*, 1992).

Na microscopia de fluorescência convencional, a luz emitida pelas estruturas acima e abaixo do plano de foco contribui para a formação da imagem final. A realização de cortes histológicos mais finos poderia contornar o problema, mas por outro lado dificultaria a interpretação de estruturas tridimensionais (WHITE *et al.*, 1987).

A microscopia de varredura laser confocal provocou uma verdadeira revolução na microscopia óptica de fluorescência, desde que o primeiro microscópio confocal ficou disponível comercialmente em 1987. Na microscopia confocal, o sinal vindo do espécime, acima e abaixo do plano de foco, não contribui para a formação da imagem final. O sistema confocal permite, entre outros recursos, realizar tomografia e reconstruções tridimensionais de uma grande variedade de espécimes biológicos em diferentes preparações (LENZI *et al.*, 1996).

O microscópio confocal permite as reconstruções tridimensionais através da captação de uma série de imagens bidimensionais de planos de foco sequenciais de todo o espécime (WHITE *et al.*, 1987). Ele também permite realizar cortes ópticos seriados (figura 5) de espessura variada (para as junções neuromusculares são feitos cortes de 1,5 a 2 μm , em média) resultando em melhor resolução das imagens quando comparadas com as obtidas na microscopia óptica de fluorescência convencional. O esquema da figura 3, mostra os planos focais 1, 2 e 3, em que cortes ópticos podem ser realizados com o microscópio confocal na junção neuromuscular, de forma a abranger p

completo os compartimentos pré e pós-sinápticos. Normalmente esses cortes são realizados a partir da porção mais profunda (1), em direção à mais superficial (3).

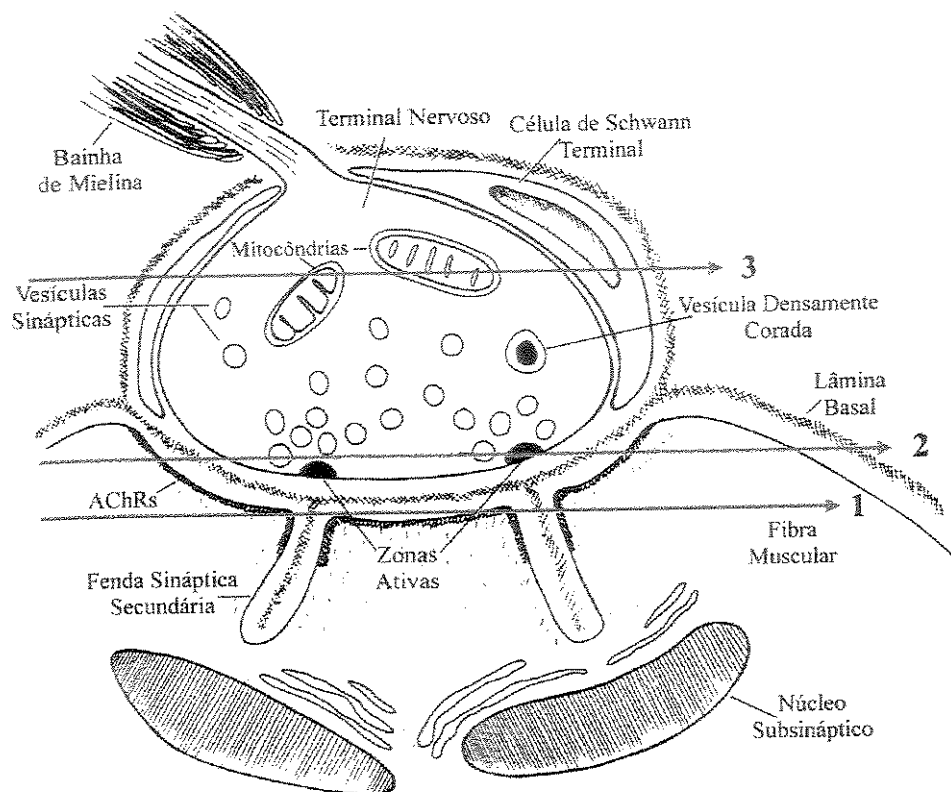


Figura 3. Esquema de junção neuromuscular mostrando os planos focais em que cortes ópticos podem ser realizados. Este esquema ilustra apenas 3 cortes para simplificar o desenho. No corte número 1, esperamos um predomínio da marcação dos AChRs, no corte 2 é esperado observar AChRs e parte das estruturas do compartimento pré-sináptico e no corte 3 somente as estruturas que fazem parte do compartimento pré-sináptico. Adaptado de Hall & Sanes, *Cell*, 72/*Neuron*, 10 (supl.), p.99-121, 1993.

2.6.1. Princípios Básicos da Confocalidade da Imagem

O sistema óptico confocal foi descrito por MARVIN MINSKY (1957), durante seu pós-doutorado na Universidade de Havard (USA). No microscópio confocal de Minsky (Fig. 4), o condensador do microscópio óptico convencional foi substituído por uma lente idêntica a uma lente objetiva (C).

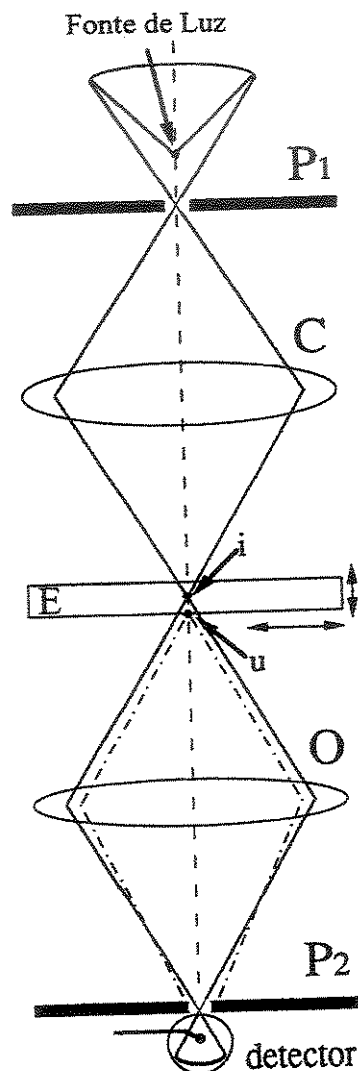


Figura 4. Princípio de funcionamento do microscópio confocal segundo Minsky (U.S. Patent # 3013467, Microscopy Aparatus, 1957). P1: primeiro pinhole, P2: segundo pinhole, C: lente condensadora, E: espécime, i: ponto focado no espécime, u: ponto fora do plano de foco, O: objetiva.

O feixe de iluminação era limitado por um pequeno orifício, primeiro pinhole (P1), posicionado no eixo do microscópio, em frente à fonte de luz. Antes de atingir o espécime a luz passava pela lente condensadora (C). O espécime (E) era escaneado através de movimentos da plataforma representados pelas setas de dupla cabeça. Nos microscópios modernos é o feixe de luz que se movimenta para escanear o espécime. A seguir, a lente objetiva (O), formava uma imagem do plano de foco "i". Entretanto, para a imagem se formar, o sinal proveniente de "i" deveria passar por um segundo orifício, segundo pinhole "exit" (P2), surgindo daí o princípio da confocalidade de imagens. Somente a luz emitida por "i" (linha sólida) é focada pelos pinholes e atinge o detector (célula fotoelétrica), contribuindo para a formação da imagem. Todos os raios que passavam por outros pontos, tal como "u" (linha descontinua), e que não passavam por P2 eram excluídos, não contribuindo para a formação da imagem, melhorando assim a resolução do microscópio (LENZI *et al.*, 1996).

O microscópio de varredura laser confocal é um produto do desenvolvimento tecnológico de várias áreas, tais como a física e a computação. Assim, foram desenvolvidas objetivas planoapocromáticas de grande abertura numérica, melhorando a resolução das imagens. A tecnologia disponível também possibilitou o uso da óptica com luz laser para varredura de imagens, podendo gerar imagens refletidas e transmitidas, além do processamento computacional de dados de alto desempenho, com observação de imagens em vídeo e registro em unidades magnéticas. A computação gráfica de alta resolução também vem permitindo alta qualidade de análise e tratamento de imagens planas e tridimensionais (LENZI *et al.*, 1996).

3. RESULTADOS

3.1. Animais Normais

Utilizando os recursos do microscópio confocal em realizar cortes ópticos, as junções neuromusculares foram seccionadas e os cortes obtidos de cada plano focal foram observados separadamente. Desta forma, pudemos distinguir o compartimento pré do pós-sináptico (Fig. 5). Os cortes foram feitos a partir da porção mais profunda (compartimento pós-sináptico) em direção à superfície da junção (compartimento pré-sináptico), tal como ilustra o esquema da figura 3. Através deste procedimento observamos predomínio dos AChRs nos cortes das porções mais profundas da junção, sendo que a nNOS foi detectada nos cortes da porção superficial, ou seja, no compartimento pré-sináptico.

Na maioria das vezes ($n=60/80$) a imunomarcação estava presente em um tronco principal contendo núcleos celulares, que terminava na junção, emitindo prolongamentos sobre os braços dos AChRs (Fig. 6A). Observamos também que a nNOS estava recobrindo os braços dos receptores de acetilcolina (Fig. 6B). Esses troncos se originam de feixes nervosos intramusculares, os quais apresentam expressão da nNOS nas margens dos axônios (Fig. 6C) e contém núcleos envoltos pela nNOS (Fig. 6D).

Na maior parte das junções observadas ($75/80$) a nNOS foi vista emoldurando os braços dos AChRs (Figs 7A e 7B). A imunoreatividade da nNOS também foi detectada no sarcolema extrajuncional (Figs. 6A e 6B).

FIGURA 5:

Distribuição pré-sináptica da nNOS (verde) em junção neuromuscular de camundongo normal.

Cortes ópticos seriados de diferentes planos focais que vão do compartimento pós ao pré-sináptico (A a F).

Nos cortes A e B, (B é aproximadamente o corte 1 da fig. 3) há um predomínio dos AChRs (cabeça de seta) que são vistos em vermelho.

Nos cortes C e D (D é aproximadamente o corte 2 da fig. 3), os AChRs (cabeça de seta) são melhor observados e a nNOS (seta) começa a recobri-los.

Nas porções mais superficiais da junção (E e F), (E é aproximadamente o corte 3 da fig. 3), os AChRs não são evidentes como em C e D, e a nNOS é mais nitidamente observada no compartimento pré-sináptico (setas). Barra: Em μm

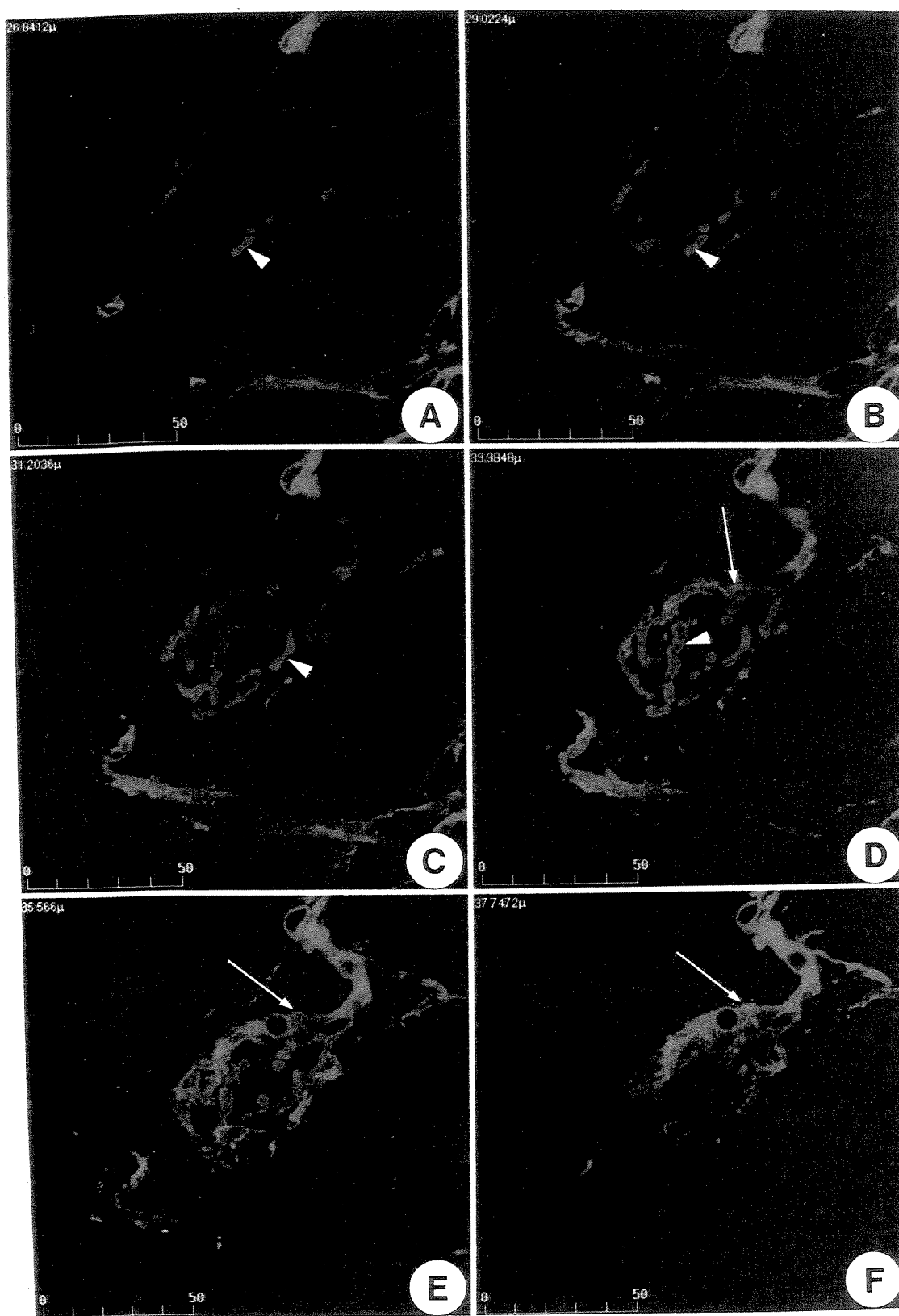


Figura 5

FIGURA 6:

Distribuição da nNOS (verde) e AChRs (vermelho) na região juncional de animais controles.

Em **A**, os cortes da fig. 5 agrupados em um único plano confocal. A nNOS é vista em um tronco (seta) que se aproxima da junção, emitindo prolongamentos que cobrem os AChRs. Núcleo celular da célula de Schwann: asterisco. Fibra muscular: m. Barra: 14,2 μ m

Em **B**, a nNOS recobrindo os braços dos AChRs (setas) e no sarcolema extrajuncional (cabeça de seta). Barra: 16,6 μ m

Em **C** e **D**, observa-se a marcação da nNOS (verde) nas margens dos axônios do feixe nervoso intramuscular (setas). Em **D**, foram utilizados os lasers Ar-Kr para excitar a fluoresceína ligada à nNOS e o UV para excitar o DAPI que evidenciou os núcleos celulares (asteriscos) dos feixes intramusculares vistos em **C**, mostrando que os núcleos das células de Schwann estão envoltos pela nNOS. Barra: 16,6 μ m

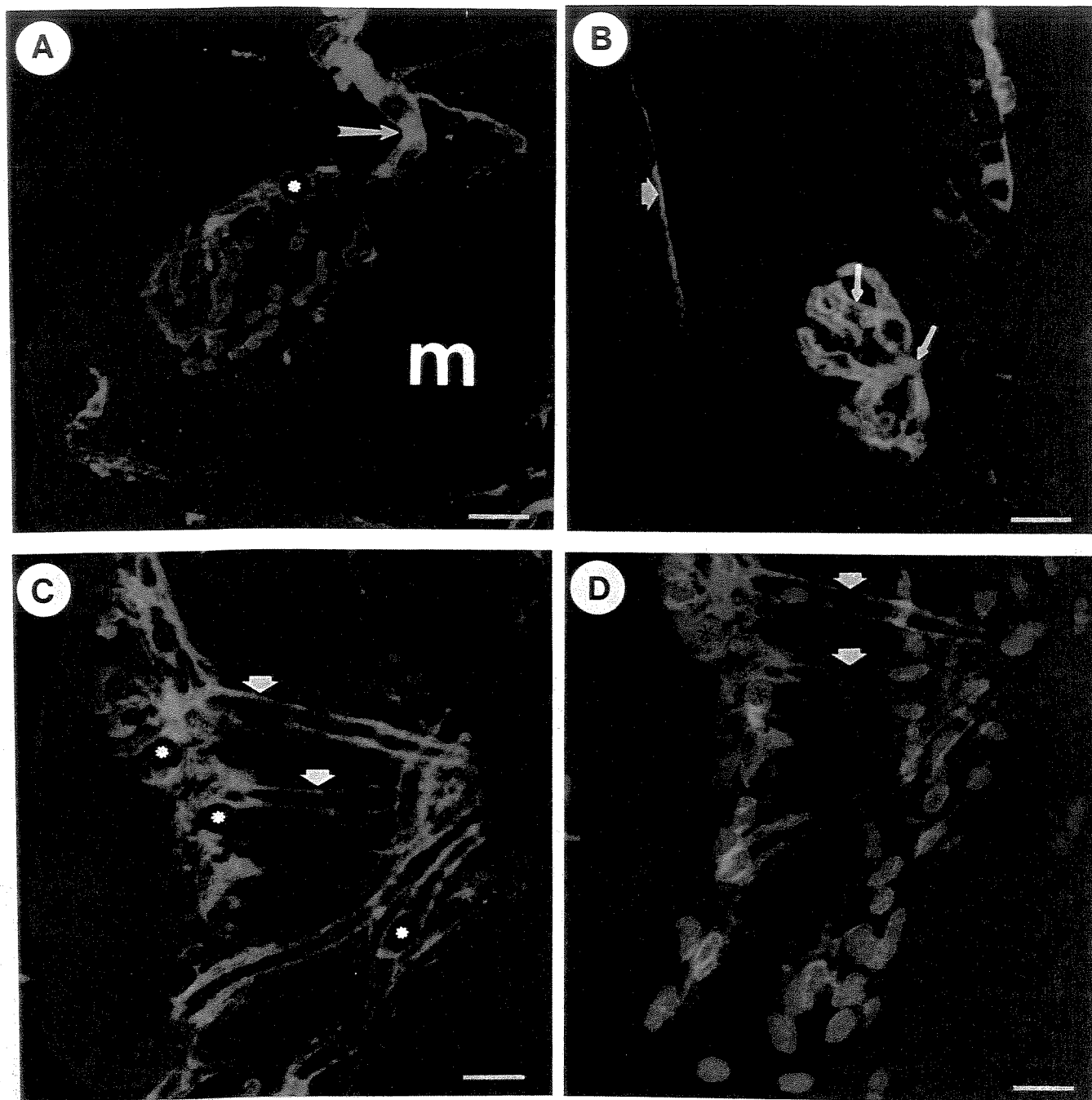


Figura 6

FIGURA 7:

Distribuição da nNOS (verde) e AChRs (vermelho) vista em um único corte confocal da região juncional de animal controle.

Em **A**, temos um corte feito na porção profunda da junção, em uma vista superior. Observar a nNOS emoldurando os braços dos AChRs na junção da esquerda (cabeça de seta). A junção da direita está disposta lateralmente na fibra muscular, na qual observamos regiões alaranjadas (seta) indicando a sobreposição da marcação da nNOS e dos AChRs. Barra: 16,6 μm

Em **B**, a seta indica a nNOS emoldurando os braços dos AChRs. Notar áreas alaranjadas indicando a sobreposição da marcação da nNOS e dos AChRs. Barra: Em μm

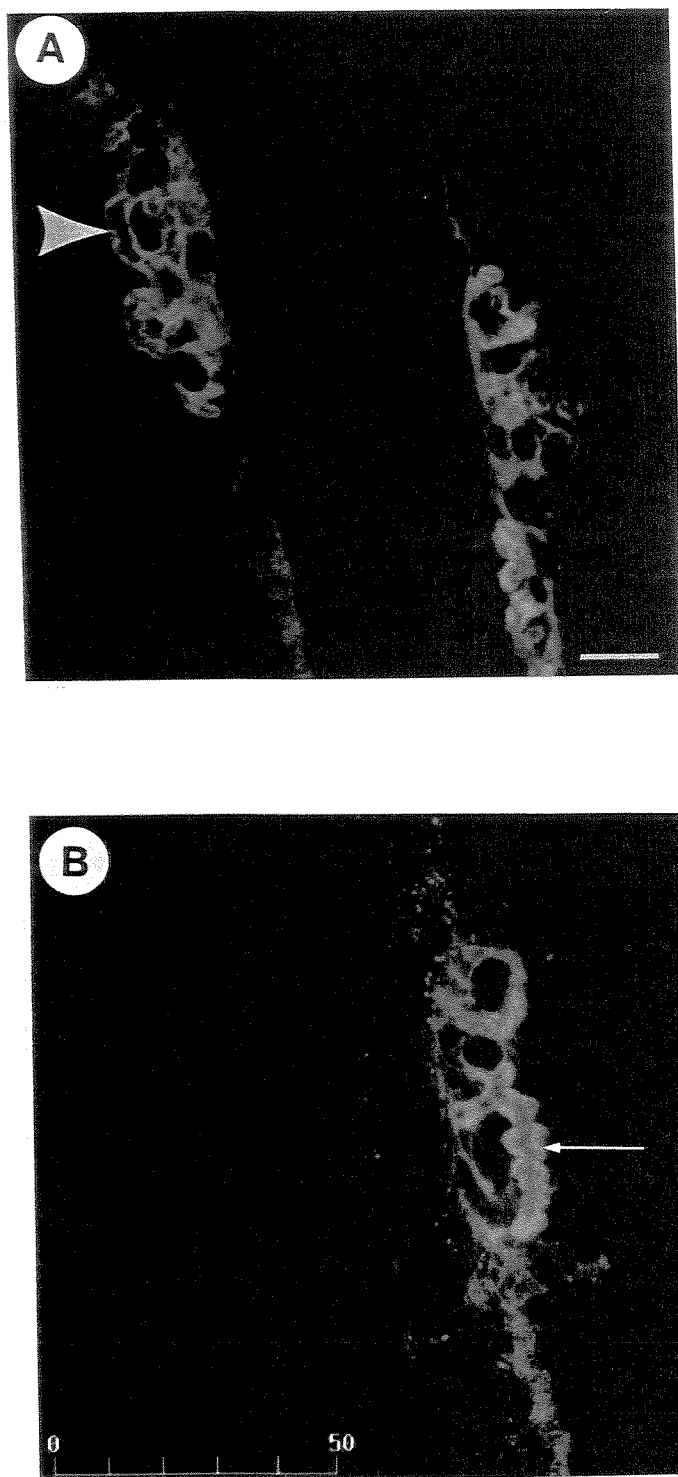


Figura 7

3.2. Animais Distróficos

Nos animais *mdx* foi detectada uma diminuição significativa da imunoreatividade da nNOS nos compartimentos pré e pós-sinápticos em praticamente todas as junções observadas (36/40) (Fig. 8A). Como podemos encontrar fibras musculares em degeneração, pois os músculos dos *mdx* sofrem ciclos de degeneração/regeneração, a diminuição da nNOS na junção poderia ser atribuída a fibras musculares degeneradas ou em processo de degeneração. Por isso, os parâmetros de brilho, contraste e diâmetro da abertura confocal foram aumentados para que pudéssemos observar a presença de estriações, caso as fibras não estivessem em degeneração (Fig. 8B). Uma vez que as estriações musculares foram observadas, constatamos que as junções observadas não pertenciam a fibras musculares em degeneração. Com aumento dos parâmetros de iluminação e abertura da íris, pudemos observar que a nNOS está diminuída e não totalmente ausente nos animais distróficos e que apresenta-se distribuída da mesma forma que nos controles normais.

3.3. Animais Desnervados

Passados 14 dias do procedimento de desnervação observamos que as fibras musculares destes animais apresentavam diâmetro menor (Fig. 9A) que o das fibras do lado contralateral (Fig. 9B), ou seja, estavam atrofiadas. Nos músculos desnervados, a nNOS foi vista cobrindo a região da junção, tal como observado nos normais inervados (Fig. 10A). Na região pré-sináptica foi observada maior complexidade dos prolongamentos citoplasmáticos das células de Schwann terminais (Figs 10B e 10C) e aparente aumento no número de núcleos dessas células (Fig. 10A).

A nNOS também foi encontrada no sarcolema extrajuncional (Fig. 10A). Não foram detectadas mudanças qualitativas na intensidade da fluorescência nos músculos dos animais do grupo desnervado, quando comparados com músculos normais inervados.

FIGURA 8:

Distribuição da nNOS (verde) e AChRs (vermelho) na região de junções de animal *mdx*.

Na figura **A**, observa-se a região juncional com os mesmos parâmetros de brilho, contraste e abertura da íris usados durante a observação dos animais controles. Percebe-se uma diminuição na expressão da nNOS na região pré-sináptica e no sarcolema, quando comparada com os controles normais.

Na figura **B**, a mesma região vista em **A**, mas os parâmetros de iluminação e íris foram alterados de forma a permitir a melhor observação das estriações musculares. As fibras musculares possuem estriações (seta) mostrando que não estão em processo de degeneração. Barra: 20 μ m.

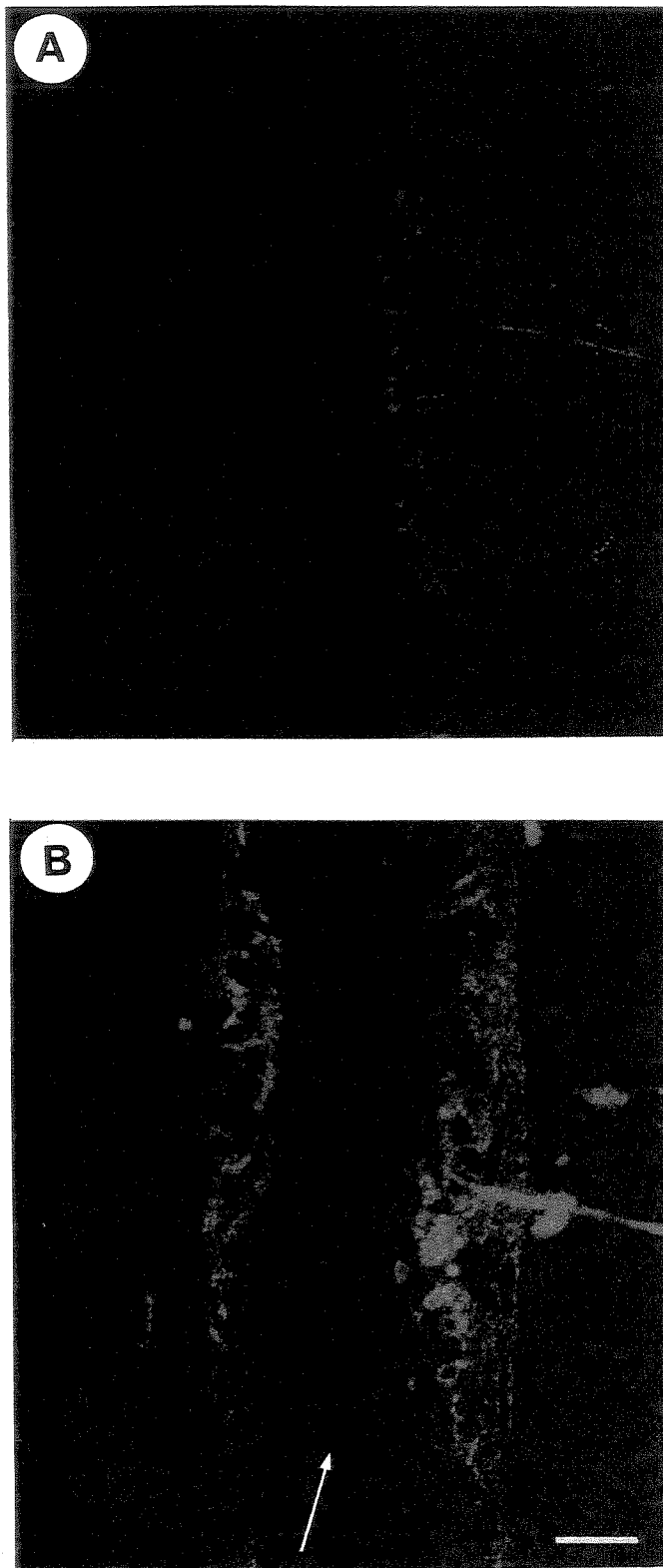


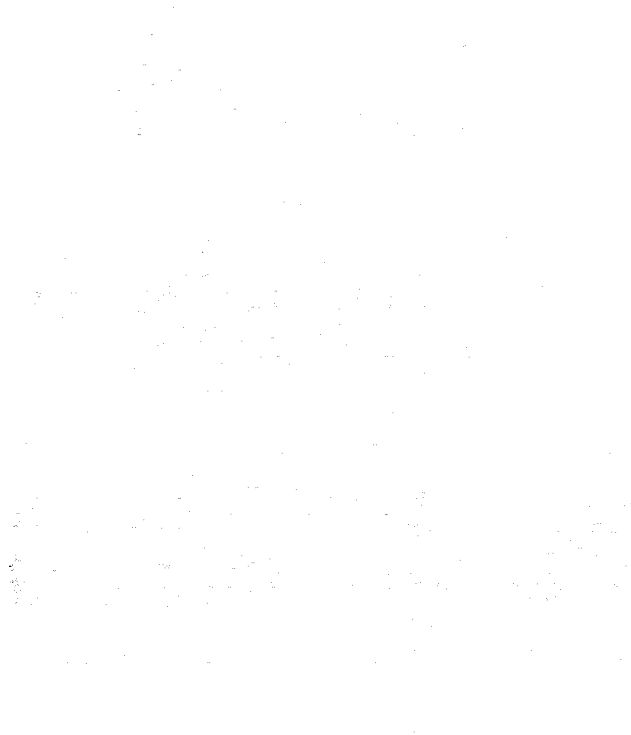
Figura 8

FIGURA 9:

Vista panorâmica de fibras musculares de animais C57BL/10.

Na figura A, observamos fibras musculares de músculo esternomastóide desnervado. Notar a diminuição do diâmetro das fibras (seta de dupla cabeça) quando comparado com o lado contralateral (Fig. B).

Na figura B, são vistas fibras musculares normais do lado não desnervado. Os limites da fibra muscular são delimitados pela nNOS do sarcolema (setas). Barra: Em μm



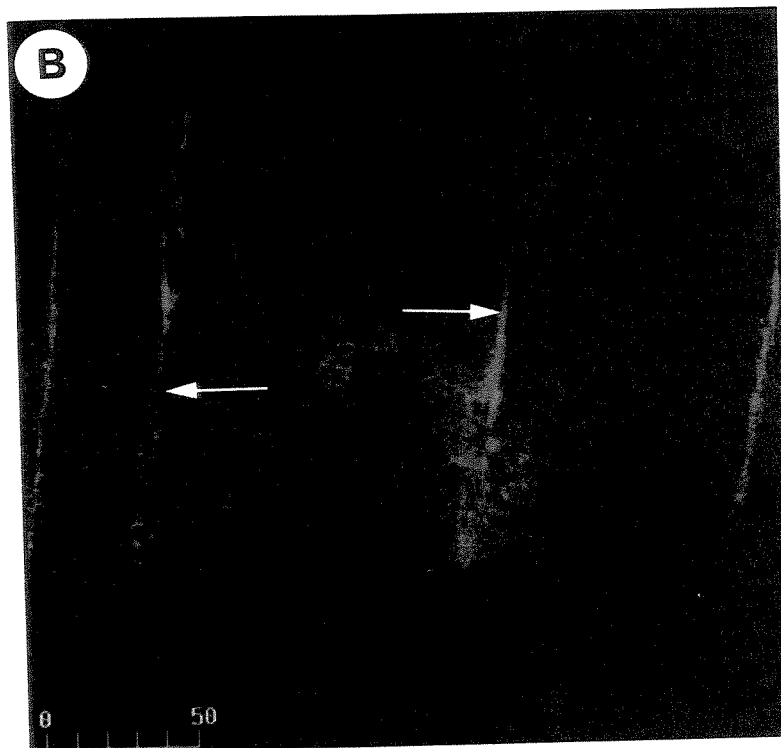
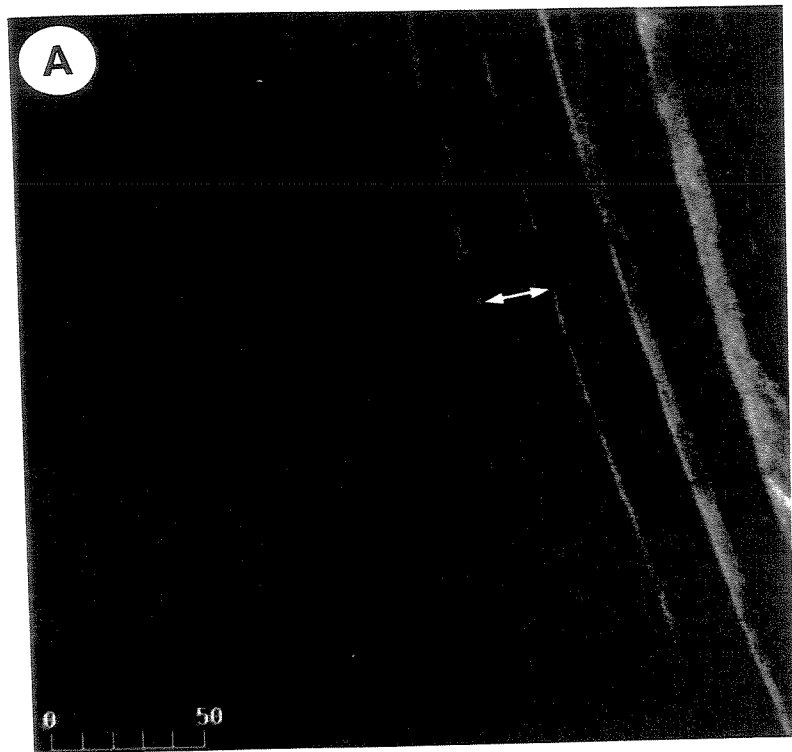


Figura 9

FIGURA 10:

Distribuição da nNOS (verde) e AChRs (vermelho) na região juncional de músculos de animais controles desnervados.

Em **A**, observar vários núcleos (seta) envolvidos pela nNOS (cabeça de seta pequena). Sarcolema: cabeça de seta grande. Barra: Em μm .

Em **B**, notar a região sobre a junção com aumento da complexidade dos prolongamentos das células de Schwann imunoreativos à nNOS (cabeça de seta). Barra: Em μm .

Em **C**, observar um aparente aumento da complexidade dos prolongamentos das células de Schwann e da quantidade de núcleos celulares dessas células (setas). Barra: Em μm .

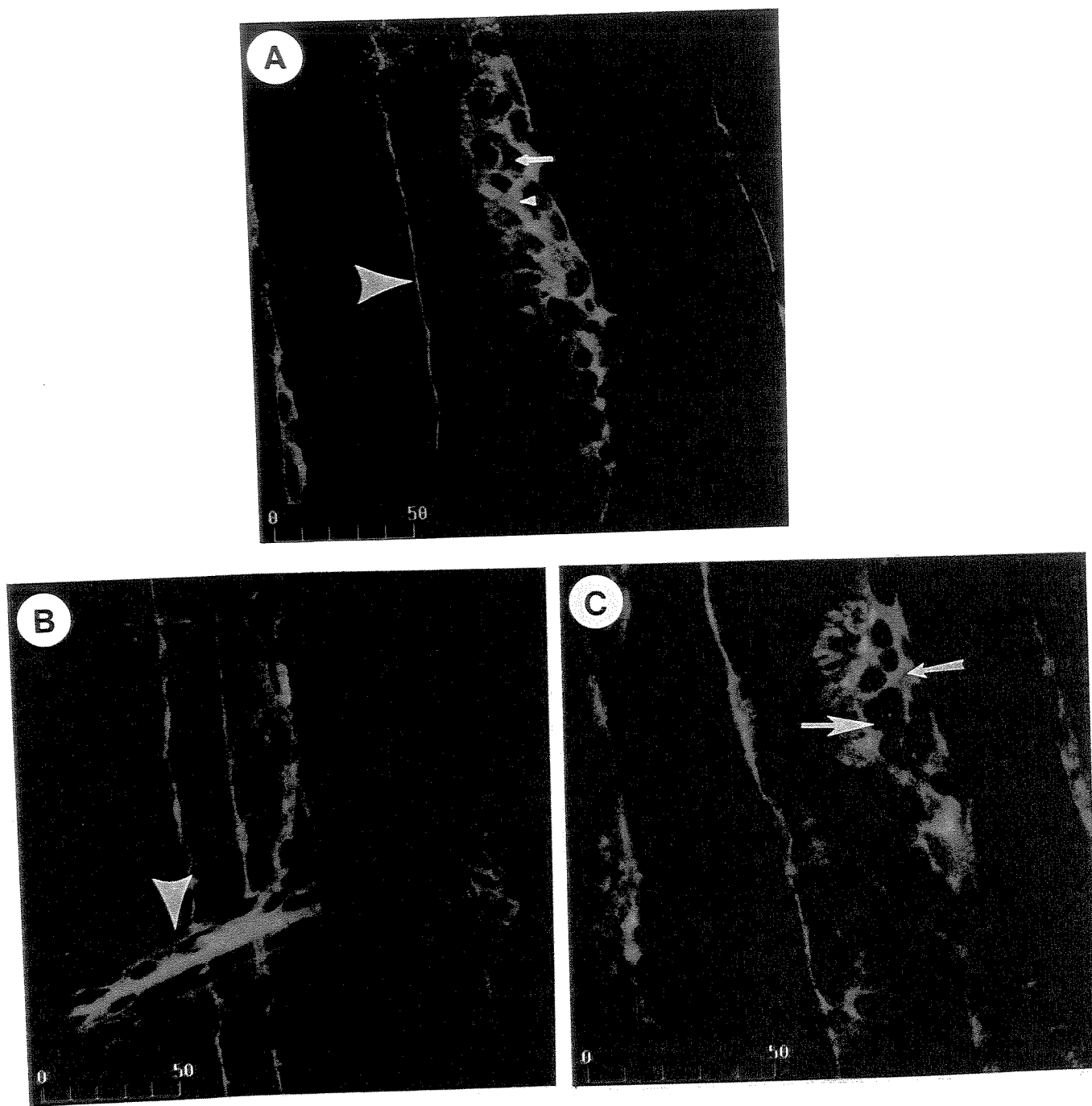


Figura 10

4. DISCUSSÃO

4.1. Distribuição da nNOS

No presente trabalho estudamos a distribuição da nNOS na junção neuromuscular de camundongos normais e da linhagem *mdx* através da microscopia de varredura laser confocal. Também foi objetivo deste estudo detectar qualitativamente possíveis alterações na expressão da enzima na região juncional dos músculos esternomastóide de animais *mdx* e controles normais desnervados, verificando a importância do terminal nervoso para expressão da enzima.

Estudos prévios demonstraram que a nNOS está associada ao sarcolema das fibras musculares esqueléticas de diferentes espécies, incluindo a humana (NAKANE *et al.*, 1993; KOBZIK *et al.*, 1994; GROZDANOVIC *et al.*, 1997; GROZDANOVIC & GROSSRAU, 1998; para revisão veja GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). Em nosso estudo observamos que a nNOS encontrava-se distribuída no sarcolema extrajuncional das fibras musculares dos animais normais e dos *mdx*, corroborando com os dados existentes na literatura. Quanto à função da enzima no sarcolema, as hipóteses correntes sugerem que a nNOS possa atuar como enzima que sintetiza óxido nítrico, o qual é um mensageiro neuronal, ou como proteína estrutural do complexo distrofina-glicoproteínas do sarcolema, que estabiliza e previne falhas no sarcolema durante os ciclos de contração muscular, impedindo o influxo de íons Ca^{++} para o interior da fibra muscular.

Diversos trabalhos têm mostrado que a nNOS é expressa na junção neuromuscular de músculos esqueléticos de mamíferos (BRENMAN *et al.*, 1996; GATH *et al.*, 1996; KUSNER & KAMINSKI, 1996; OLIVER *et al.*, 1996; GROZDANOVIC *et al.*, 1997; GROZDANOVIC & GOSSRAU, 1998; RIBERA *et al.*, 1998) interagindo com a $\alpha 1$ -sintrofina, tal como no sarcolema extrajuncional (BRENMAN *et al.*, 1996; RIBERA *et al.*, 1998; GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). A maioria dos trabalhos utiliza a microscopia convencional de

fluorescência, nos quais são feitos cortes transversais dos músculos, observando-se somente áreas imunoreativas que correspondem à região da junção, sem resolução suficiente para discriminar os compartimentos pré e pós-sinápticos.

A microscopia confocal de fluorescência utilizada no presente trabalho, permitiu o seccionamento óptico ao longo dos compartimentos pré e pós-sinápticos da junção neuromuscular, o que possibilitou observar a nNOS em ambos os compartimentos.

Estudos com imunoeletromicroscopia mostraram a nNOS no fundo das fendas sinápticas secundárias, co-localizada com a desmina e com a distrofina (YANG *et al.*, 1997). No entanto, em nosso trabalho, a enzima estava distribuída no sarcolema juncional. A nNOS apresentou uma marcação mais evidente emoldurando os braços dos AChRs, provavelmente na região em que o sarcolema se dobra para formar as margens da fenda sináptica primária. Este padrão também é observado na marcação dos AChRs com rodamina-BTx. Essa marcação mais evidente, emoldurando os AChRs, pode ser explicada pelo fato do sarcolema ser curvo nesta região e a fluorescência emitida pela nNOS se somar neste ponto, da mesma forma que ocorre com a fluorescência emitida pela rodamina-BTx. Estudos recentes demonstraram que a subunidade 1 do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR-1) é concentrada nas junções neuromusculares do diafragma de ratos, particularmente no sarcolema pós-juncional, co-localizando com a nNOS. Os receptores NMDA são uma possível fonte de íons Ca^{++} , os quais são necessários para ativação da nNOS (GROZDANOVIC & GROSSRAU, 1998). Estudos eletrofisiológicos sugeriram que os receptores NMDA interagem com o sistema nNOS/NO/GMPc para regular o potencial de repouso da membrana das fibras musculares (URAZAEV *et al.*, 1997). Entretanto, outros autores acreditam que o NO liberado no sarcolema pós-sináptico atue como um mensageiro retrógrado, enviando informações para os terminais

nervosos, pois já há algum tempo foi proposto que o NO possa atuar dessa forma na sinaptogênese neuromuscular, durante o desenvolvimento (WANG *et al.*, 1995).

A nNOS também encontrou-se distribuída na região pré-sináptica, o que nos sugeriu que a enzima poderia estar sendo expressa pelas células de Schwann terminais (SCs) ou pelos terminais motores. A observação da nNOS duas semanas após a desnervação, recobrando os braços dos AChRs, como nos animais normais inervados, sugere a presença da enzima nas SCs terminais, uma vez que, neste período de tempo, os terminais nervosos já degeneraram e as SCs estão sofrendo mudanças morfológicas, alongando e proliferando seus prolongamentos (REYNOLDS & WOOLF, 1992). Ainda foi observado um aumento aparente no número de núcleos e na complexidade dos processos marcados na região pré-sináptica dos músculos desnervados. O aumento aparente do número de núcleos visto no compartimento pré-sináptico, pode ser explicado pelos recentes achados de LOVE & THOMPSON (1998), que demonstraram a capacidade das SCs se dividir em resposta à desnervação, levando ao seu aumento na JNM.

Outro fato que reforça a hipótese da expressão da nNOS pelas SCs terminais é o padrão de marcação observado na região pré-sináptica. A marcação da nNOS nesta região apresentou-se muito semelhante à imunomarcação específica para as SCs, realizada com anticorpo anti-S-100 (REYNOLDS & WOOLF, 1992; SON & THOMPSON, 1995a; HIRATA *et al.*, 1997). As SCs marcadas com anti-S-100 aparecem como células nucleadas, com seus núcleos não fluorescentes, envoltos pelo marcador e apresentando processos citoplasmáticos que recobrem os braços dos AChRs. Nossos resultados mostram este mesmo padrão de marcação em torno de núcleos presentes nos feixes nervosos intramusculares de animais normais.

Estudos imunocitoquímicos com microscopia eletrônica mostraram a presença da nNOS nos terminais nervosos de animais normais e inervados. Somente um mês pós-desnervação, a nNOS foi

observada associada às SCs (RIBERA *et al.*, 1998). Entretanto, DESCARRIES *et al.* (1998), observaram a expressão da nNOS nas SCs terminais de músculos normais e inervados de sapos. Nossos resultados foram parcialmente semelhantes ao de RIBERA *et al.* (1998), pois também observamos a presença da nNOS nas SCs terminais de animais desnervados. No entanto, também observamos a nNOS nas SCs de animais normais que não tiveram seus músculos desnervados.

Essas diferenças podem ter sido devidas à diferentes protocolos, que podem não ter sido ideais para a forma de análise escolhida. Embora se consiga detalhes ultraestruturais, em microscopia eletrônica de transmissão (MET) não é possível ver toda a junção neuromuscular, tal como na microscopia confocal. Ao observar apenas uma pequena parte da junção em secções ultrafinas para MET, é quase impossível ver os prolongamentos citoplasmáticos das SCs em sua totalidade. Por outro lado, as SCs usualmente tomam os lugares dos terminais motores em junções desnervadas, tornando-se mais fáceis de serem vistas em secções de MET. Isto explicaria porque no trabalho de RIBERA *et al.* (1998), a nNOS só foi vista nas SCs de músculos desnervados. Contudo, não excluimos a possibilidade dos terminais motores também expressarem a nNOS, pois a enzima está presente no SNC, sendo perfeitamente possível que os terminais também apresentem a nNOS. Para realmente comprovarmos se a nNOS é somente expressa pelas células de Schwann seriam necessárias técnicas de retirada desta célula da junção. Entretanto essas técnicas não são possíveis até o momento. Se conseguíssemos retirar as SCs, provavelmente seria possível que os terminais motores, na falta da produção do NO pelas SCs, começassem a expressar a nNOS.

Outros estudos também realizaram a desnervação com o intuito de retirar o terminal motor e esclarecer em qual compartimento a nNOS estava presente (KUSNER & KAMINSKI, 1996; YANG *et al.*, 1997). Nestes trabalhos a fluorescência emitida pela nNOS continuou presente após a desnervação, como nos normais inervados, tendo sido concluído que a nNOS estava no sarcolema

pós-sináptico. Esses resultados são semelhantes aos nossos. No entanto, os autores não consideraram a possibilidade das SCs terminais, que fagocitam o terminal nervoso e tomam o seu lugar após desnervação, expressarem a nNOS, possivelmente por não ter melhor resolução da região juncional.

Tendo em vista que a distrofina de 427 kDa e a Dp116 foram localizadas nas células de Schwann pré-terminais de axônios de *Torpedo marmorata* (RIVIER *et al.*, 1997) e a Dp116 e Dp140 nas células de Schwann pré-terminais do gânglio cervical superior de camundongos (De STEFANO *et al.*, 1997), acreditamos que as células de Schwann terminais também possam expressar a distrofina, e que a nNOS poderia estar associada à elas na junção neuromuscular através da distrofina, tal como nas fibras musculares esqueléticas.

Em conclusão, utilizando a microscopia confocal, pudemos observar que a nNOS encontra-se distribuída no compartimento pré-sináptico, sendo possível que, neste compartimento, a nNOS está sendo expressa pelas células de Schwann terminais.

4.2. Alterações na Expressão da nNOS no Camundongo *mdx*

A diminuição da expressão da nNOS no sarcolema de músculos de pacientes com DMD e de camundongos *mdx* foi observada por vários autores (BRENMAN *et al.*, 1995; CHANG *et al.* 1996; GROZDANOVIC *et al.*, 1997). Por isso foi sugerido que a nNOS possa estar envolvida na patogênese desta distrofia, entretanto, não se sabe qual é o seu papel nesta patologia.

A ausência de distrofina no sarcolema traz como consequência a diminuição das proteínas a ela associadas (MATSUMURA *et al.*, 1992). A nNOS faz parte do complexo distrofina glicoproteínas e a diminuição da sua expressão é atribuída a este fato. Com a falta da distrofina a

nNOS não se liga ao sarcolema, sendo deslocada para o citoplasma (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). Várias hipóteses vêm sendo propostas para relacionar funcionalmente a diminuição da nNOS e sua localização no citoplasma. Atualmente, acredita-se que o NO no sarcoplasma reaja com superóxidos produzindo peroxinitritos, que são lesivos às células, pois contribuem para entrada de Ca^{++} e necrose da fibra muscular (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). A função de proteção contra lesões oxidativas também foi atribuída ao NO, porém essa hipótese não foi confirmada (WEHLING *et al.*, 1998).

Nossos dados corroboram com os existentes na literatura, pois observamos que há uma diminuição na expressão da enzima no sarcolema extrajuncional e pós-sináptico das fibras musculares dos camundongos da linhagem *mdx*. Sabe-se que a $\alpha 1$ -sintrofina é responsável pela interação da nNOS com a distrofina e com o sarcolema extrajuncional e juncional em animais normais. A $\alpha 1$ -sintrofina está ausente no sarcolema extrajuncional dos camundongos *mdx*, mas apresenta expressão normal no sarcolema pós-juncional (PETERS *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1994; CHAO *et al.*, 1996). Sugere-se que haja diferentes mecanismos de regulação da expressão da nNOS no sarcolema juncional e extrajuncional (PETERS *et al.*, 1997), mas esses mecanismos não são conhecidos até o momento.

Um achado interessante de nosso estudo foi a observação da diminuição na imunoreatividade na região pré-sináptica dos animais *mdx*. A diminuição da expressão da enzima no compartimento pré-sináptico, provavelmente nas SCs terminais, poderia ser explicada no camundongo *mdx* pelo defeito no gene que codifica a distrofina e suas Dps. A falta da distrofina acarreta a diminuição das proteínas a ela associada (MATSUMURA *et al.*, 1992). Assim, se há uma diminuição da distrofina na célula de Schwann do *mdx*, poderia-se supor uma diminuição da nNOS nesta célula. Entretanto, outros estudos precisam ser realizados para comprovar a presença da distrofina nas SCs e a sua

ligação com a nNOS. A microscopia confocal de fluorescência poderia ser útil para isto, uma vez que com esta técnica de microscopia podemos distinguir os compartimentos pré e pós-sinápticos, identificando a célula de Schwann e moléculas associadas com marcadores específicos. Uma outra alternativa seria a cultura de SCs e a marcação da distrofina e nNOS para observar se há co-localização das marcações.

Em conclusão, observamos uma diminuição da nNOS na região pré-sináptica da junção de animais distróficos. Se esta nNOS também está associada à distrofina, estes resultados sugerem que a ausência de distrofina parece não ser exclusiva da fibra muscular, mas também do compartimento pré-sináptico, provavelmente nas SCs terminais.

4.3. Expressão da nNOS após Desnervação

Nossos resultados não mostraram mudanças na imunoreatividade da nNOS 14 dias pós-desnervação, muito embora tenha se observado um aumento aparente do número de núcleos e na complexidade dos processos celulares que cobrem a região da JNM. Com relação a mudanças na imunoreatividade da nNOS em JNM desnervadas, a literatura relata diminuição da fluorescência uma semana após a desnervação, seguida por aumento depois de um mês (RIBERA *et al.*, 1998). Entretanto, YANG *et al.* (1997) não observaram qualquer mudança na expressão da enzima de 14 dias a um mês após a desnervação, sendo que somente após 30 dias começaram a notar aumento na expressão da nNOS.

O aumento da expressão da nNOS observado um mês após a desnervação, nos dois estudos citados, pode ser explicado pela proliferação dos prolongamentos citoplasmáticos das SCs na junção desnervada (SON & THOMPSON, 1995b), o que facilitaria a observação das SCs através da MET,

podendo ser uma falsa impressão do aumento da expressão da enzima. No entanto, em nosso trabalho, não estudamos músculos 30 dias após desnervação, o que nos impossibilita uma comparação.

Durante a neurogênese e regeneração do nervo olfatório de ratos foi observado um aumento da expressão da nNOS, o que indica um aumento da síntese do NO, sugerindo que a formação dessas sinapses é uma atividade dependente de NO (ROSKAMS *et al.*, 1994). Conseqüentemente, o NO liberado pelas SCs nos músculos desnervados poderia estar ligado ao restabelecimento da sinapse neuromuscular.

Em conclusão, não observamos alterações qualitativas na expressão da nNOS nas junções desnervadas, sugerindo que a nNOS está sendo expressa nas células de Schwann terminais, e que sua expressão parece não ser regulada pelo terminal nervoso.

4.4. Importância Funcional do Óxido Nítrico na Junção Neuromuscular

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, qual seria a importância do óxido nítrico para a biologia da junção neuromuscular, considerando-se sua produção pelas células de Schwann terminais?

Vários estudos sugerem diferentes funções para o óxido nítrico produzido pela nNOS. Dentre essas funções destaca-se o seu provável envolvimento na transmissão neuromuscular através de sequência de eventos análoga ao do SNC (GROZDANOVIC & GROSSRAU, 1998). O NO pode atuar também como um mensageiro retrógrado, participando da retração dos terminais nervosos, ou seja, da eliminação da polinervação das fibras musculares durante o desenvolvimento. Entretanto,

não são conhecidos os mecanismos que regulam a atividade da nNOS na JNM (GROZDANOVIC & GROSSRAU, 1998; GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

No que se refere às SCs terminais, sabe-se que estas células desempenham um papel de guia dos brotamentos do terminal nervoso durante o desenvolvimento normal, em músculos paralisados e em músculos parcialmente desnervados (REYNOLDS & WOOLF, 1992; SON & THOMPSON, 1995b; SON *et al.*, 1996; TRACHTENBERG & THOMPSON, 1997). Sugere-se que as SCs terminais, além de guiar, também possam induzir o início dos brotamentos (SON *et al.*, 1996).

O brotamento é uma resposta dos terminais motores à desnervação, à uma paralisia parcial, como a causada pela toxina botulínica por exemplo (DUCHEN, 1970; BOTH *et al.*, 1990), ou à necrose muscular seguida por regeneração (WERNIG & HERRERA, 1986; WERNIG *et al.*, 1991; VAN MIER & LITCHMAN, 1994), como é o caso dos músculos deficientes em distrofina, que sofrem degeneração e regeneração das fibras musculares. Assim sendo, seria esperado um aumento do número de brotamentos nervosos nos animais *mdx*. No entanto, os terminais nervosos dos *mdx* e humanos com DMD apresentam brotamentos em quantidade semelhante ao de fibras musculares normais (LYONS & SLATER, 1991; ENGEL *et al.*, 1994).

Estudos com microscopia eletrônica revelaram que os brotamentos terminais estão associados aos processos das SCs (DUCHEN, 1971). SON & THOMPSON (1995a), usando anticorpo anti-S100 confirmaram a existência da ligação entre o crescimento das SCs e os brotamentos terminais vistos em desnervações parciais, sugerindo que as SCs poderiam estar induzindo os terminais nervosos e axônios a crescer, possivelmente através da ação de substâncias gasosas liberadas por elas (SON *et al.*, 1996). Uma possibilidade seria que o NO, supostamente liberado pelas SCs, possa ser a substância gasosa que age sobre a capacidade de brotamento dos terminais nervosos.

Levando-se em consideração todos esses dados, podemos sugerir que a diminuição da nNOS nas células de Schwann terminais levaria à diminuição do NO produzido por estas células. Por sua vez, a diminuição do óxido nítrico liberado pelas SCs, da JNM de animais *mdx*, pode estar envolvida na menor resposta dos terminais motores em brotar na presença de lesão muscular, podendo ser um novo fator na patogênese da distrofia muscular.

4.5. Considerações Finais

Apesar da distrofia muscular de Duchenne ser descrita e estudada desde o século XIX, ainda não há recursos que consigam diminuir ou impedir a degeneração muscular. Inevitavelmente, os pacientes com essa distrofia vão à óbito. Enquanto não há degeneração do miocárdio e dos músculos responsáveis pela respiração, é possível tentar manter a capacidade física que resta, procurando-se melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

Assim sendo, acreditamos que os resultados obtidos e as considerações feitas no presente trabalho em relação ao compartimento pré-sináptico da JNM são relevantes, pois abrem uma nova perspectiva de estudos para o melhor entendimento da biologia dos músculos distróficos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Anderson-Cedergreen, E. Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J. Ultrastruct. Res.*, 1 (Suppl), p.1-191, 1959.
- Anderson, J.E.; Garrett, K.; Moor, A.; McIntosh, L.; Penner, K. Dystrophy and myogenesis in *mdx* diaphragm muscle. *Muscle Nerve*, 21, p.1153-1165, 1998.
- Arahata, K.; Ishiura, S.; Ishiguro, T.; Tsukahara, T.; Suhara, Y.; Eguchi, C.; Ishihara, T.; Nonaka, I.; Ozawa, E.; Sugita, H. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature (Lond.)*, 333, p.861-863, 1988.
- Berthier, C.; Blaineau, S. Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. A review. *Biology of the Cell*, 89, p.413-434, 1997.
- Bewick, G.S.; Nicholson, L.V.; Young, C.; O'Donnell, E.; Slater, C.R. Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *NeuroReport*, 3, p.857-860, 1992.
- Birks, R.; Huxley, H.E.; Katz, B. The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *J. Neurophysiol. London*, 150, p.134-144, 1960.
- Blake, D.J.; Tinsley, J.M.; Davies, K.E. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.*, 6, p.37-57, 1996.
- Bonilla, E.; Samit, C.E.; Miranda A.F.; Hays, A.P.; Salvati, G.; DiMauro, S.; Kunkel, L.M.; Hoffman, E.P.; Rowland, L.P. Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface, *Cell*, 54, p.447-452, 1988.
- Both, C.M.; Kemplay, S.K.; Brown, M.C. An antibody to neural cell adhesion molecule impairs motor nerve terminal sprouting in a mouse muscle locally paralyzed with botulinum toxin. *Neuroscience*, 35(1), p.85-91, 1990.

- 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.
- Bredt, D.S.; Snyder, S.H. Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, p.175-195, 1994.
- Brenman, J.E.; Chao, D.S.; Xia, H.; Aldape, K.; Bredt, D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 82, p.743-752, 1995.
- Brenman, J.E.; Chao, D.S.; Gee, S.H.; McGee, A.W.; Craven S.E.; Santillano, D.R.; Wu, Z.; Huang, F.; Xia, H.; Peters, M.F.; Froehner, S.C.; Bredt D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PZD domains. *Cell*, 84, p.757-767, 1996.
- Brockes, J.P. Assays for cholinergic properties in cultered rat Schwann cells. *Proc. Roy. Soc. Lond. (B)*, 222, p.121-134, 1984.
- Bulfield, G.; Siller, W.G.; Wight, P.A.L.; Moore, K.J. X chromosome - linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, p.1189-1192, 1984.
- Byers, T.; Lidov, H.; Kunkel, L.M. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J. Cell Biol.*, 115, p.411-421, 1991.
- Capanni, C.; Squarzoni, S.; Petrini, S.; Villanova, M.; Muscari, C.; Maraldi, N.M.; Guarnieri, C.; Caldarera, M. Increase of neuronal nitric oxide synthase in rat skletal muscle during ageing. *Biochem. Biophys. Res. Communication*, 245, p.216-219, 1998.
- Carbonetto, S; Lindenbaum, M. The basement membrane at the neuromuscular junction: a synaptic mediatrix. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5, p.596-605, 1995.

- Carpenter, J.; Karpati, G.; Zubrzycka-Gaarn, E.; Bulman, D.; Ray, P.; Worton, R. Dystrophin is localized in the plasma membrane of human skeletal muscle fibers by electron-microscopic cytochemical study. *Muscle Nerve*, 13, p.376-380, 1990.
- Carpenter, C., Karpati, G., Duchenne muscular dystrophy: plasma membrane loss initiates muscle cell necrosis unless it is repaired. *Brain*, 102, p.147-161, 1979.
- 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.*, 90, p.418-426, 1981.
- Clerk, A.; Strong, P.N., Sewry, C.A. Characterisation of dystrophin during development of human skeletal muscle. *Development*, 114, p.395-402, 1992.
- Chang, W.-J.; Iannaccone, S.T.; Lau, K.S.; Masters, B.S.S.; McCabe, T.J.; Mcmillan, K.; Padre, R.C.; Sperner, M.J.; Tidball, J.G.; Stull, J.T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, p.9142-9147, 1996.
- Chao, D.S.; Gorospe, J.R.; Brenman, J.E.; Rafael, J.A.; Peters, M.F.; Froehner, S.C.; Hoffman, E.P.; Chamberlain, J.S.; Bredt, D.S. Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *J. Exp. Med.*, 184, p.609-618, 1996.
- Chao, D.S.; Silvagno, F.; Xia, H.; Cornwell, T.L.; Lincoln, T.M.; Bredt, D.D. Nitric oxide synthase and cyclic GMP dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience*, 76, 665-672, 1997.
- Cho, K.O.; Hunt, C.A.; Kennedy, M.B. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, 9, p.929-942, 1992.
- 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.

- Covault, J.; Sanes, J.R. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 102, p.716-730, 1986.
- Cullen, M.; Walsh, J.; Nicholson, L.; Harris, J. Ultrastructural localization of dystrophin in human muscle by using gold immunolabelling. *Proc. Royal Soc. Lond. (B)*, 240, p.197-210, 1990.
- Cullen, M.; Walsh, J.; Nicholson, L.; Harris, J.; Zubrzycka-Gaarn, E.; Ray, P.; Worton, R. Immunogold labelling of dystrophin using an antibody to the last 17 amino-acid of the C-terminus. *Neuromusc. Disord.*, 1, p.113-119, 1991.
- Descarries, L.M.; Cai, S.F.; Robitaille, R. Localization and characterization of nitric oxide synthase at the frog neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, 27(11), p.829-840, 1998.
- De Stefano, M.E.; Zaccaria, M.L.; Cavaldesi, M.; Petrucci, T.C.; Medori, R.; Paggi, P. Dystrophin and its isoforms in a sympathetic ganglion of normal and dystrophic mdx mice: Immunolocalization by electron microscopy and biochemical characterization. *Neuroscience*, 80(2), p.613-624, 1997.
- Dick, J.; Vrbova, G. Progressive deterioration of muscles in mdx mice induced by overload. *Clin. Sci.*, 84, p.145-150, 1993.
- Dubowitz, V.; Crome, L. The central nervous system in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*, 92, p.805-808, 1969.
- Duchen, L.W. Hereditary motor endplate disease in the mouse, light and electron microscope studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 33, p.238-250, 1970.
- Duchen, L.W. An electron microscopy study of the changes induced by botulinum toxin in the motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *J. Neurol. Sci.*, 14, p.47-60, 1971.

- Duclerc, A.; Changeux, J.P. Acetylcholine receptor gene expression at the developing neuromuscular junction. *Physiol. Rev.*, 75, p.339-368, 1995.
- Emery, A.H.E. Duchenne muscular dystrophy, 2nd Ed., Oxford: Oxford University Press, 1993.
- 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.
- Förstermann, U.; Boissel, J.P.; Kleinert, H. Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.*, 12, p.773-790, 1998.
- Frandsen, U.; Lopez-Figueroa, M.; Hellsten, Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 227, p.88-93, 1996.
- Gasghen, E.R.; Hoffman, E.P.; Gorospe, J.R.; Uhl, E.W.; Senior, D.F.; Cardinet, G.H.; pearse, LK. Dystrophy deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats. *J. Neurological Sci.*, 110, p.149-153, 1992.
- Gath, I.; Closs, E.I.; Gödtel-Armbrust, V.; Schmitt, S.; Nakane, M.; Wessler, I.; Förstermann, V. Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: Implications for contractile function. *Faseb J.*, 10, p.1614-1620, 1996.
- Gramolini, A.O.; Jasmin, B.J. Molecular mechanisms and putative signalling events controlling utrophin expression in mammalian skeletal muscle fibres. *Neuromusc. Disorders*, 8, p.351-361, 1998.
- Grinnel, A. Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junction. *Physiol. Rev.*, 75, p.789-834, 1995.

- Gross, S.S.; Wolin, M.S. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.*, 57, p.737-769, 1995.
- Grozdanovic, Z.; Nakos, G.; Dahrman, G.; Mayer, B.; Grossrau, R. Species-independent expression of nitric oxide synthase in the sarcolemma region of visceral and somatic striated muscle fibers. *Cell Tissue Res.*, 281, p.493-499, 1995.
- Grozdanovic, Z.; Gosztanyi, G.; Gossrau, R. Nitric oxide synthase I (NOS-I) is deficient in the sarcolemma of striated muscle fibers in patients with Duchenne muscular dystrophy, suggesting an association with dystrophin. *Acta Histochem.*, 98, p.61-69, 1996.
- Grozdanovic, Z.; Christova, T.; Grossrau, R. Differences in the localization of the postsynaptic nitric oxide synthase I and acetylcholinesterase suggest a heterogeneity of neuromuscular junctions in rat and mouse skeletal muscles. *Acta Histochem.*, 99, p.47-53, 1997.
- Grozdanovic, Z.; Gossrau, R. Co-localization of nitric oxide synthase I (NOS I) and NMDA receptor subunit 1 (NMDAR-1) at the neuromuscular junction in rat and mouse skeletal muscle. *Cell Tissue Res.*, 291, p.57-63, 1998.
- Grozdanovic, Z.; Baumgarten, H.G. Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histology and Histopathol.*, 14(1), p.243-256, 1999.
- 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.*, 88, 564-580, 1981.
- Hillier, B.J.; Christopherson, K.S.; Prehoda, K.E.; Bredt, D.S.; Lim, W.A. Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science*, 284, p.812-815, 1999.

- Hirata, K.; Zhou, C.; Nakamura, K.; Kawabuchi, M. Postnatal development of Schwann cells at neuromuscular junctions with special reference to synapse elimination. *J. Neurocytol.*, 26, p.799-809, 1997.
- Hoch, W.; Campanelli, J.; Scheller, R. Agin-induced clustering of acetylcholine receptors: A cytoskeletal link. *J. Cell Biol.*, 126, p.1-4, 1994.
- Hoffman, E.P.; Brown, R.H.Jr.; Kunkel, L.M. Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51, p.919-928, 1987.
- Hölscher, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *TINS*, 20, p.298-303, 1997.
- Jahroni, B.S.; Robitaille, R.; Charlton, M.P. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells *in situ*. *Neuron*, 8, p.1069-1077, 1992.
- Jasmim, 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*, 87, p.3938-3941, 1990.
- Knudsen, K. Cell adhesion molecules in myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2, p.902-906, 1990.
- Kobzik, L.; Reid, M.B.; Bredt, D.S.; Stamler, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, 372, p.546-548, 1994.
- Kusner, L.; Kaminski, H.J. Nitric oxide synthase concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res.*, 730, p.238-242, 1996.
- Laurent, M.; Johannin, G.; Le Guyader, H.; Fleury, A. Confocal scanning optical microscopy and three-dimensional imaging. *Biol. Cell*, 76, p.113-124, 1992.

- Lee, K.H.; Baek, M.Y.; Moon, K.Y.; Song, W.K.; Chung, C.H.; Ha, D.B.; Kang, M.S. Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. *J. Biol. Chem.*, 269, p.14371-14374, 1994.
- Lefaucheur, J.P.; Pastoret, C.; Seville, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.*, 242, p.70-76, 1995.
- Lenzi, H.L.; Pelajo-Machado, M.; Vale, B.S.; Panasco, M.S. Microscopia de varredura laser confocal: Princípios e aplicações biomédicas. *NewsLab*, 16, p.62-71, 1996.
- Love, F.M.; Thompson, W.J. Schwann cells proliferate at rat neuromuscular junctions during development and regeneration, *J. Neurosci.*, 18(12), p.9376-9385, 1998.
- Lyons, P.R.; Slater, C.R. Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *J. Neurocytol.*, 20, p.969-981, 1991.
- Man, N.T.; Ellis, J.M.; Love, D.R.; Davies, K.E.; Gatter, K.C.; Dickson, G.; Morris, G.E. Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J. Cell Biol.*, 115, p.1695-1700, 1991.
- Marletta, M.A.; Yoon, P.S.; Iyengar, R.; Leaf, C.D.; Wishnok, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 21, p.8706-8711, 1989.
- Matteoli, M.; Balbi, S.; Sala, C.; Chini, B.; Cimino, M.; Vitadello, M.; Fumagalli, G. Developmentally regulated expression of calcitonin gene-related peptide at mammalian neuromuscular junction. *J. Mol. Neurosci.*, 2, p.175-184, 1990.
- Matsumura, K.; Ervasti, J.M.; Ohlendieck, K.; Kahl, S.D.; Campbell, K.P. Association of dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature*, 360, p.588-591, 1992.

- McComas, A.J. The muscle fiber. In: . *Skeletal Muscle – Form and Function*. EUA, Ed. Human Kinetics, p.3-24, 1996.
- Menke, A.; Jockush, H. Decreased osmotic stability of dystrophin-less muscle cells from the mdx mouse. *Nature*, 349, p.69-71, 1991.
- Morki, B.; Engel, A.G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology*, 25, p.1111-1120, 1975.
- Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 6, p.3051-3064, 1992.
- Nakane, M.; Schmidt, H.H.H.W.; Pollock, J.S.; Förstermann, U., Murad, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 316, p.175-180, 1993.
- Ohlendieck, K.; Ervasti, J.M., Matsumura, K.; Kahl, S.D.; Leveille, C.J.; Campbell, K.P. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*, 7, p.499-508, 1991.
- Oliver, L.; Oliver, G.; Courtois, Y.; Vigny, M. Accumulation of NO synthase (type I) at the neuromuscular junctions in adult mice. *NeuroReport*, 7, p.924-926, 1996.
- Palade, G.; Palay, S. Electron microscopic observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.*, 118, p.346-356, 1954.
- Park, C.-S.; Park, R.; Krishna G. Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. *Life Sci.*, 59, p.219-225, 1996.
- Pasternak, C; Wong, S; Elson, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell Biol.*, 128(3), p. 355-361, 1995.

- Patridge, T. Animal models of muscular dystrophy - What can they teach us? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 17, p.353-363, 1991.
- Peters, A.; Palay, S.L.; Webster, H. de F. *The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells*. Philadelphia, Saunders, 406p., 1976.
- Peters, M.; Kramarcy, N.; Sealock, R.; Froehner, S. α 2-syntrophin, localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *NeuroReport*, 5, p.1577-1580, 1994.
- Peters, M.F.; Adams, M.E.; Froehner, S.C. Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J. Cell Biology*, 138(1), p.81-93, 1997.
- Reist, N.E.; Smith, S.J. Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, p.7625-7629, 1992.
- Reynolds, M.L.; Woolf, C.J. Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J. Neurocytol.*, 21, p.50-66, 1992.
- Ribera, J.; Marsal, J.; Casanovas, A.; Hukkanen, M.; Tarabal, O.; Esquerda, J.E. Nitric oxide synthase in rat neuromuscular junctions and in nerve terminals of Torpedo electric organ: Its role as regulator of acetylcholine release. *J. Neurosc. Res.*, 51, p.90-102, 1998.
- Rieger, F.; Grumet, M.; Edelman, G.M. N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 101, p.285-293, 1985.
- Rivier, F.; Robert, A.; Latouche, J.; Hugnon, G.; Mornet, D. Presence of long and short dystrophin and/or utrophin products in *Torpedo marmorata* peripheral nerves. *FEBS Lett.*, 378, p.272-276, 1996.

- Rivier, F.; Robert, A.; Latouche, J.; Hugon, G.; Mornet, D. Expression of a new Mr 70 kDa dystrophin-related protein in the axon of peripheral nerves from *Torpedo marmorata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116B(1), p.19-26, 1997.
- Roskams, A.J.; Bredt, D.S.; Dawson, T.M.; Ronnett, G.V. Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. *Neuron*, 13, p.289-299, 1994.
- 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.
- Samit, C.; Bonilla, E. Immunochemical study of dystrophin at the neuromuscular junction. *Muscle Nerve*, 13, p.493-500, 1990.
- Sanes, J. The synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Dev. Biol.*, 6, p.163-173, 1995.
- Schmalbruch, H. The muscular dystrophies. In: Mastaglia, F.L and Walton, J.(Eds.), **Skeletal muscle pathology**, Churchill Livingstone, Edinburgh, p.235, 1982.
- Schuman, E.M.; Madison, D.V. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, p.153-83, 1994.
- Seixas, S.L.; Cândido, J.L.; Savino, W.; Quirico-Santos, T. Importância do camundongo mdx na fisiopatologia da distrofia muscular de Duchenne. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55(3-B), 610-617, 1997.
- Shotton, D.; Heuser, J.; Reese, B. Postsynaptic membrane folds at the frog neuromuscular junction visualized by scanning electron microscopy. *Neuroscience*, 4, p.427-439, 1979.
- Silvagno, F.; Xia, H.; Bredt, D.S. Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 271(19), p.11204-11208, 1996.

Snyder, S.H. No endothelial NO. *Nature*, 377, p.196-197, 1995.

Son, Y.J.; Thompson, W.J. Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron*, 14, p.125-132, 1995a.

Son, Y.J.; Thompson, W.J. Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron*, 14, p.133-141, 1995b

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

Squarzoni, S.; Sabatelli, P.; Maltarello, M.; Cataldi, A.; Di Primio, R.; Maraldi, N. Localization of dystrophin COOH-terminal domain by the fracture-label technique. *J. Cell Biol.*, 118, p.1401-1409, 1992.

Stedman, H.H.; Sweeney, H.L.; Shrager, J.B.; Maguirre, H.C.; Panettieri, R.A.; Petrof, B.; Narusawa, M.; Leferovich, J.M.; Sladky, J.T.; Kelly, A.M. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 352, p.536-539, 1991.

Tews, D.S.; Goebel, H.H.; Schneider, I.; Gunkel, A.; Stennert, E.; Neiss, W.F. Expression of different isoforms of nitric oxide in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurology*, 56(12), p.1283-1289, 1997.

Tinsley, J.M.; Blake, D.J.; Richard, A.Z.; Davies, K.E. Increase complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, p.8307-8313, 1994.

Tomlinson, B.E.; Walton, J.N.; Irving, D. Spinal cord limb motor neurons in muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 22, p.305-327, 1974.

- Torres, L.F.B.; Duchen, L.W. The mutant mdx: Inherited myopathy in the mouse. *Brain*, 110, p.269-299, 1987.
- Trachemberg, J.T.; Thompson, W.J. Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J. Neuroscience*, 17(16), p.6243-6255, 1997.
- Turner, P.R.; Fong, P.; Denetclaw, W.F.; Steinhardt, R.A. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J. Cell. Biol.*, 115, p.1701-1712, 1991.
- Unwin, N. Neurotransmitter action: Opening of ligand-gated channels. *Cell* 72(Suppl.), p.31-41, 1993.
- Urazaev, A.K.H.; Naumenko, N.V.; Poletayev, G.I.; Nikolsky, E.E.; Vyskocil, F. The effect of glutamate and inhibitors of NMDA receptors on postdenervation decrease of membrane potential in rat diaphragm. *Chem. Mol. Pharmacol.*, 316, p.219-222, 1997.
- Valentine, B.A.; Cooper, B.J.; Cummings, J.E.; De Lahyta, A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscopic and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 71, p.301-305, 1986.
- Van Mier, P.; Lichtman, J.W. Regenerating muscle fibers induce directional sprouting from nearby nerve terminals: Studies in living mice. *J. Neurosci.*, 14, p.5672-5686, 1994.
- Yang, B.; Ibraghimov-Breskrovnaya, O.; Moomaw, C.R.; Slaughter, C.A.; Campbell, K.P. Heterogeneity of the 59-kDa dystrophin-associated protein revealed by cDNA cloning expression. *J. Biol. Chem.*, 269, p.6040-6044, 1994.
- Yang, C. -C.; Alvarez, R. B.; Engel, W. K.; Haun, C. K.; Askanas, V. Immunolocalization of nitric oxide synthase at the postsynaptic domain of human and rat neuromuscular junction - Light and electron microscopy studies. *Exp. Neurology*, 148, p.34-44, 1997.

- Yeadon, J.; Lin, H.; Dyer, S.; Burden, S. Dystrophin is a component of the subsynaptic membrane. *J. Cell Biol.*, 115, p.1069-1076, 1991.
- Wang, T.; Xie, Z.; Lu, B. Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature*, 374, p.262-266, 1995.
- Wakayama, Y.; Inoue, M.; Murahashi, M.; Shibuya, S.; Jimi, T.; Takeda, A.; Oniki, H. Size and localization of dystrophin molecule - Immunoelectron microscopic and freeze etching studies of muscle plasma membranes of murine skeletal myofibers. *Acta Neuropathol.*, 86, p.567-577, 1993.
- Watkins, S.; Hoffman, E.; Slayter, H.; Kunkel, L. Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibers. *Nature (Lond.)*, 333, p.863-866, 1988.
- Wehling, M.; Stull, J.T.; McCabe, T.J.; Tidball, J.G. Sparing of mdx extraocular muscles from dystrophic pathology is not attributable to normalized concentration or distribution of neuronal nitric oxide synthase. *Neuromusc. Disorders*, 8, p.22-29, 1998.
- 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.
- Weller, B.; Karpati, G.; Carpenter, S. Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening. *J. Neurol. Sci.*, 100, p.9-13, 1990.
- Wernig, A.; Herrera, A.A. Sprouting and remodeling at the nerve muscle junction. *Progress in Neurobiol.*, 27, p.251-291, 1986.
- Wernig, A.; Salvini, T.F.; Irintchev, A. Axonal sprouting and changes in fibre types after running-induced muscle damage. *J. Neurocytol.*, 20, p.903-913, 1991.

- Wessels, A; Ginjaar, I; Moorman, A; Vam-Ommen, G. Different localization of dystrophin in developing and adult human skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 14, p.1-7, 1991.
- White, J.G.; Amos, W.B; Fordham, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.*, 105, p.41-48, 1987.
- Willians, G.; Brown, T.; Becker, L.; Prager, M.; Giroir, B.P. Cytokine induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes. *Am. J. Physiol.*, 267, p.R1020-R1025, 1994.
- Zubrzycka-Graarn, E.E.; Bulman, D.E.; Karpati, G.; Burghes, A.H.M.; Belfall, B.; Klamut, H.J.; Talbot, J.; Hodges, R.S.; Ray, P.N.; Worton, R.G. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature (Lond.)*, 333, p.466-469, 1988.