

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



ELAINE MINATEL

**DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES DE
ACETILCOLINA E DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE
NEURONAL NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE
FIBRAS MUSCULARES REGENERADAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Elaine Minatel
e aprovada pela Comissão Julgadora.

20/9/00
[Signature]

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Marques

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



200019107

UNIDADE	Be
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M661d
V.	Ex.
TOMBO BC/	43230
PROC.	16-278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16-12/00
N.º CPD	

CM-00153942-4

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

M661d **Minatel, Elaine**
 Distribuição dos receptores de acetilcolina e da óxido nítrico sintase neuronal na junção neuromuscular de fibras musculares regeneradas/Elaine Minatel. --- Campinas, SP. [s.n.], 2000.
 79f: ilus.

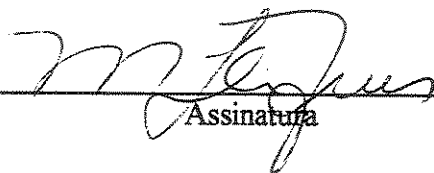
Orientadora: Maria Júlia Marques
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Receptores de acetilcolina. 2. Óxido nítrico neuronal. 3.
 Junção neuromuscular. I. Marques, Maria Júlia. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 20/09/00

BANCA EXAMINADORA

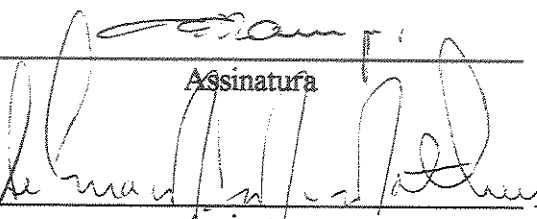
Profa. Dra. Maria Júlia Marques (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos


Assinatura

Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus


Assinatura

Profa. Dra. Iara Maria Silva De Luca

Assinatura

DEDICATÓRIA

À DEUS...

*“Ao que sustenta com vida a nossa alma, e não consente que
sejam abalados os nossos pés.”*

(Salmo 66:9)

AOS MEUS PAIS, RUBENS E CLEUSA,

*“Pouco importa venha a velhice, que é a velhice?
Teus ombros suportam o mundo
e ele não pesa mais que a mão de uma criança...”*

(Carlos Drummond de Andrade)

AGRADECIMENTOS

Às minhas irmãs (**Cleide e Lude**), ao cunhado (**Cesar**), às sobrinhas (**Rafaela, Natália e Bruna**) e ao **Marcos**, pelo apoio e pelo significado de suas vidas na minha.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques**, pela oportunidade de aprender um pouco mais. Pela valiosa orientação dispensada e pela confiança depositada.

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

Ao **Prof. Dr. José Angelo Camili** pelo incentivo e considerações pertinentes no exame de qualificação.

À **Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto-Rincon**, pelas considerações pertinentes no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos**, à **Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus** e à **Profa. Dra. Iara Maria Silva De Luca**, pelas sugestões dadas durante a pré-banca.

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

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

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

Às amigas **Elaine Cristina Leite Pereira, Regiane Luz Carvalho e Ana Cecília Nastrini Delgado**, pelo apoio e compreensão em todas as horas.

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

À **FAPESP** (Proc.# 98/10324-6) e à **CAPES** pela concessão de bolsas e financiamento do projeto, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*“Quanto mais o Homem se especializa,
tanto mais se abrem fronteiras e a fronteira
cresce na medida em que o raio aumentado
projeta um círculo maior.”*

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1– Introdução	1
1.1– Objetivo	4
1.2– Anestésicos Locais: Degeneração/Regeneração Muscular	5
1.3– Junção Neuromuscular	7
1.3.1 – Compartimento Pré-Sináptico	8
1.3.2 – Compartimento Pós-Sináptico	9
1.3.3 – Compartimento Extra-Celular	11
1.4 – Óxido Nítrico Sintase Neuronal	11
1.4.1 – Óxido Nítrico Sintase	13
1.4.2 – Óxido Nítrico	14
1.5 – Distrofia Muscular de Duchenne	15
1.5.1 – Distrofina	17
1.5.2 – Modelos Experimentais	20
1.6 – Princípios da Microscopia Confocal	21
 2 – AChRs and nNOS in regenerated muscle	24
Abstract	26
Introduction	27
Materials and Methods	29
Results	32
Discussion	35
Bibliography	39
Legends	44
Abbreviations	46
Figure 1	47

Figure 2	48
Figure 3	49
Figure 4	50
Figure 5	51
Figure 6	52
3 – Considerações Finais.....	53
4 – Referências Bibliográficas	56

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi investigar se fibras musculares regeneradas de camundongos normais apresentam alteração no padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs) e na expressão da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e comparar os resultados obtidos com fibras regeneradas de camundongos *mdx*. Para tanto, a degeneração/regeneração foi induzida através de injeções de cloridrato de lidocaína no músculo esternomastóideo (STN) esquerdo de camundongos normais. O lado contralateral foi utilizado como controle. Após 21 dias os músculos foram retirados e marcados com rodamina- α -bungarotoxina para observação dos AChRs, com o anticorpo primário monoclonal anti-nNOS para observação da expressão da nNOS e montados para fluorescência. Foi adicionado ao meio de montagem o marcador de DNA nuclear DAPI o que possibilitou a observação dos núcleos celulares. Através da microscopia confocal de fluorescência observamos que a distribuição dos AChRs nas fibras regeneradas estava alterada em relação ao padrão das fibras do músculo controle. As fibras musculares regeneradas normais exibiram o mesmo padrão de distribuição dos AChRs observado em fibras regeneradas distróficas, ou seja, os braços juncionais estavam fragmentados, originando ilhas de receptores. Nossos resultados sugerem que a alteração no padrão de distribuição dos AChRs, que é observada no camundongo *mdx*, pode ser consequência apenas da degeneração/regeneração da fibra muscular e não devido a deficiência de distrofina. Quanto a nNOS, não houve alteração de sua expressão em fibras musculares regeneradas quando comparada com fibras do músculo controle. Isto sugere que a diminuição de sua expressão observada nos camundongos *mdx* pode ser atribuída a ausência de distrofina.

ABSTRACT

The aim of the present investigation was to study whether normal regenerated muscle fibers show changes in the pattern of distribution of the acetylcholine receptors (AChRs) and in neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression. Degenerative-regenerative changes were experimentally induced in normal muscle fibers of mouse left sternomastoid (STN) muscle by injecting lidocaine hydrochloride. The contralateral side served as a control. 21 days after lidocaine injection, the STNs (right and left) were removed, labelled with rhodamin- α -bungarotoxin for AChRs observation, with anti-nNOS for nNOS observation and mounted in special mounting media for fluorescence with DAPI, a DNA stain for nuclei. By using fluorescence confocal microscopy regenerated muscle fibers showed disrupted AChRs distribution when compared to controls. Normal regenerated fibers exhibited the same pattern of AChR distribution as seen in dystrophic regenerated fibers. Our results suggest that changes in AChRs distribution seen in *mdx* were probably a consequence of muscle fiber degeneration-regeneration, rather than a symptom of dystrophin deficiency. Conversely, there were no changes in nNOS expression in normal regenerated fibers when compared to normal fibers, suggesting that the decrease in nNOS expression reported for *mdx* mice might be attributed to the absence of dystrophin.

1. INTRODUÇÃO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) se destaca, dentre as distrofias musculares, por ser a mais comum e a mais devastadora das distrofias. Ela ocorre em cerca de 1 a cada 3500 indivíduos do sexo masculino. É uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que se expressa no início da infância, incapacita o indivíduo a andar por volta da puberdade e culmina com sua morte por volta dos 20 anos de idade (ENGEL *et al.*, 1994). Esta distrofia se caracteriza pela falta de distrofina, proteína estrutural do sarcolema, que desempenha papel importante na manutenção da estabilidade da fibra muscular (HOFFMAN *et al.*, 1987; BONILLA *et al.*, 1988). É sugerido que a falta de distrofina facilita a entrada de grandes quantidades de cálcio nas fibras musculares, levando a degeneração destas fibras (BERTORINI *et al.*, 1982).

O conhecimento dos fenômenos biológicos envolvidos na DMD teve um grande avanço com o aparecimento da linhagem de camundongos *mdx*, X chromosome-linked muscular dystrophy (BULFIELD *et al.*, 1984). Esses animais apresentam, tal como os humanos doentes, ausência da distrofina. Entretanto, os animais jovens desta linhagem apresentam ciclos de regeneração muscular (TORRES & DUCHEN, 1987), fato que não ocorre de maneira significativa nos músculos de pacientes humanos.

A junção neuromuscular (JNM) de animais *mdx* apresenta alterações na sua estrutura quando comparada com junções de animais normais. No componente pós-sináptico as dobras juncionais são escassas e pouco desenvolvidas (TORRES & DUCHEN, 1987). O padrão de distribuição dos receptores de acetilcolina (AChRs) também é alterado. Esta alteração é representada pela fragmentação dos braços juncionais originando ilhas de receptores (LYONS & SLATER, 1991).

Os AChRs normalmente estão ancorados na JNM através de uma cadeia de proteínas do citoesqueleto e a distrofina é uma das proteínas que faz parte desta cadeia. A

alteração do padrão de distribuição dos AChRs nos animais *mdx* poderia ser explicada pela ausência de distrofina, entretanto, foi sugerido que tais modificações seriam típicas de fibras musculares regeneradas e não decorrentes da falta desta proteína (LYONS & SLATER, 1991).

Um outro componente da cadeia de proteínas do citoesqueleto extrajuncional e juncional da fibra muscular é a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Segundo BERTHIER & BLAINEAU (1997), a nNOS está acumulada na membrana pós-sináptica da JNM, ligada ao complexo sintrofina, complexo este que está associado à distrofina. Nos animais *mdx*, a expressão da nNOS está significativamente reduzida no sarcolema juncional e extra-juncional (BRENMAN *et al.*, 1995; CHANG *et al.*, 1996).

Como foi sugerido que as mudanças no padrão de distribuição dos AChRs, observadas nas fibras musculares dos camundongos *mdx*, eram uma consequência do processo de regeneração das fibras musculares, seria possível que outras moléculas da junção, tal como a nNOS, também sofresse com a degeneração-regeneração muscular.

1.1 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar se fibras musculares regeneradas de camundongos normais apresentam alteração no padrão de distribuição dos AChRs e na expressão da nNOS e comparar os resultados obtidos com fibras regeneradas de camundongos *mdx*. Para tanto a degeneração/regeneração muscular foi induzida através de injeções de xilocaína e a distribuição dos receptores colinérgicos e da nNOS observada através de imunofluorescência e microscopia confocal.

1.2 DEGENERAÇÃO E REGENERAÇÃO MUSCULAR ATRAVÉS DE ANESTÉSICOS LOCAIS

Como nosso trabalho visou estudar fibras musculares regeneradas de animais normais, foi necessário promover experimentalmente a degeneração muscular. Para isso utilizamos o anestésico cloridrato de lidocaína.

Sabe-se que os anestésicos locais são potentes agentes miotóxicos e podem produzir, em função da dose, extensa e rápida necrose de fibras musculares esqueléticas (BENOIT & BELT, 1970). A mionecrose pode ser vista logo após a aplicação do anestésico, sendo que a extensão e intensidade da lesão dependem em grande parte da concentração e do volume do anestésico (JONES, 1987; NONAKA *et al.*, 1983).

A patogênese da mionecrose deve-se inicialmente à lesão sarcolemal, seguida de entrada súbita e abundante do íon cálcio extracelular para o sarcoplasma. Está bem estabelecido que os íons cálcio são de fundamental importância para a ativação do mecanismo de contração muscular e que seu controle ocorre através de bombeamento ativo nas membranas do retículo sarcoplasmático, nas mitocôndrias e também pela bomba de cálcio do sarcolema. Um músculo deixa sua condição de repouso quando um potencial de ação se propaga pela membrana da fibra, provocando uma liberação de grande quantidade de cálcio no sarcoplasma. Esses íons cálcio ligam-se a troponina a qual sofre transformações estruturais que se transmitem à tropomiosina. As alterações nas proteínas reguladoras tornam possível a interação do sistema actina-miosina levando a contração muscular. Por ocasião da lesão sarcolemal os íons cálcio em excesso produziram hipercontração das miofibrilas, lise de lisossomas com liberação de enzimas, ativação de proteases e conseqüente mionecrose.

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

A capacidade de regeneração muscular depende principalmente da sobrevivência das células satélites (CARLSON, 1986). A célula satélite foi descrita inicialmente no músculo esquelético de rã e, desde então, foi encontrada em vários vertebrados, inclusive em camundongos. É uma célula mononucleada, fusiforme, localizada entre a membrana basal e o sarcolema, do qual é separada por um espaço de 15-20nm (REGER & CRAIG, 1968). Sua localização e aspecto se confundem àqueles dos núcleos das fibras musculares, o que dificulta a avaliação de suas condições funcionais até mesmo em microscopia eletrônica (CARLSON, 1986). Outra característica das células satélites é que elas se mostram resistentes aos anestésicos locais. No músculo sóleo, por exemplo, elas não são afetadas por injeção de 0,5 ml de bupivacaína a 0,5% (NONAKA *et al.*, 1983).

Em geral os primeiros indícios morfológicos do processo de regeneração muscular começam a aparecer aproximadamente 36 horas após a injeção do anestésico. Nesse período a presença de mioblastos caracteriza o processo regenerativo e por volta do quarto dia pode se observar população de miotubos. A presença de numerosos núcleos centrais caracteriza as fibras musculares regeneradas (FOSTER & CARLSON, 1980).

A fusão dos mioblastos em miotubos e o crescimento destes é feito no interior dos tubos de membrana basal muscular (VRACKO & BENDITT, 1972). A membrana basal muscular desempenha função de suporte com o objetivo de sustentar as células satélites e a formação dos novos miotubos, mantendo condições favoráveis ao processo de regeneração,

impedindo que fibroblastos e fibras colágenas interfiram neste processo (CARLSON & FAULKNER, 1983).

1.3 JUNCTÃO NEUROMUSCULAR

A estrutura básica da junção neuromuscular foi inicialmente descrita por DOYERE, em 1840 (SALPETER, 1987). Entretanto, os estudos modernos da organização ultra-estrutural e molecular da junção iniciou-se em 1946, com os trabalhos realizados por COUTEAUX (para revisão ver PALADE & PALAY, 1954; ANDERSON-CEDERGREEN, 1959; COUTEAUX, 1973; SHOTTON *et al.*, 1979; CARTAUD *et al.*, 1981).

A aquisição de novas técnicas, como por exemplo a histoquímica, a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, possibilitou um conhecimento maior da morfologia e biologia da junção.

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

1.3.1 COMPARTIMENTO PRÉ-SINÁPTICO

Os músculos esqueléticos são innervados pelos motoneurônios. Seus axônios penetram no músculo através do hilo neurovascular. A seguir, dividem-se em numerosos feixes intramusculares que caminham entre as fibras musculares. Após abandonarem o feixe nervoso intramuscular, os axônios motores passam a ser denominados de axônios pré-terminais. O axônio pré-terminal dirige-se, normalmente, para uma única fibra muscular. O axônio pré-terminal perde seu revestimento mielínico próximo ao contacto com a fibra muscular. Esta porção do axônio é chamada de axônio terminal. O axônio terminal sofre delicadas arborizações com suas terminações levemente dilatadas, denominadas de botões terminais, os quais se alojam na goteira sináptica ou fenda sináptica primária, uma depressão da fibra muscular (para revisão ver BOWDEN & DUCHEN, 1976; PETERS *et al.*, 1976).

Uma característica essencial da estrutura do terminal é o acúmulo de vesículas sinápticas de diâmetro variando entre 50 e 60 nm (ENGEL & SANTA, 1971). Estas vesículas contêm acetilcolina, adenosina trifosfato e uma alta concentração de íons cálcio e magnésio (WHITTAKER, 1984; VOLNANDT & ZIMMERMAN, 1986). Muitas dessas vesículas estão agrupadas próximas de placas densas, chamadas zonas ativas, localizadas na superfície interna da membrana pré-sináptica. A zona ativa é uma região diferenciada da membrana pré-sináptica, relacionada a exocitose das vesículas sinápticas. As membranas das vesículas são reabsorvidas pela superfície pré-sináptica para formação de novas vesículas (HEUSER & REESE, 1981). No terminal também são encontradas vesículas elétron-densas que contêm neuropeptídeos e também corpos multivesiculares (MATTEOLI

et al., 1990). O terminal nervoso também possui numerosas mitocôndrias para suprir a energia necessária para síntese, estocagem e liberação de transmissores.

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

1.3.2 COMPARTIMENTO PÓS-SINÁPTICO

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

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

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

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

Os AChRs são pentâmeros dispostos em torno de canais iônicos que se abrem quando a ACh liga-se a eles. São responsáveis pela recepção e transdução de sinais químicos (para revisão ver UNWIN, 1993). Os AChRs e canais de sódio são ancorados por proteínas do citoesqueleto que podem ter funções regulatórias e de suporte, como a F-actina que está ligada a distrofina.

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

1.3.3 COMPARTIMENTO EXTRACELULAR

O estreito espaço existente entre o terminal nervoso e o sarcolema pós-sináptico é denominado de fenda sináptica primária. A membrana basal está contida nesta fenda, estendendo-se para dentro das dobras juncionais, nas fendas sinápticas secundárias (HALL & SANES, 1993). O compartimento extracelular da junção inclui as fendas primária e secundária.

A membrana basal sináptica é bioquimicamente especializada. Contendo proteínas distintas daquelas encontradas na região extra-sináptica (SANES, 1995; CARBONETTO & LINDENBAUM, 1995) tais como a acetilcolinesterase, enzima envolvida na neurotransmissão ao hidrolisar a acetilcolina liberada pelo terminal nervoso motor (WEINBERG & HALL, 1979); a S-laminina; a agrina, proteína necessária para a diferenciação pós-sináptica (SANES & LICHTMAN, 1999); o indutor de atividade do receptor de acetilcolina (ARIA) (GOODEARL *et al.*, 1995; JO *et al.*, 1995); a collagenase tipo III e IV; o heparan sulfato e o fator de crescimento de fibroblastos.

1.4 ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL

A nNOS foi primeiramente caracterizada e purificada em cerebelos de ratos e porcos (MAYER *et al.*, 1990; BREDT & SNYDER, 1990; SCHMIDT *et al.*, 1991) e posteriormente, também em células epiteliais, células da mácula densa e fibras musculares (CHAO *et al.*, 1997). A nNOS provavelmente tem papel importante não somente nas funções fisiológicas neuronais, tais como liberação dos neurotransmissores,

desenvolvimento neural, regeneração, plasticidade sináptica e regulação da expressão do gene, como também em uma variedade de doenças neurológicas (YUN *et al.*, 1997).

Nas fibras musculares a nNOS se encontra no sarcolema extra-juncional, interagindo com outras proteínas associadas à distrofina, especificamente ligada a $\alpha 1$ -sintrofina através de interações do tipo PDZ (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999). 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 (HILLIER *et al.*, 1999). O termo PDZ está relacionado ao nome de três proteínas onde esses domínios foram inicialmente identificados: proteína 95 da densidade pós-sináptica (PDZ-95), proteína do disco largo da junção septada de *Drosophila* (Dlg) e proteína 1 da zona ocludens (ZO-1) das junções tipo tight do tecido epitelial (CHO *et al.*, 1992). O complexo distrofina-glicoproteínas também é encontrado no compartimento pós-sináptico da JNM (BERTHIER & BLAINEAU, 1997).

Alguns trabalhos demonstraram que a expressão da nNOS está ausente ou reduzida no sarcolema de pacientes com DMD (BRENMAN *et al.*, 1995; GROZDANOVIC *et al.*, 1996), o que levou à hipótese de que a nNOS possa participar da patogênese da DMD (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999).

1.4.1 ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

A óxido nítrico sintase (NOS) existe em múltiplas isoformas. As três isoformas mais estudadas são: a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou NOS I), a óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS II) e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS III) (BREDT & SNYDER, 1994).

A nNOS e a eNOS são constitutivas, estimuladas somente por cálcio intracelular via calmodulina (DAWSON & SNYDER, 1994; FORSTERMANN *et al.*, 1994; NATHAN & XIE, 1994).

Na maioria dos mamíferos as três isoformas da NOS foram encontradas nos músculos estriados esqueléticos (FÖRSTERMANN *et al.*, 1998). Foi observado que a nNOS está presente no sarcolema das fibras musculares (GROZDANOVIC & BAUMGARTEN, 1999), mas ainda não está claro sobre a sua localização na junção neuromuscular (JNM). Quanto a eNOS, esta 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.*, 1995; TEWS *et al.*, 1997). Referente a iNOS, foi encontrada uma pequena quantidade desta isoforma 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 discute-se que sua síntese possa ter sido induzida por citocinas, inflamações e outros processos patológicos (WILLIAMS *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 1997).

Através da NOS ocorre o mecanismo de formação do óxido nítrico (NO), com consumo de cinco elétrons. A NOS cataliza a oxidação do grupo guanidina da L-arginina

resultando na formação de citrulina e NO, de maneira Ca^{2+} /calmodulina dependente (SCHUMAN & MADISON, 1994).

1.4.2 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um gás permeante da membrana que difunde-se rapidamente pelas células vizinhas. É considerado uma molécula mensageira que regula uma variedade de funções celulares (SNYDER, 1992; MONCADA *et al.*, 1991; IGNARRO, 1990). A maioria das ações do NO são mediadas através da estimulação da guanilil ciclase, enzima que cataliza a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (CHAO *et al.*, 1997).

Estudos demonstraram que no sistema cardiovascular o NO provoca o relaxamento dos vasos sanguíneos (MONCADA *et al.*, 1991), no sistema imune é responsável pelos efeitos bactericida dos macrófagos e leucócitos (HIBBS *et al.*, 1988; NATHAN & HIBBIS, 1991), provoca relaxamento do músculo liso (PALMER *et al.*, 1987) e também tem sido relacionado a diversos estados patológicos como o choque séptico, hipertensão, acidentes vasculares cerebrais e doenças neurodegenerativas (para revisão ver BREDT & SNYDER, 1994).

O NO também é produzido no músculo esquelético (NAKANE *et al.*, 1993; KOBZIK *et al.*, 1994). Estudos prévios demonstraram os efeitos bioquímicos e funcionais do NO no músculo esquelético, incluindo efeitos na força contrátil (KOBZIK *et al.*, 1994), modulação da função mitocondrial (SCHWEIZER & RICHTER, 1994; CLEETER *et al.*,

1994) e limitação do consumo de oxigênio (KING *et al.*, 1994). Todavia, o mecanismo básico da ação do NO não está perfeitamente compreendido.

Devido ao fato do NO ser um gás, a evidência de sua produção é obtida através da identificação da óxido nítrico sintase (NOS) (KUSNER & KAMINSKI, 1996).

1.5 Distrofia Muscular de Duchenne

A distrofia muscular de Duchenne foi primeiramente descrita por MERYON (1852) e DUCHENNE (1868) e é considerada a mais devastadora das distrofias musculares, afetando aproximadamente uma em cada 3500 crianças do sexo masculino.

A presença da doença é evidenciada por alto nível de creatina quinase e necrose da fibra muscular. Apesar de existir no período neonatal, raramente apresenta-se na infância (PRELLE *et al.*, 1992; ARIKAWA *et al.*, 1991). Embora peso e altura sejam normais ao nascimento, subseqüentemente o crescimento da criança é lento.

Os sinais precoces mais comuns apresentados pelas crianças com DMD são a dificuldade em correr, subir escadas e quedas freqüentes (FIRTH *et al.*, 1983). No período de 3 a 5 anos de idade a criança começa a apresentar intensa fraqueza muscular. É uma doença progressiva que evolui com perda severa da musculatura, aumento do tecido conjuntivo fibroso intersticial e tecido adiposo. Aproximadamente aos 20 anos de idade o paciente vai a óbito, freqüentemente devido a problemas respiratórios.

Acredita-se que a patogênese da DMD está relacionada com uma anormalidade da membrana da fibra muscular, a qual permite a saída de enzimas intracelulares e o ingresso de cálcio (OBERC & ENGEL, 1977; BODENSTEINER & ENGEL, 1978; MAUNDER *et*

al., 1980). O acúmulo de cálcio é um fator importante na evolução da degeneração muscular (WROGEMANN & PENA, 1976; EBASHI & SUGITA, 1979). Um aumento elevado na concentração de cálcio em biópsias de músculos de pacientes com DMD tem sido extensamente reportado (BODENSTEINER & ENGEL, 1978; MAUNDER *et al.*, 1980; JACKSON *et al.*, 1985). Outras alterações histopatológicas importantes são múltiplos focos de necrose associados a intenso infiltrado inflamatório, fagocitose e regeneração parcial das fibras musculares.

Hoje sabe-se que a DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, pois só afeta indivíduos do sexo masculino. Sua anormalidade genética está presente no braço curto do cromossomo X (locus Xp21.1) cujo produto normal é uma proteína denominada distrofina. Devido ao tamanho e complexidade do gene, é bastante elevada a taxa de mutação, deleções ou duplicações (HOFFMAN, 1996). Isto resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas.

1.5.1 DISTROFINA

A distrofina é uma proteína de peso molecular de 427 kDa. Sua molécula é formada por uma tripla hélice de 2700 aminoácidos. Apresenta semelhanças estruturais com outras proteínas associadas ao citoesqueleto tais como a espectrina, α actinina, talina, vinculina e paxilina (SEIXAS *et al.*, 1997). É encontrada principalmente na face citoplasmática do sarcolema, fazendo parte do citoesqueleto subsarcolemal, ligada aos miofilamentos da fibra muscular e a um complexo de glicoproteínas da membrana.

O complexo distrofina-glicoproteínas é constituído por proteínas sarcolemas e é expresso em alta concentração no músculo estriado (CAMPBELL & KAHL, 1989; ERVASTI & CAMPBELL, 1991). Os componentes integrais deste complexo incluem: a distrofina, que liga-se a actina F (HOFFMAN *et al.*, 1987; RYBAKOVA *et al.*, 1996; RYBAKOVA & ERVASTI, 1997); a α -dystroglicana e a β -dystroglicana, que encontram-se ligadas ao domínio G da laminina 2 e a uma parte da distrofina mais rica em cisteína (JUNG *et al.*, 1995), respectivamente; as sintrofins, proteínas intracelulares que ligam-se ao terminal C da distrofina (YANG *et al.*, 1995); uma proteína que apresenta quatro domínios transmembrana, denominada de sarcospan (CROSBIE *et al.*, 1997); e as sarcoglicanas (NIGRO *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 1996). O complexo de sarcoglicanas consiste de quatro proteínas transmembrana denominadas de α -sarcoglicana, β -sarcoglicana, γ -sarcoglicana e δ -sarcoglicana, as quais estão ligadas a β -dystroglicana (SUNADA & CAMPBELL, 1995; NIGRO *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 1996). Em adição a laminina 2 e actina F há evidências de que a óxido nítrico sintase neuronal (BRENMAN *et al.*, 1995) e uma proteína chamada distrobrevina (BLAKE *et al.*, 1996; SADOULET-

PUCCIO *et al.*, 1997) também interagem com os componentes do complexo distrofina-glicoproteínas (Figura 1A).

Em estudos subseqüentes revelou-se que a distrofina também está particularmente concentrada na junção neuromuscular (Figura 1B) de mamíferos e na membrana pós-sináptica da eletroplaca do *Torpedo marmorata* (JASMIN *et al.*, 1990; YEADON *et al.*, 1991; para revisão ver BERTHIER & BLAINEAU, 1997).

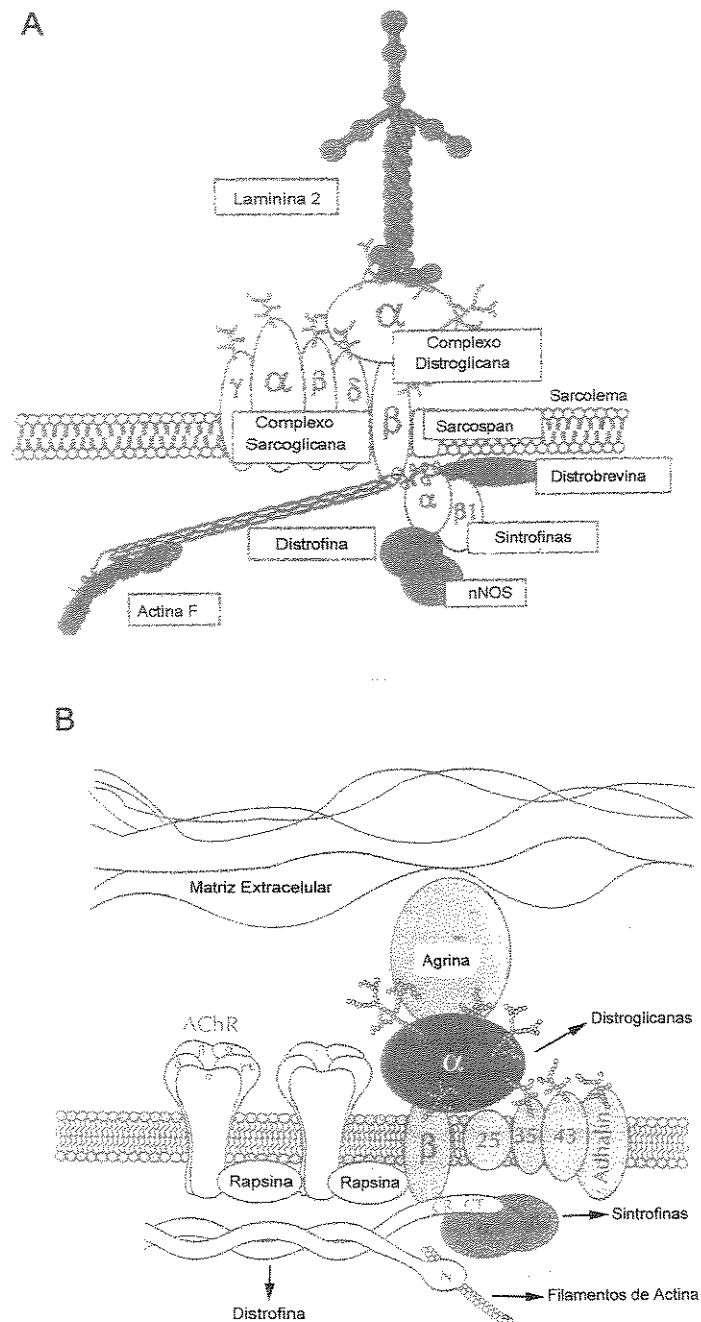


Figura 1

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

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

Estudos com fibras musculares de pacientes com DMD demonstraram que a deficiência de distrofina no sarcolema (BONILLA *et al.*, 1988) é acompanhada pela perda das proteínas associadas a distrofina (ERVASTI *et al.*, 1990), o que suporta a hipótese de que a desintegração do complexo distrofina-glicoproteínas induz uma ruptura da união entre o citoesqueleto da membrana e a matriz extracelular e, conseqüentemente, necrose da fibra muscular (ERVASTI & CAMPBELL, 1993; MATSUMURA & CAMPBELL, 1994).

1.5.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

A deficiência de distrofina também é encontrada em várias espécies animais, tais como cães, gatos e camundongos (GASGHEN *et al.*, 1992; MATSUMURA & CAMPBELL, 1994; VALENTINE *et al.*, 1986). Nos cães a doença parece ser mais severa e de evolução mais rápida que em humanos (PASTERNAK *et al.*, 1995). Nos gatos, apesar de apresentar um processo de fibrose mais brando, desenvolve hipertrofia muscular exagerada, com evolução geralmente fatal (GASGHEN *et al.*, 1992). Nos camundongos a fibrose do tecido muscular é mais moderada e o processo de regeneração maior.

Estudos genéticos demonstraram que nos camundongos *mdx* o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD. O mutante *mdx* foi inicialmente identificado na colônia de camundongos C57BL10/ScSn, apresentando níveis elevados das enzimas musculares piruvatoquinase e creatinoquinase (LEFAUCHEUR *et al.*, 1995). Tal como os humanos com DMD, os camundongos *mdx* também apresentam ausência de distrofina. Ultraestruturalmente há algumas diferenças evidentes entre a patologia dos camundongos *mdx* e da DMD. Desta forma, apesar dos camundongos apresentarem intenso infiltrado

inflamatório nas áreas de mionecrose, diferem da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos; machos e fêmeas são afetados e os músculos do *mdx* regeneram sucessivamente após necrose. Embora apresente algumas características diferentes em relação a miopatia humana, em termos de severidade e persistência da miopatia, o camundongo *mdx* é valioso como um modelo para DMD.

1.6 PRINCÍPIOS DA MICROSCOPIA CONFOCAL

O sistema óptico confocal foi descrito por MARVIN MINSKY (1957), durante seu pós-doutorado na Universidade de Harvard (USA). Entretanto, o sistema óptico confocal só foi largamente aplicado com o progresso do armazenamento e processamento da imagem digital.

O princípio óptico básico da microscopia confocal é simples (Figura 2). A lente focaliza a luz (emitida ou refletida) no detector (célula fotoelétrica). O pinhole (pequeno orifício posicionado no eixo do microscópio, em frente ao detector) impede a luz proveniente de planos sem foco (acima ou abaixo do plano em foco - linhas pontilhadas) atingir o detector. Somente a luz vinda de planos em foco (linhas contínuas) atravessa o pinhole, e é detectada. Todas as informações vindas de plano sem foco são excluídas, não contribuindo para a formação da imagem, melhorando assim a resolução do microscópio (LENZI *et al*, 1996). Os sinais captados pelo detector subsequentemente são usados para gerar uma imagem digital do espécime, em um monitor.

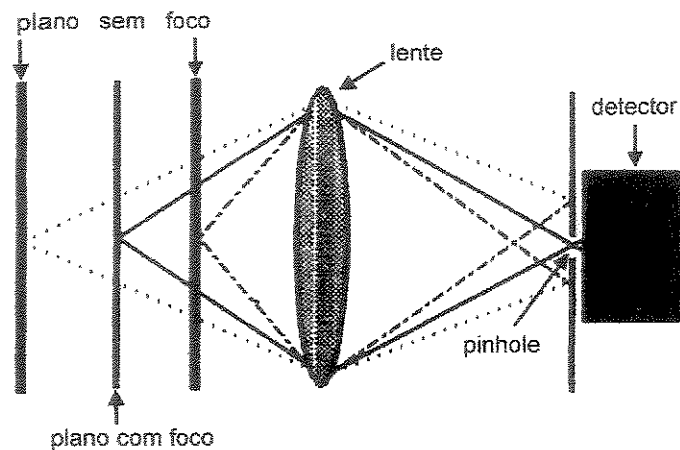


Figura 2. Princípio da microscopia confocal. Somente informações vindas de planos com foco são detectadas. Informações provenientes de planos sem foco são bloqueadas pelo pinhole e desta forma, não são registradas pelo detector. Adaptado de Tekola et al., *Progress in Pathology*, p. 12-21, 1994.

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

A microscopia de varredura laser confocal provocou verdadeira revolução na microscopia óptica de fluorescência. Permite, entre outros recursos, realizar tomografia e reconstruções tridimensionais de uma grande variedade de espécimes biológicos, em diferentes preparações (LENZI *et al.*, 1996). Permite também realizar cortes ópticos seriados de espessura variada (para as junções neuromusculares são feitos cortes de 1,5 a 2 μm , em média) resultando em melhor resolução das imagens. O esquema da Figura 3,

mostra os planos focais (1 e 2) em que cortes ópticos podem ser realizados com o microscópio confocal na junção neuromuscular. Normalmente esses cortes são realizados a partir da porção mais profunda (2), em direção à mais superficial (1).

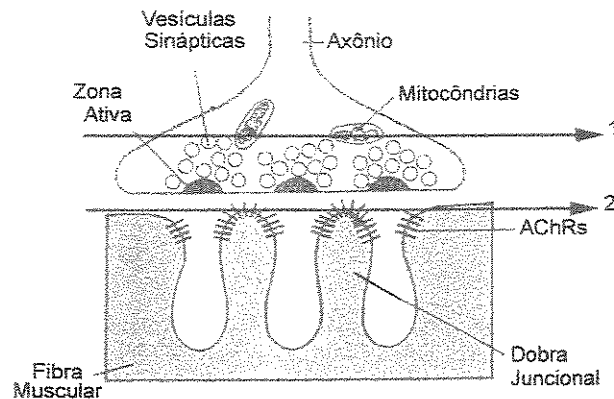


Figura 3. Esquema da junção neuromuscular mostrando os planos focais em que cortes ópticos podem ser realizados. No corte número 1 é esperado observar somente as estruturas que fazem parte do compartimento pré-sináptico e no corte 2 esperamos um predomínio da marcação dos AChRs. Adaptado de Drachman, *Trens. Neurosci.*, 6, p.446-451, 1983.

2. TRABALHO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers.

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

Department of Anatomy, IB, UNICAMP,
Campinas, São Paulo - 13083-970,
Brazil

Acknowledgments: Financial support from Fapesp (95/6110-2; 95/6956-9; 98/10324-6; 99/07792-0), CNPq and Capes. We thank Prof. Stephen Hyslop, Dept. of Pharmacology, School of Medicine, UNICAMP, for reviewing the manuscript.

Key words: acetylcholine receptors; neuronal nitric oxide synthase; neuromuscular junction; regenerated muscle fibers; confocal microscopy; mdx mice.

All correspondence should be addressed to:

Prof. Maria Julia Marques
Dept. Anatomia IB Unicamp
Campinas, SP - 13083-970,
Brazil
fax: 55-192-893124
email:marques@obelix.unicamp.br
phone: 55-19-788-7391

Running title: AChRs and nNOS in regenerated muscle

1

¹ Presented at the Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, Miami Beach, Fla. October 23-28, 1999.

Acetylcholine receptors and neuronal nitric oxide synthase distribution at the neuromuscular junction of regenerated muscle fibers.

Abstract

We investigated whether the changes in acetylcholine receptor (AChRs) distribution and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression reported for the skeletal muscle of *mdx* mice were a consequence of muscle fiber regeneration rather than of the absence of dystrophin. Degenerative-regenerative changes in muscle fibers of the sternomastoid muscle of normal mice were induced by injecting lidocaine hydrochloride. Twenty-one days later, AChRs were labeled with alpha-bungarotoxin and nNOS with anti-nNOS antibody and observed under a confocal microscope. AChRs were distributed in continuous branches in normal fibers. Regenerated fibers showed disruption of AChRs distribution similar to that seen in *mdx*. This suggests that changes in AChRs distribution seen in *mdx* were probably a consequence of muscle fiber degeneration-regeneration, rather than a symptom of dystrophin deficiency. Conversely, there were no changes in nNOS distribution and expression in normal regenerated fibers, suggesting that the decrease in nNOS expression reported for *mdx* mice might be attributed to the absence of dystrophin.

Key words: acetylcholine receptors; neuronal nitric oxide synthase; neuromuscular junction; regenerated muscle fibers; confocal microscopy; *mdx* mice.

Introduction

Mdx mutant mice, which carry a point mutation on the X-chromosome²² have a profound deficiency of the membrane-associated protein, dystrophin¹¹. These animals also display acute muscle fiber necrosis followed by regeneration²⁴.

In normal skeletal muscle, the protein dystrophin is closely associated with plasma membrane glycoproteins⁶ and may be involved in the stabilization of the sarcolemma. Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is a dystrophin-associated protein^{4,9}, that is directly linked to syntrophin, another component of the muscle fiber membrane (for a review see Grozdanovic & Baumgarten, 1999)¹⁰. nNOS accumulates at the extrajunctional sarcolemma and at the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction²⁶ and a decrease in nNOS expression had been reported in mdx animals^{4,9}.

Changes in the distribution of acetylcholine receptors (AChRs) have been reported at the neuromuscular junction of mdx mice¹⁴, but may be a secondary consequence of muscle fiber necrosis and regeneration, rather than a direct consequence of dystrophin deficiency^{14,25}. These observations suggested that the decreased concentration of nNOS in the junctional and extra-junctional sarcolemma of dystrophic muscles could also be a secondary consequence of muscle fiber necrosis and regeneration.

In this study, we investigated whether normal regenerated muscle fibers that express dystrophin show any changes in nNOS expression and AChR distribution. Degenerative-regenerative changes were induced in normal muscle fibers of mouse sternomastoid muscle by injecting a local anesthetic. Fluorescence confocal microscopy showed that the AChRs of

regenerated muscle fibers had a distribution very similar to that seen in dystrophin-deficient fibers of mdx mice, but with no changes in nNOS expression.

Materials and Methods

Animals

Male and female adult Balb/c mice (7 months old) were used. The animals were housed according to Institutional guidelines and had access to food and water *ad libitum*.

Intramuscular injection of lidocaine hydrochloride

The mice were anesthetized with a mixture (1:1) of ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis) and thiazine hydrochloride (Rompun, Bayer) at a dose of 0,02 g/ ml. The ventral surface of the neck was shaved and a midline incision was made from the apex of the mandible to the sternal notch. The left sternomastoid (STN) muscle was exposed by lateral reflection of the salivary glands and received two intramuscular injections of lidocaine hydrochloride (30 µl each). The contralateral side served as a control. The skin was sutured with interrupted Ethicon 5.0 sutures and the wound then carefully cleaned. The STN muscle was used since the normal pattern of AChRs distribution is well known for this muscle^{1,16}. In addition, it is a thin and flat muscle suitable for whole mount preparation and observation on the confocal microscope¹⁷.

Light microscopy

Seven (n=5), 14 (n=5) and 21 (n=5) days after lidocaine injection, the STNs were removed and stained with hematoxylin and eosin (HE) for evaluation of muscle fiber regeneration. Briefly, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate (0.6 mg/kg) and perfused intracardially with PBS. The STNs were removed, fixed

overnight in 10% formaldehyde, dehydrated through an ethanol series and embedded in paraffin. Transversal sections 6 μ m thick were stained with HE and examined with a light microscope (Nikon-Optiphot-2) connected to a Hamamatsu video-camera and a Sony monitor. The number of normal and regenerated (indicated by the presence of central cell nuclei) muscle fibers was counted using a hand counter. The 21-day end point was chosen since after this time 90% of the fibers had regenerated and returned to their initial size and less inflammatory infiltrate was present.

Confocal microscopy

Twenty-one days after lidocaine injection, the mice (n=5) were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate and perfused intracardially with PBS followed by freshly prepared cold fixative (4% formaldehyde in PBS). Right and left STN muscles were removed, placed in a sylgard dish and washed with PBS. The muscles were incubated with rhodamine-alpha-bungarotoxin (Rh-BTX; Molecular Probes, 1 μ g/ml) for receptors and anti-nNOS (Sigma; 1:500 in blocking solution) followed by anti-mouse IgG-fluorescein (Sigma; 1:500), for nNOS staining. After washing with PBS, the muscles were mounted in DABCO (mounting media for fluorescence microscopy, Sigma) with DAPI (Sigma; a DNA stain for nuclei) and then observed with a confocal microscope.

A dual-channel BioRad laser confocal system (MRC 1024UV) mounted on an Axiovert 100 Zeiss inverted microscope and equipped with Ar-Kr and UV lasers was used. A wavelength of 568 nm was used to excite the rhodamine-labeled receptors, 488 nm was used to excite fluorescein and 351 nm was used to excite DAPI. The settings for contrast, brightness and iris diameter were adjusted and kept constant during all observations of

control and injured muscles. Two Zeiss microscope objectives, a 40X 1.4 NA water immersion objective and a 63X 1.4 NA oil immersion objective, were used for confocal imaging. The “Processing” software from BioRad confocal system was used to measure the pixel value (mean \pm SD) in the green channel (nNOS) for each image taken from controls and lidocaine-treated muscles, to give a quantitative data about nNOS fluorescence signal in both groups. Pixel value is setup within a range of zero to 255.

Results

Histological findings

Seven days after lidocaine injection, regenerative process was predominant and there were no signs of ongoing necrosis. Cross-sections showed that the regenerating muscle fibers had small diameter, basophilic cytoplasm and centrally placed nuclei (Fig.1A). The latter showed loose chromatin and prominent nucleoli. Regenerating fibers were most numerous near the surface of the muscle, although they also occurred to a depth of one-third of the muscle thickness.

The regenerating fibers returned almost to their initial size 21 days after the injection (Fig.1B). At this time, most of the fibers had dense and still centrally placed nuclei. As expected, inflammatory infiltrates surrounding the regenerated fibers was more abundant at 7 days after lidocaine injection than at 21 days.

Confocal microscopy findings

AChRs and cell nuclei distribution in normal fibers

In normal fibers, AChRs were distributed in regular and continuous branches (Fig.2A). Muscle fiber nuclei labelled with DAPI were distributed along the edges of the fibers. About 7-10 cell nuclei possibly belonging to Schwann cells or representing endplate nuclei, were regularly seen grouped in the endplate region (Fig.2B).

Distribution of AChRs and cell nuclei in regenerated fibers of lidocaine-treated versus dystrophin-deficient muscles

Twenty-one days after lidocaine injection, almost all of the regenerated fibers (n=75 out of 80) showed AChRs distributed in clusters or small islands (Figs. 3A,B; 4). These clusters were about 3.5 μm in diameter and appeared to result from breakdown of the original branches. In most of the neuromuscular junctions, the AChRs islands were delimited by a bright outline with a dimmer central area resembling a hole in the center (Fig. 3B). This pattern of AChR staining was also observed in almost all of the dystrophin-deficient fibers of mdx mice (n=78 out of 80; Fig. 5A).

The nuclei of lidocaine-treated regenerated fibers were located centrally although some nuclei, possibly belonging to terminal Schwann cells in the presynaptic region, were seen grouped in the endplate region (Figs. 3C,D). An apparent increase in the number of cell nuclei was observed in lidocaine-treated (Fig. 4) and mdx (Fig. 5C) muscles when compared to non-injected muscle fibers (Fig. 2B).

nNOS distribution and expression in normal versus lidocaine-treated regenerated fibers

In control and lidocaine-treated muscles, nNOS immunolabeling was associated with the extrajunctional sarcolemma and overlying AChRs (Figs. 2C and 4) and with intramuscular trunks that branched over the endplate region (Fig. 4). Cell nuclei in the presynaptic region and intramuscular trunks were usually surrounded by nNOS immunolabeling (Fig. 4). There was no difference in nNOS expression between normal and regenerated muscle fibers as seen qualitatively (Fig. 6) or quantitatively, by measuring the

pixel value in the green channel of controls ($40,6 \pm 5,6$, n=6) and lidocaine-treated muscles ($41,3 \pm 7,0$, n=6).

Discussion

A number of experimental procedures are available to induce muscle fiber degeneration and regeneration, including crushing, ischemia, cold and heat injury and transplantation. However, the resulting regenerating fibers are not homogeneous in their distribution nor is their morphology reproducible because supporting tissues are simultaneously damaged¹⁸.

Several local anesthetics, including lidocaine, induce muscle fiber necrosis, possibly by allowing extracellular fluid to enter the sarcoplasm, leading to extensive Ca^{2+} ion accumulation, myofibrillar hypercontraction and necrosis². Typically, this myonecrosis is followed by fiber regeneration, since satellite cells are well preserved and can be recruited for regeneration. In addition, the vascular supply and the connective tissue are unaffected¹⁸, thus allowing rapid regeneration of the muscle. Using lidocaine injections, it was therefore possible to induce degenerative-regenerative changes in normal muscle fibers by mechanisms similar to those that occur in mdx fibers, making this a suitable model to compare the results with those obtained from dystrophin-deficient fibers.

The sequence of morphological changes observed after lidocaine injection was similar to that reported for local anesthetics in other muscles^{2,18}. Thus, STN regenerated fibers appeared around 7 days after the injection of anesthetic and was essentially complete after 21 days. At this point, most of the fibers had centrally placed cell nuclei stained for DNA with DAPI (see Figure 3). Using this approach it was possible to distinguish neuromuscular junctions that really belonged to regenerated fibers, an observation not always possible with other techniques.

AChRs are anchored at the neuromuscular junction through a cytoskeletal network with one of the important proteins involved being dystrophin. The C terminus of dystrophin binds to glycoproteins that contain transmembrane components and link the subsarcolemmal cytoskeleton to the basal lamina^{3,15,20}. In normal adult muscle fibers, AChRs are usually distributed in continuous branches^{1,16,17}. Since AChR stability and distribution are associated with cytoskeletal anchoring, this normal adult pattern is lost in dystrophin-deficient fibers. However, since such changes were observed in regenerated muscle fibers of mdx mice, they were considered to be a consequence of muscle fiber degeneration-regeneration instead of an absence of dystrophin^{14,25}.

No studies so far have addressed the question of whether a normal regenerated fiber would show AChR changes comparable to those seen in regenerated dystrophin-deficient mdx fibers. In this work, regenerated fibers from lidocaine-treated muscles showed AChRs in small clusters a few μm in diameter, in a pattern similar to that seen in mdx mice (compare Figures 3 and 4 with Figure 5). Once again, confocal microscopy proved useful for examining AChR distribution and cell nuclei position, in relation to regenerating fibers. That normal regenerated fibers exhibited the same pattern of AChR distribution as seen in dystrophic regenerated fibers, suggests that dystrophin deficiency in mdx mice apparently has little direct or immediate effect on AChR distribution.

This suggestion is contrary to a previous *in vitro* report stating that dystrophin is required for the remodeling and/or maintenance of neuromuscular junction in regenerating mdx muscle fibers¹³. The discrepancy between our suggestion and that of Kong and Anderson (1999) probably reflects the fact that they studied only mdx fibers and did not use normal regenerated fibers as controls. The comparison of regenerated normal and mdx fibers

was also used by Körtgen & Franke (1994)¹² to show that the occurrence of embryonic AChRs in adult mdx muscles is a consequence of muscle fiber degeneration-regeneration, rather than of the absence of dystrophin. In our opinion, comparison with normal regenerated controls is necessary to correctly understand the biology of mdx fibers.

Compared to normal fibers, regenerated fibers showed no changes in the intensity or distribution of nNOS fluorescence in the extrajunctional and junctional sarcolemma (see Figure 6). It is known that nNOS does not bind directly to dystrophin, but is linked to the syntrophin complex of proteins, which are part of a dystrophin-associated group⁵. Thus, we raised the question of whether the nNOS deficiency reported for the mdx^{4,7} could also be a consequence of muscle fiber degeneration-regeneration. Our results suggest that the decrease in nNOS expression reported in mdx mice is in fact related to the absence of dystrophin and not a consequence of muscle fiber degeneration-regeneration. This conclusion agrees with studies showing that proteins which are part of the dystrophin-complex, such as nNOS, are affected by a dystrophin deficiency^{8,19}. In addition, our results suggest that a deficiency of nNOS in mdx mice has no effect on AChR distribution, even though nNOS is part of the junctional cytoskeletal network⁵.

Although the functions of dystrophin and nNOS in muscle cells remain unclear, our findings indicate that neither molecule plays an essential role in maintaining a normal AChR distribution at the adult neuromuscular junction. We hypothesize that regenerated muscle fibers, whether they are dystrophin-deficient or not, have some features that affect the normal organization of AChR molecules. For instance, the junctional basal lamina, which is maintained during fiber degeneration, is important for the correct reestablishment of innervation and, hence, for reorganization of the junction^{21,27}. Thus, one possibility would be

that because of the proliferation of connective tissue during fiber degeneration, the junctional basal lamina loses its ability to re-orientate the formation of the junctional apparatus and synapses are formed in slightly different areas than they were originally. Another possibility would be that the smaller diameter of the regenerated fibers would lead AChR branches to collapse. However, this seems unlikely since 21 days after lidocaine injection, the muscle fibers had almost attained their original size and still displayed disrupted receptors.

It is known that some of the neuromuscular junction molecular organization, such as AChR synthesis and assembly, result from the expression of genes in motor endplate nuclei clustered in the postsynaptic region²³. These nuclei may become free and centered on a regenerated muscle fiber, in a manner similar to muscle fiber cell nuclei, leading to disruption of the AChR insertion into the postsynaptic membrane. The observation of centralized muscle fiber nuclei very close to the endplate boundaries or even within the endplate region (see Figures 3 and 4 for normal regenerated fibers and Figure 5 for mdx regenerated fibers), suggests that motor endplate cell nuclei may also become centered. However, it is unclear whether this condition can alter AChR distribution.

In conclusion, the requirements for AChR organization in muscle regeneration seem to be the same whether dystrophin is present or not. In studies of mdx muscle, normal regenerated fibers should be included as an additional control since the abnormalities in the former may be related to muscle fiber necrosis and regeneration, rather than to a direct effect of dystrophin deficiency.

7. Chang W-J, Iannaccone ST, Lau KS, Masters BSS, McCabe TJ, McMillan K, Padre RC, Spencer MJ, Tidball JG, Stull JT: Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9142-9147.
8. Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 1990;345:315-319.
9. Grozdanovic Z, Gosztonyi 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* 1996;98:61-69.
10. Grozdanovic Z, Baumgarten HG: Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histology and Histopathol* 1999;14(1):243-256.
11. Hoffman EP, Brown RHJr, Kunkel LM: Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987;51:919-928.
12. Költgen D, Franke CH: The coexistence of embryonic and adult acetylcholine receptors in the sarcolemma of mdx dystrophic mouse muscle: an effect of regeneration or muscular dystrophy? *Neurosc Letters* 1994;173: 79-82.

13. Kong J, Anderson JE: Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. *Brain Research* 1999;839:298-304.
14. Lyons PR, Slater CR: Structure and function of the neuromuscular junction in young adult mdx mice. *J Neurocytol* 1991;20:969-981.
15. Man NT, Ellis JM, Love DR, Davies KE, Gatter KC, Dickson G, Morris GE. 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* 1991;115:1695-1700.
16. Marques MJ, Conchello JA, Lichtman JW: From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J Neuroscience* 2000;20:(10)3663-3675.
17. Marques MJ, Santo Neto H: Imaging neuromuscular junctions by confocal fluorescence microscopy: individual endplates seen in whole muscles with vital intracellular staining of the nerve terminals. *J Anat* 1998;192:425-430.
18. Nonaka I, Takagi A, Ishiura S, Nakase H, Sugita H: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol* 1983;60:167-174.

19. Ohlendieck K, Campbell KP. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J Cell Biol* 1991;115:1685-1694.
20. Ohlendieck K, Ervasti JM, Matsumura K, Kahl SK, Leveille CJ, Campbell KP: Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* 1991;7:499-508.
21. Sanes JR, Chiu AY. The basal lamina of the neuromuscular junction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1983;48:667-678.
22. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ: The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 1989;244:1578-1580.
23. Simon AM, Hoope P, Burden SJ. Spatial restriction of AChRs gene expression to subsynaptic nuclei. *Development* 1992;114:545-553.
24. Tanabe Y, Esaki K, Nomura T: Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol* 1986;69:91-95.
25. Torres LF, Duchen LW: The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 1987;110:269-299.

26. Yang C-C, Alvarez RB, Engel, WK, Haun CK, Askanas V. Immunolocalization of nitric oxide synthase at the postsynaptic domain of human and rat neuromuscular junction – Light and electron microscopy studies. *Exp Neurology* 1997;148:34-44.
27. Wernig A, Herrera A: Sprouting and remodeling at the nerve muscle junction. *Progress in Neurobiol* 1986;27:251-291.

LEGENDS

Figure 1. Regenerated muscle fibers from STN muscle 07 days (A) and 21 days (B) after lidocaine treatment. In A and B, regenerated muscle fibers (arrow) with central cell nuclei. In A, note the presence of fibrosis (asterisk). In B, cell nuclei are pyknotic. Scale bar: 80 μm .

Figure 2. AChRs (A), nuclei (B) and nNOS immunolabeling (C) in a neuromuscular junction of a normal fiber. In A, AChRs are distributed in continuous branches (arrow). In B, muscle fiber nuclei (arrow heads) and cell nuclei at the presynaptic region of the endplate (arrow). In C, nNOS labeling is seen covering AChRs, at the presynaptic region (star) and at the extra-junctional sarcolemma (arrow head). Scale bar: 50 μm .

Figure 3. AChRs (A,B) and cell nuclei (C,D) of a regenerated muscle fiber, 21 days after lidocaine treatment. The same endplate region and muscle fiber are seen in all four panels. In A, C and D, the edge of the fiber is marked by an arrow on the left. Note that AChRs are distributed in islands or clusters. AChRs islands typically display a brighter outline and a dimmer central area (arrow in B). In one focal plane, cell nuclei are seen grouped at the presynaptic region of the endplate (arrows head - C); in a deeper focal plane, central cell nuclei are seen (arrows head - D) in the same muscle fiber. Scale bar: 20 μm .

Figure 4. AChRs (red), cell nuclei (blue) and nNOS (green) labeling in regenerated muscle fibers, 21 days after lidocaine treatment. Note that receptors are broken (short arrows) and it

was possible to see nuclei centrally placed (arrow heads), indicating a regenerated muscle fiber. nNOS distribution was seen in intramuscular nerve trunks that branched over the receptors (long arrows). Cell nuclei associated to nNOS immunolabeling were seen (asterisks). nNOS labeling at the extrajunctional sarcolemma was observed (open arrow). Scale bar: 30 μ m.

Figure 5. AChRs (A,B) and cell nuclei (C) distribution in mdx fibers. In A, note that AChRs islands show a brighter outline and a dimmer central area (arrows), in a very similar pattern seen in regenerated muscle fibers. In B, the same nmj of A in lower magnification; receptors are saturated because brightness and iris settings were increased so that muscle fiber striations could be seen. In C, note that broken receptors (arrows) belong to regenerated fibers, given the presence of central cell nuclei (arrow heads). Scale bar: 20 μ m.

Figure 6. Overall view of control (upper panel) and lidocaine-treated muscle fibers, 21 days after treatment (lower panel). AChRs (arrows) and nNOS immunolabeling. No changes in FITC-fluorescence signal, from nNOS, were qualitatively seen. Scale bar: 50 μ m.

ABBREVIATIONS

AChR = acetylcholine receptor

nNOS = neuronal nitric oxide synthase

STN = sternomastoid muscle

NMJ = neuromuscular junction

PBS = phosphate buffer solution

DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole

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

Rh-BTX = rhodamine-alpha-bungarotoxin

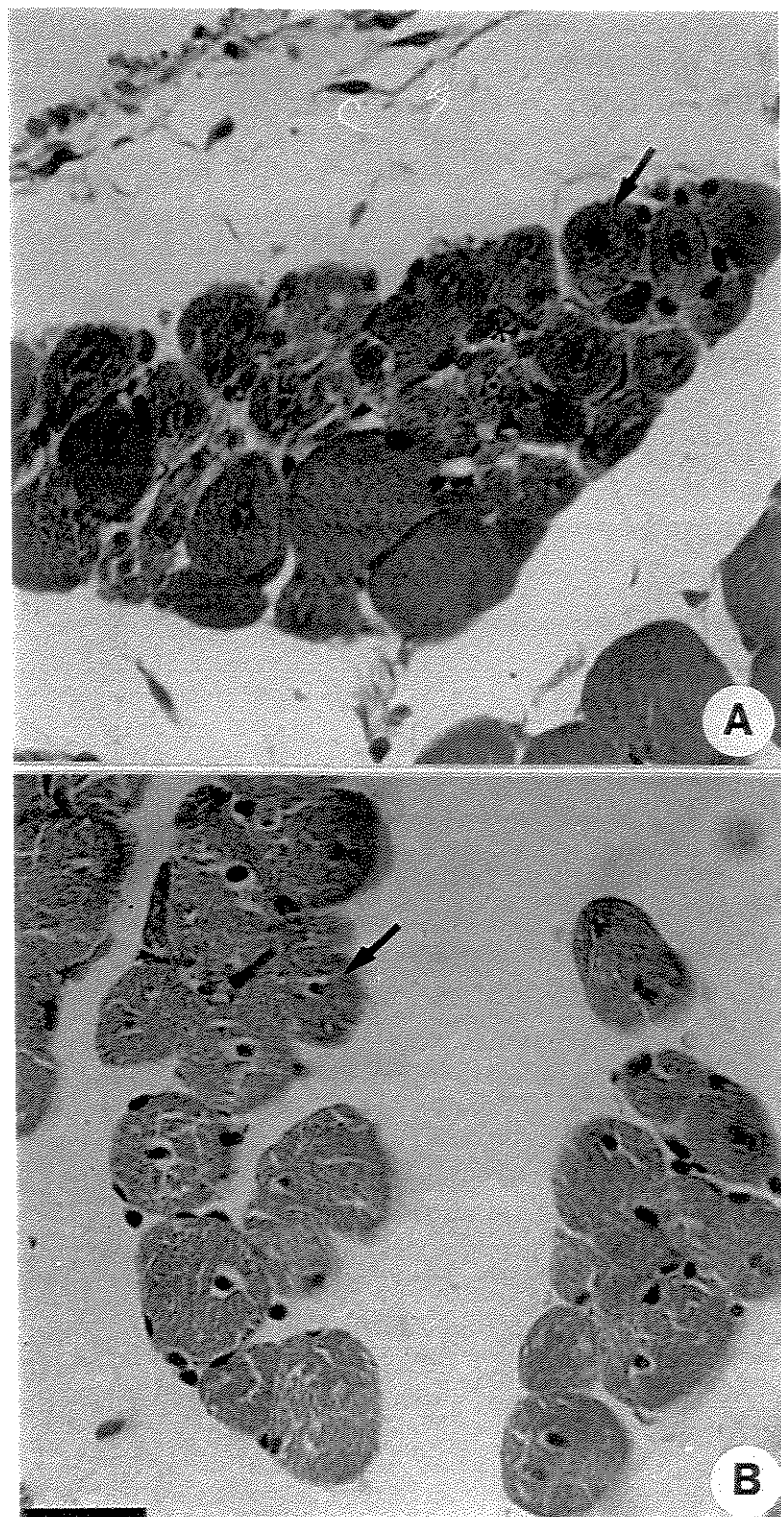


Figure 1.

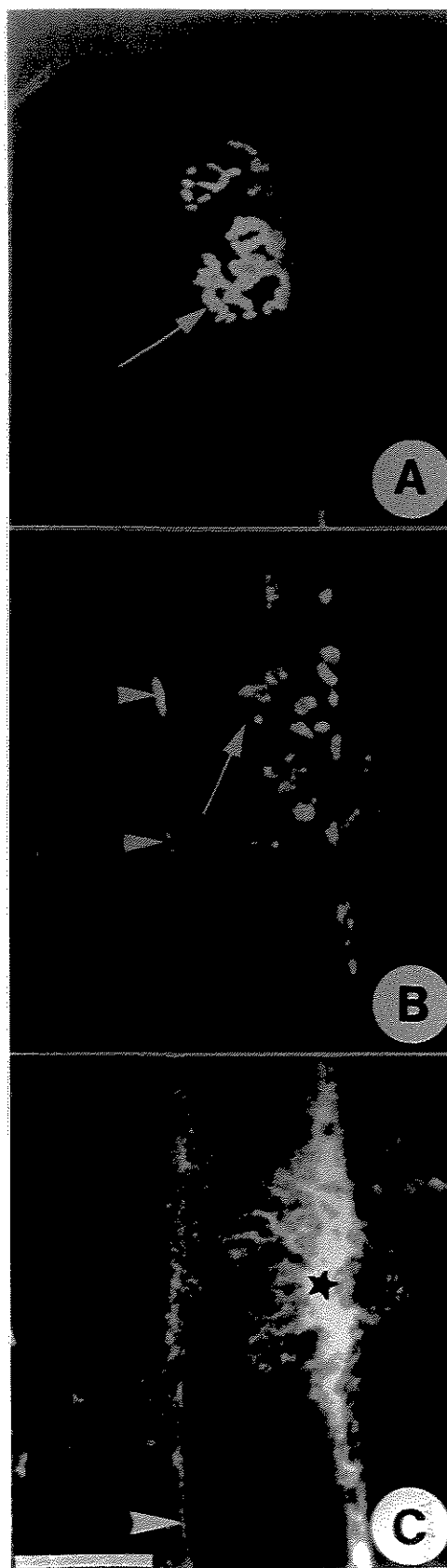


Figure 2.

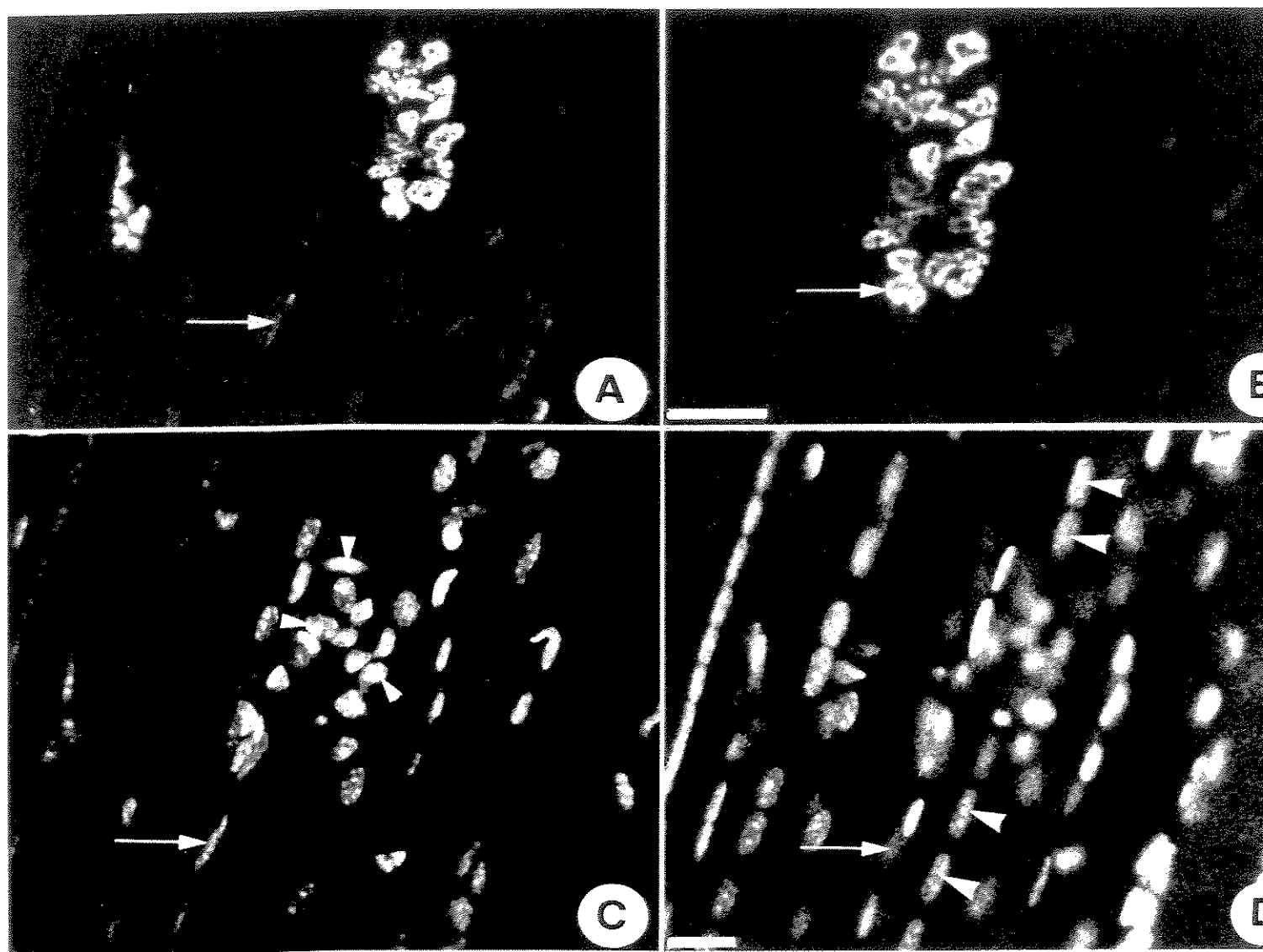


Figure 3.

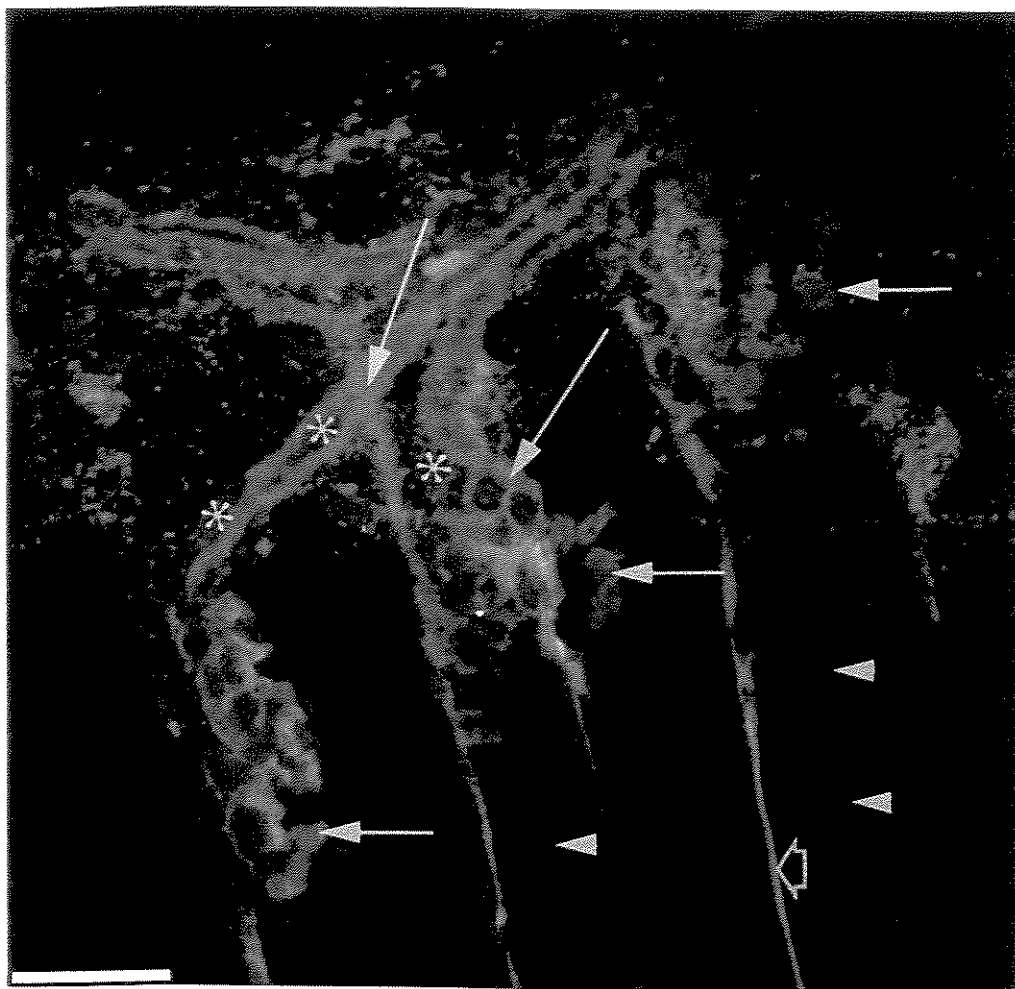


Figure 4.

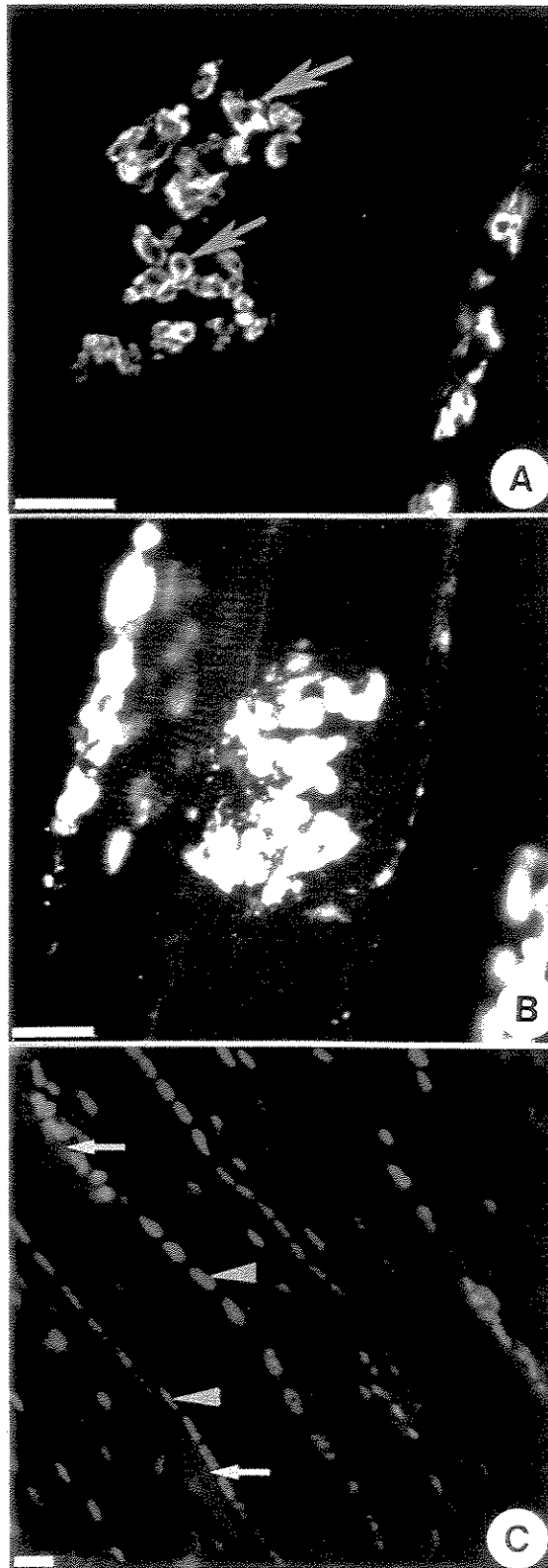


Figure 5.

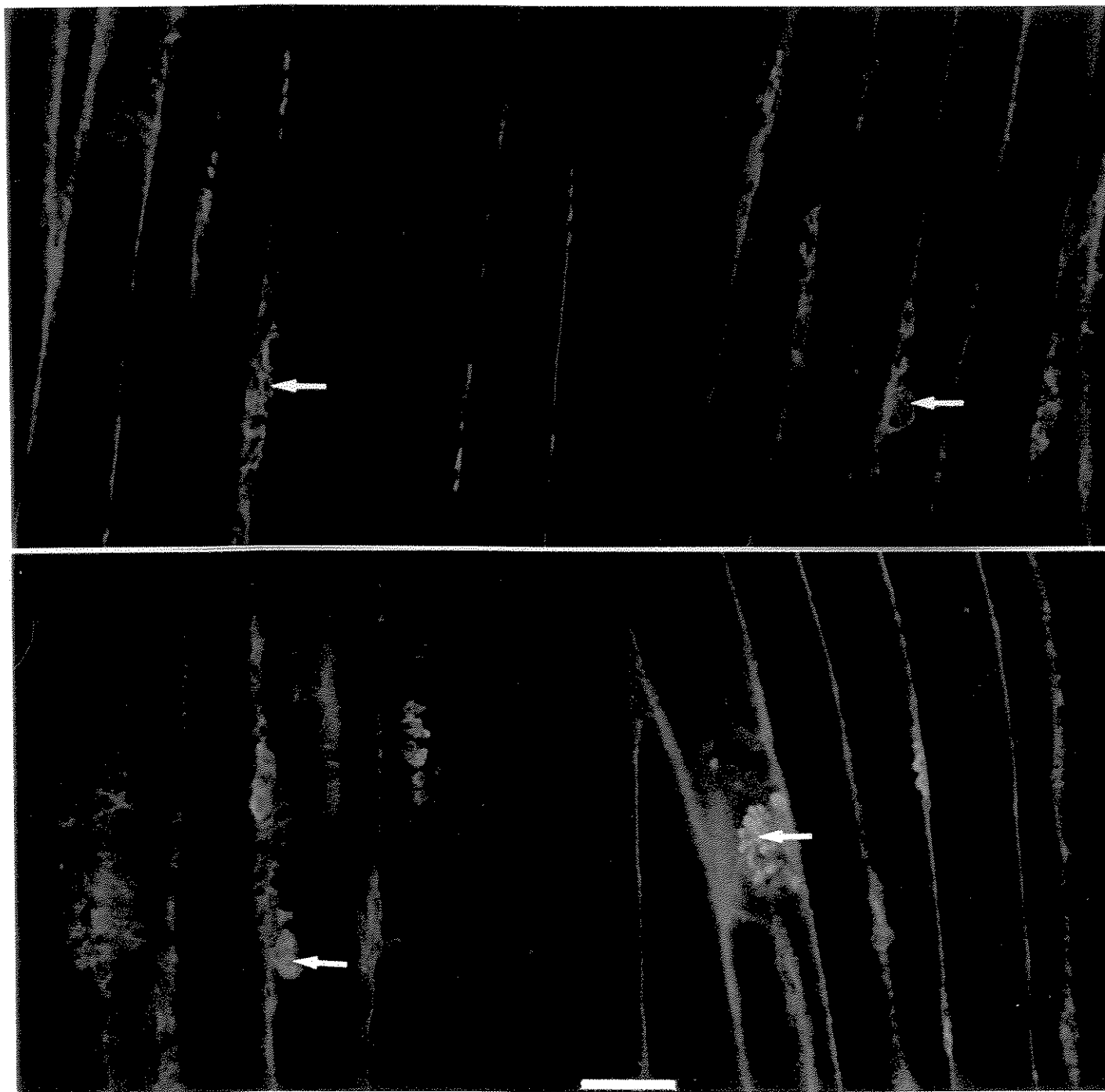


Figure 6.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Distribuição dos AChRs em fibras regeneradas

No presente trabalho observamos que a distribuição dos AChRs estava alterada nas fibras regeneradas em relação ao padrão normal. As fibras musculares regeneradas dos animais normais exibem o mesmo padrão de distribuição dos AChRs observado em fibras regeneradas distróficas, ou seja, os braços juncionais encontram-se fragmentados originando ilhas de receptores. Isto sugere que a deficiência de distrofina nos animais *mdx* pode não ter efeito direto na alteração do padrão de distribuição dos AChRs.

Nossa sugestão não está de acordo com a proposta de KONG e ANDERSON (1999) que utilizando cultura de células, sugeriram ser a distrofina necessária para a remodelação e/ou manutenção da estrutura da JNM nas fibras musculares regeneradas dos animais *mdx*, embora não o seja durante o desenvolvimento normal. Estes autores entretanto estudaram somente fibras regeneradas de animais *mdx* e não utilizaram fibras regeneradas de animais normais para comparar seus resultados.

Nossos resultados sugerem que fibras musculares regeneradas possuem características que afetam a organização normal dos AChRs, independente de serem distróficas ou não.

A lâmina basal juncional poderia ser uma dessas características. Ela é mantida durante a degeneração da fibra e é importante para o reestabelecimento correto da inervação e portanto, para a formação da junção (SANES & CHIU, 1983; WERNIG & HERRERA, 1986). Uma possibilidade seria a de que a lâmina basal juncional, devido a proliferação de tecido conjuntivo durante a degeneração da fibra, perderia sua habilidade para reorientar a formação do aparato juncional e sinapses são formadas em outras áreas, que não são a sua original.

Outra possibilidade poderia ser que devido ao menor diâmetro das fibras regeneradas, os braços de AChRs retraíssem. Entretanto, nós observamos que 21 dias após a aplicação da xilocaína, as fibras musculares quase atingiram seu tamanho original.

Finalmente, sabe-se que os AChRs são sintetizados pelos núcleos da placa motora (SIMON *et al.*, 1992) e poderia ser possível que, assim como os núcleos da fibra que migram da periferia para a região central, esses núcleos também alterassem sua localização, e isto promoveria a alteração no padrão de distribuição dos AchRs.

Expressão da nNOS em fibras regeneradas

Quanto a nNOS, observamos que não houve alteração de sua expressão e distribuição em fibras musculares regeneradas quando comparadas com fibras normais. Nossos resultados sugerem que a diminuição da expressão da nNOS nos animais *mdx* está de fato relacionada com a ausência da distrofina e não é uma consequência da degeneração-regeneração da fibra muscular. E isto está de acordo com outros trabalhos que relatam que proteínas que fazem parte do complexo-distrofina, assim como a nNOS, são afetadas pela deficiência da distrofina (ERVASTI *et al.*, 1990; OHLENDIECK & CAMPBELL, 1991).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

- Anderson-Cedergreen, E. Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstruction from serial sections. *J. Ultrastruct. Res.*, 1 (Suppl), p.1-191, 1959.
- Arikawa, E.; Ishihara, T.; Nonaka, I.; Sugita, H.; Arahata, K. Immunocytochemical analysis of dystrophin in congenital muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, 105(1), p.79-87, 1991.
- Benoit, P.W.; Belt, W.D. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J. Anat.*, 107, p.547-556, 1970.
- Berthier, C.; Blaineau, S. Supramolecular organization of the subsarcolemmal cytoskeleton of adult skeletal muscle fibers. *Biology of the Cell*, 89, p.413-434, 1997.
- Bertorini, T.E.; Bhattacharya, S.K.; Palmieri, G.M.M.A.; Chesney, C.M.; Pifer, D.; Baker, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 32, p.1088-1092, 1982.
- Blake, D.J.; Tinsley, J.M.; Davies, K.E. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol.*, 6, p.37-57, 1996.
- Bodensteiner, J.B.; Engel, A.G. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: A study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology (Minneapolis)*, 28, p.439-446, 1978.
- Bonilla, E.; Samit, C.E.; Miranda A.F.; Hays, A.P.; Salviati, G.; DiMauro, S.; Kunkel, L.M.; Hoffman, E.P.; Rowland, L.P. Duchenne muscular dystrophy: Deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, 54, p.447-452, 1988.
- Bowden, R.E.M.; Duchon, 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. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, p.682-685, 1990.
- Bredt, D.S.; Snyder, S.H. Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, p.175-195, 1994.

- Brennan, J.E.; Chao, D.S.; Xia, H.; Aldape, K.; Bredt, D.S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 82, p.743-752, 1995.
- Bulfield, G.; Siller, W.G.; Wight, P.A.L.; Moore, K.J. X chromosome - linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, p.1189-1192, 1984.
- Campbell, K.P.; Kahl, S.D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 338, p.259-262, 1989.
- Carbonetto, S.; Lindenbaum, M. The basement membrane at the neuromuscular junction: a synaptic mediatrix. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5, p.596-605, 1995.
- Carlson, B.M. Regeneration of entire skeletal muscle. *Fed. Proc. Bethesda*, 45(5), p.1456-1460, 1986.
- Carlson, B.M.; Faulkner, J.A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 15(3), p.187-198, 1983.
- 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.
- Chang, W.-J.; Iannaccone, S.T.; Lau, K.S.; Masters, B.S.S.; McCabe, T.J.; McMillan, K.; Padre, R.C.; Spencer, M.J.; Tidball, J.G.; Stull, J.T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, p.9142-9147, 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, p.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.

- Cleeter, M.W.J.; Cooper, J.M.; Darleyusmar, V.M.; Moncada, S.; Schapira, A.H.V. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide – Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett*, 345, p.50-54, 1994.
- Couteaux, R. Motor end plate structure. In: **The Structure and Function of Muscle**. Ed. G.H. Bourne, New York, Academic Press, v.2, p.483-527, 1973.
- Crosbie, R.H.; Heighway, J.; Venzke, D.P.; Lee, J.C.; Campbell, K.P. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.*, 272, p.31221-31224, 1997.
- Dawson, T.M.; Snyder, S.H. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.*, 14, p.5147-5159, 1994.
- Ebashi, S.; Sugita, H. The role of calcium in physiological and pathological processes of skeletal muscle. In: Aguayo AJ, Karpatis G, eds. **Current topics in nerve and muscle research**. Amsterdam: Excerpta Medica, ICS No 445, p.73-84, 1979.
- Engel, A.G.; Santa, T. Histometric analysis of the ultrastructure of the neuromuscular junction in myasthenia gravis and in the myasthenic syndrome. *Ann. NY Acad. Sci.*, 183, p.46, 1971.
- Engel, A.G.; Yamamoto, M.; Fischbeck, K.H. Dystrophinopathies. In: Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. **Myology (vol. 2)**. USA: McGraw-Hill, p.1130-1187, 1994.
- Ervasti, J.M.; Campbell, K.P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66, p.1121-1131, 1991.
- Ervasti, J.M.; Campbell, K.P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.*, 122, p.809-823, 1993.
- Ervasti, J.M.; Ohlendieck, K.; Kahl, S.D.; Gaver, M.G.; Campbell, K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 345, p.315-319, 1990.

- Firth M.; Gardner-Medwin D.; Hosking G.; Wilkinson E. Interviews with parents of boys suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.*, 25(4), p.466-471, 1983.
- 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.
- Förstermann, U.; Closs, E.I.; Pollock, J.S.; Nakane, M.; Schwarz, P.; Gath, I.; Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, molecular cloning and functions. *Hypertension*, 23, p.1121-1131, 1994.
- Foster, A.H.; Carlson, B.M. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesth. Analg.*, 59, p.727-736, 1980.
- Gasghen, E.R.; Hoffman, E.P.; Gorospe, J.R.; Uhl, E.W.; Senior, D.F.; Cardinet, G.H.; Pearce, L.K. Dystrophy deficiency causes lethal muscle hipertrophy in cats. *J. Neurological Sci.*, 110, p.149-153, 1992.
- Goodearl, A.D.; Yee, A.G.; Sandrock, A.W.Jr.; Corfas, G.; Fischbach, G.D. ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 130, p.1423-1433, 1995.
- Grounds, M.D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path. Res. Pract.*, 187, p.1-22, 1991.
- 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.; Baumgarten, H.G. Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histology and Histopatol.*, 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.
- Hibbis, J.B.Jr.; Taintor, R.R.; Vawrin, Z.; Rachlin, E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157, p.87-94, 1988.
- 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.
- Hoffman, E.P. Clinical and histopathological features of abnormalities of dystrophin-based membrane cytoskeleton. *Brain Pathol.*, 6, p.49-61, 1996.
- 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.
- Ignarro, L.J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol. Toxicol.*, 67, p.1-7, 1990.
- Jackson, M.J.; Jones, D.A.; Edwards, R.H.T. Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta*, 147, p.215-221, 1985.
- Jasmin, B.J.; Cartaud, A.; Ludosky, M.A.; Changeux, J.P. Asymmetric distribution of dystrophin in developing and adult *Torpedo marmorata* electrocyte: Evidence for its association with the acetylcholine receptor-rich membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, p.3938-3941, 1990.
- Jo, S.A.; Zhu, X.; Marchionni, M.A.; Burden, S.J. Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate Ach-receptor gene expression. *Nature*, 375, p.158-161, 1995.
- Jones, S.W. Presynaptic mechanisms at vertebrate neuromuscular junction. In: **The Vertebrate Neuromuscular Junction**. Ed M M Salpeter. New York. Alan R Liss Inc., 1987. p. 187-245.

- Jung, D.; Duclos, F.; Apostol, B.; Straub, V.; Lee, J.C.; Allamand, V.; Venzke, D.P.; Sunada, Y.; Moomaw, C.R.; Leveille, C.J.; Slaughter, C.A.; Crawford, T.O.; McPherson, J.D.; Campbell, K.P. Characterization of δ -sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.*, 271, p.32321-32329, 1996.
- Jung, D.; Yang, B.; Meyer, J.; Chamberlain, J.S.; Campbell, K.P. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, 270, p.27305-27310, 1995.
- King, C.E.; Meylinshyn, M.J.; Mewburn, J.D.; Curtis, S.E.; Winn, M.J.; Cain, S.M.; Chapler, C.K. Canine hindlimb blood flow and oxygen uptake after inhibition of EDRF/NO synthesis. *J. Appl. Physiol.*, 76, p.1166-1171, 1994.
- Kobzik, L.; Reid, M.B.; Bredt, D.S.; Stamler, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, 372, p.546-548, 1994.
- Kobzik, L.; Stringer, B.; Balligand, J.-L.; Reid, M.B.; Stamler, J.S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211, p.375-381, 1995.
- Kong, J.; Anderson, J.E. Dystrophin is required for organizing large acetylcholine receptor aggregates. *Brain Research*, 839, p.298-304, 1999.
- Kusner, L.; Kaminski, H.J. Nitric oxide synthase concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res.*, 730, p.238-242, 1996.
- Lefaucheur, J.P.; Pastoret, C.; Sebille, A. 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.
- 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.

- Magill-Solc, C.; McMahan, U.J. Synthesis and transport of agrin-like molecules in motor neurons. *J. Exp. Biol.*, 153, p.1-10, 1990.
- Marques, M.J.; Conchello, J.A.; Lichtman, J.W. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience*, 20, p.3663-3675, 2000.
- Matsumura, K.; Campbell, K.P. Dytrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*, 17, p.2-15, 1994.
- 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.
- Matthews-Bellinger, J.; Salpeter, M.M. Distribution of acetylcholine receptors at frog neuromuscular junctions with a discussion of some physiological implications. *J. Physiol. (Lond)*, 279, p.197-213, 1978.
- Maunder Sewry, C.A.; Gorodetsky, R.; Yaron, R.; Dubowitz, V. Element analysis of skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy using x-ray fluorescence spectrometry. *Muscle & Nerve*, 3, p.502-508, 1980.
- Mayer, B.; John, M.; Böhme, E. Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.*, 277, p.215-219, 1990.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43, p.109-142, 1991.
- 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.
- Nathan, C.; Hibbs, J.B.Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*, 3, p.65-70, 1991.

- Nathan, C.; Xie, Q-W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 269, p.13725-13728, 1994.
- Nigro, V.; Piluso, G.; Belsito, A.; Politano, L.; Puca, A.A.; Papparella, S.; Rossi, E.; Viglietto, G.; Esposito, M.G.; Albondanza, C.; Medici, N.; Molinari, A.M.; Nigro, G.; Puca, G.A. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum. Mol. Genet.*, 5, p.1179-1186, 1996.
- Nonaka, I.; Takagi, A.; Ishiura, S.; Nakase, H.; Sugita, H. Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol.*, 60, p.167-174, 1983.
- Oberc, M.A.; Engel, W.K. Ultrastructural localization of calcium in normal and abnormal skeletal muscle. *Lab. Invest.*, 36, p.566-577, 1977.
- Ohlendieck, K.; Ervasti, J.M.; Matsumura, K.; Kahl, S.K.; Leveille, C.J.; Campbell, K.P. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*, 7, p.499-508, 1991.
- Palade, G.; Palay, S. Electron microscopic observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.*, 118, p.346-356, 1954.
- Palmer, R.M.; Ferrige, A.G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, p.524-526, 1987.
- 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.
- Pasternack, C.; Wong, S.; Elson, E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell Biol.*, 128(3), p.355-361, 1995.
- 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.

- Prelle, A.; Medori, R.; Moggio, M.; Chan, H.W.; Gallanti, A.; Scarlato, G.; Bonilla, E. Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *J. Neurology*, 239(2), p.76-78, 1992.
- Reger, J.F.; Craig, A.S. Studies on the fine structure of muscles fibers and associated satellite cells in hypertrophic human deltoid muscle. *Anat. Rec.*, 162, p.483-500, 1968.
- Rybakova, I.N.; Amann, K.J.; Ervasti, J.M. A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J. Cell Biol.*, 135, p.661-672, 1996.
- Rybakova, I.N.; Ervasti, J.M. Dystrophin-glycoprotein complex is monomeric and stabilizes actin filaments *in vitro* through a lateral association. *J. Biol. Chem.*, 272, p.28771-28778, 1997.
- Sadoutel-Puccio, H.M.; Rajala, M.; Kunkel, L.M. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, p.12413-12418, 1997.
- Salpeter, M.M. Electron microscope radioautoradiography as a quantitative tool in enzyme cytochemistry. II. The distribution of DFP-reactive sites at motor endplates of a vertebrate twitch muscle. *J. Cell Biol.*, 42, p.122-134, 1969.
- Salpeter, M.M. Vertebrate neuromuscular junctions: General morphology, molecular organization, and functional consequences. In: **The Vertebrate Neuromuscular Junction**. Ed. M.M. Salpeter, New York, Alan R. Liss, 1987.
- Sanes, J. The synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Dev. Biol.*, 6, p.163-173, 1995.
- Sanes, J.R.; Chiu, A.Y. The basal lamina of the neuromuscular junction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 48, p.667-678, 1983.
- Sanes, J.R.; Lichtman, J.W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22, p.389-442, 1999.
- Schmidt, H.H.H.W.; Pollock, J.S.; Nakane, M.; Gorsky, L.D.; Försterman, U.; Murad, F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, p.365-369, 1991.

- Schuman, E.M.; Madison, D.V. Nitric oxide and synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, p.153-83, 1994.
- Schweizer, M.; Richter, C. Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204, p.169-175, 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), p.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.
- Simon, A.M.; Hooper, P.; Burden, S.J. Spatial restriction of AChRs gene expression to subsynaptic nuclei. *Development*, 114, p.545-553, 1992.
- Snyder, S.H. Nitric oxide, first in a new class of neurotransmitters? *Science*, 257, p.494-496, 1992.
- Steinbach, J.H. Developmental changes in acetylcholine receptor aggregates at rat skeletal neuromuscular junctions. *Dev. Biol.*, 84, 267-276, 1981.
- Sunada, Y.; Campbell, K.P. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Current. Opinion in Neurology*, 8, p.379-384, 1995.
- 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. Neurol.*, 56(12), p.1283-1289, 1997.
- Torres, L.F.; Duchon, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, 110, p.269-299, 1987.
- Unwin, N. Neurotransmitter action: Opening of ligand-gated channels. *Cell* 72(Suppl.), p.31-41, 1993.

- 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.
- Volnandt, W.; Zimmermann, H. Acetylcholine ATP, and proteoglycan are common to synaptic vesicles isolated from the electric organ of eel and electric catfish as well as from rat diaphragm. *J. Neurochem.*, 47, p.1449, 1986.
- Vracko, R.; Benditt, E.P. Basal lamina: The scaffold for orderly cell replacement. *J. Cell Biol.*, 55, p.406-419, 1972.
- 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.
- Yang, B.; Ibraghimov-Beskrovnya, O.; Moomaw, C.R.; Slaughter, C.A.; Campbell, K.P. Heterogeneity of the 59 kDa dystrophin-associated protein revealed by cDNA cloning and expression. *J. Biol. Chem.*, 269, p.6040-6044, 1995.
- Yeadon, J.; Lin, H.; Dyer, S.; Burden, S. Dystrophin is a component of the subsynaptic membrane. *J. Cell Biol.*, 115, p.1069-1076, 1991.
- Yun, H.Y.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol. Psychiatry*, 2, p.300-310, 1997.
- Weinberg, C.B.; Hall, Z.W. Junctional form of acetylcholinesterase restored at nerve-free endplates. *Dev. Biol.*, 68, p.631-635, 1979.
- Wernig, A.; Herrera, A. Sprouting and remodeling at the nerve muscle junction. *Progress in Neurobiol.*, 27, p.251-291, 1986.
- Whittaker, V.B. The structure and function of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem. Soc. Trans.*, 12, p.561, 1984.
- 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.

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

Obs: * De acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)
6023 Agosto/1989