



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica

Tese

Wallace Lucio de Camargo

**Plasticidade sináptica homeostática na junção neuromuscular de
camundongos ChAT-ChR2-EYFP jovens e idosos**

Belo Horizonte

2019

Wallace Lucio de Camargo

Plasticidade sináptica homeostática na junção neuromuscular de camundongos ChAT-ChR2-EYFP jovens e idosos



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lígia Araújo Naves

Co-orientador: Prof. Christopher Kushmerick

Belo Horizonte

2019

043

Camargo, Wallace Lucio de.

Plasticidade sináptica homeostática na junção neuromuscular de camundongos ChAT-ChR2-EYFP jovens e idosos [manuscrito] / Wallace Lucio de Camargo. – 2019.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profª. Drª. Lígia Araújo Naves. Co-orientador: Prof. Christopher Kushmerick.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

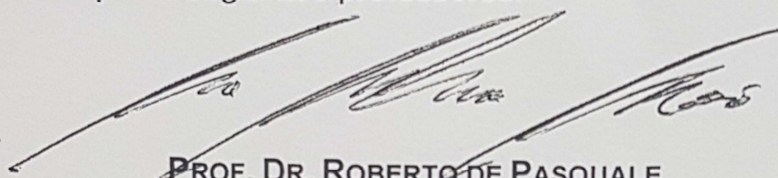
1. Fisiologia. 2. Acetilcolina. 3. Junção neuromuscular. 4. Plasticidade Neuronal. 5. Sinapses. 6. Homeostase. 7. Depressão. I. Naves, Lígia Araújo. II. Kushmerick, Christopher. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

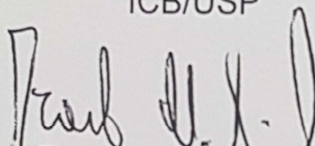
"PLASTICIDADE SINÁPTICA HOMEOSTÁTICA NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE CAMUNDONGOS CHAT-CHR2-EYFP JOVENS E IDOSOS"

WALLACE LUCIO DE CAMARGO

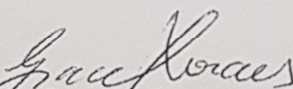
Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 06 de novembro de 2019, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



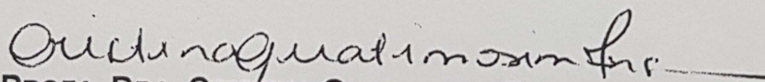
PROF. DR. ROBERTO DE PASQUALE
ICB/USP



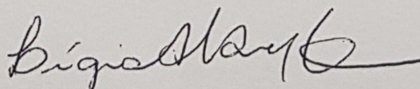
PROF. DR. RICARDO MAURICIO XAVIER LEÃO
FMRP/USP



PROFA. DRA. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. CRISTINA GUATIMOSIM FONSECA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. LÍGIA ARAÚJO NAVES KUSHMERICK
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 06 de novembro de 2019

DEDICATÓRIA

A Deus, por proteger e iluminar toda minha trajetória de aprendizagem. Aos meus pais Jonas e Edna, por todo apoio, atenção e carinho dedicados durante os vários anos de estudo em minha vida.

Sem vocês nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Doutora Lígia Araujo Naves, por ter me recebido e guiado com toda atenção, paciência e carinho ao longo dos anos. Obrigado pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao Professor Doutor Christopher Kushmerick, por todo suporte, ensinamento e apoio.

A minha esposa Natalia Reine por sempre estar ao meu lado, te amo.

Aos meus amigos de laboratório, por todo apoio e companheirismo nas horas difíceis.

Aos animais que contribuíram indubitavelmente para a obtenção deste trabalho.

À UFMG pela excelência no ensino.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, embora não citados, sabem o quanto contribuíram.

Resumo

O aumento da quantidade de glutamato por vesícula em *Drosophila* é compensado pela diminuição do número de vesículas liberadas por estimulação nervosa. Este mecanismo compensatório capaz de reestabelecer a homeostasia sináptica é chamado de depressão homeostática pré-sináptica (DHP). Nós hipotetizamos que o aumento crônico da liberação de acetilcolina (ACh) por vesícula na junção neuromuscular de camundongos (JNM) pode resultar em uma diminuição compensatória na liberação vesicular evocada. Para testar isto, nos utilizamos a linhagem de camundongos ChAT-ChR2-EYFP (Hyper VAcHT) com 3 e 24 meses de idade que possuem um aumento dos níveis de expressão de VAcHT, e seus controles selvagens (WT). Foram avaliados potenciais de placa espontâneos (MEPPs) e evocados (EPPs), em baixa (0.2 e 0.3Hz) e alta (20 e 30Hz) frequência de estimulação na junção neuromuscular do músculo diafragma. Nós também registramos, em *Voltage Clamp*, as correntes de placa em miniatura (MEPCs). Aos 3 meses de idade, os camundongos Hyper VAcHT apresentaram aumento no tamanho e frequência dos quanta. O conteúdo quântico dos camundongos Hyper VAcHT (29 ± 2.5 , média \pm EPM, n= 4 animais) não apresentou diferença significativa ($p=0.44$) em relação aos WT (32 ± 2.2 , média \pm EPM, n= 4 animais). A depressão sináptica foi 19% maior nos camundongos Hyper VAcHT, e a PTP não foi estatisticamente diferente. Durante a estimulação tetânica, a área dos MEPPs dos camundongos Hyper VAcHT foi menor que antes do trem de estimulação, enquanto que este parâmetro não foi alterado nos animais WT. Isto sugere que o aumento da depressão nos animais Hyper VAcHT é devido ao menor efeito da liberação vesicular. Aos 24 meses de idade, os camundongos Hyper VAcHT apresentaram uma diminuição significativa no CQ (WT= 41 ± 3.5 , média \pm EPM, n= 5 animais; HyperVAcHT= 29 ± 4.1 , média \pm EPM, n= 3 animais; $p=0.07$). A depressão sináptica e a potenciação pós tetânica (PTP) não foram estatisticamente diferentes. Estes resultados mostram que os camundongos Hyper VAcHT compensaram o aumento no tamanho dos quanta de duas maneiras diferentes: aos 3 meses, os EPPs em altas frequências de estimulação reduziram por aumento de dessensibilização ou diminuição da quantidade de ACh por vesícula. Enquanto que aos 24 meses observamos diminuição do CQ. Nossos dados mostram que o aumento crônico da liberação de ACh por vesícula sináptica aciona o mecanismo pré-sináptico de DHP, que se instala durante o envelhecimento dos animais, diminuindo o número de vesículas liberadas. Este mecanismo não é visto em camundongos jovens, que mantem as taxas de disparo pós-sináptico através de outros mecanismos.

Palavras-chave: Acetilcolina, ChAT-ChR2-EYFP, depressão pré-sináptica homeostática, junção neuromuscular, VAcHT.

Abstract

The increased amount of glutamate per vesicle in *Drosophila* is compensated by a decrease in the number of vesicles released by nerve stimulation. This compensatory mechanism capable of restoring synaptic homeostasis is called presynaptic homeostatic depression (PHD). We hypothesized that chronic increase in vesicular acetylcholine (ACh) release at the mouse neuromuscular junction (NMJ) may result in a compensatory decrease in evoked vesicular release. To test this, we used 3 and 24 months old ChAT-ChR2-EYFP (Hyper VAcHT) mice that have increased levels of VAcHT expression, and their wild-type controls (WT). All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee (protocol number 106/2015 - CEUA). Spontaneous and evoked endplate potentials (EPPs) were evaluated at low (0.2 and 0.3Hz) and high (20 and 30Hz) frequency of stimulation at the NMJ of the diaphragm muscle. We also recorded, in voltage clamp, miniature plate currents (MEPCs). At 3 months of age, Hyper VAcHT mice presented increased quantal size and frequency. The quantal content (QC) of Hyper VAcHT mice (29 ± 2.5 , mean \pm SEM, $n = 4$ animals) showed no significant difference ($p = 0.44$) from the WT controls (31.5 ± 2.2 , mean \pm SEM, $n = 4$ animals). Synaptic depression was 19% higher in Hyper VAcHT mice, and PTP was not statistically different. During tetanic stimulation, Hyper VAcHT MEPPs areas were smaller than before the train of stimuli, while in the WT mice there was no change during high frequency stimulation. This suggests that the increased depression observed in Hyper VAcHT mice is due a decrease effect of vesicular release. At 24 months of age, Hyper VAcHT mice showed a significant decrease in QC (WT = 41 ± 3.5 , mean \pm SEM, $n = 5$ animals; Hyper VAcHT = 29 ± 4.1 , mean \pm SEM, $n = 3$ animals; $p = 0.07$). Synaptic depression and posttetanic potentiation (PTP) were not statistically different. These results show that Hyper VAcHT mice compensated for the increase in quanta size in two different ways: at 3 months, EPPs at high frequency stimulation decreased by increased desensitization or decreased ACh per vesicle. While at 24 months, we observed a decreased in QC. Our data show that longterm increase in ACh per *quantum* triggers the pre-synaptic mechanism of DHP seeing as a decrease in the number of vesicles released. This mechanism is not seeing in young animals, which keep the same postsynaptic output through other mechanism.

Keywords: Acetylcholine, ChAT-ChR2-EYFP, neuromuscular junction, presynaptic homeostatic depression, VAcHT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxo de sinais utilizado para registrar potencias sinápticos: Current Clamp	26
Figura 2 - Registro representativo da liberação quântica espontânea e evocada na junção neuromuscular	27
Figura 3 - Fluxo de sinais utilizado para registrar correntes sinápticos modo: Voltage Clamp	28
Figura 4 - Correntes de placa motora em miniatura (MEPC) na junção neuromuscular	29
Figura 5 - Aumento da amplitude dos MEPPs nos camundongos Hyper VACHT adultos ...	31
Figura 6 - Média das amplitudes dos MEPPs dos camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses.....	32
Figura 7 - Frequência dos MEPPs nos camundongos Hyper VACHT adultos e idosos.	33
Figura 8 - Aumento da amplitude e frequência das MEPCs em camundongos Hyper VACHT adultos.....	34
Figura 9 - Aumento da amplitude dos EPPs dos camundongos Hyper VACHT adultos ...	36
Figura 10 - Aumento da amplitude dos EPPs dos camundongos Hyper VACHT adultos...	37
Figura 11 - Diminuição do Conteúdo quântico da junção neuromuscular de camundongos Hyper VACHT idosos	38
Figura 12 - Alterações na amplitude dos EPPs durante e após estimulação tetânica em camundongos WT e Hyper VACHT adultos e idosos	39
Figura 13 - Facilitação no início da estimulação tetânica em camundongos WT e Hyper VACHT adultos e idosos.....	40
Figura 14 - Diminuição na amplitude dos EPPs durante estimulação tetânica em camundongos Hyper VACHT adultos	41

Figura 15 - Alterações na amplitude dos EPPs e intervalo dos MEPPs após estimulação tetânica em camundongos Hyper VACHT adultos e idosos.....43

Figura 16 – Alterações na amplitude, área e tempo de decaimento dos MEPPs durante e após estímulo tetânico.....45

Figura 17 – Estimativa no número de quanta no RRP durante estimulação tetânica em camundongos Hyper VACHT adultos e idosos.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - acetilcolina

CHT1 - transportados de colina de alta afinidade 1

CQ - conteúdo quântico

DHP - depressão homeostática pré-sináptica

EPP - potencial de placa evocado

EPM – erro padrão da média

GABA - ácido gama aminobutírico

Hyper VAcHT - camundongos ChAT-ChR2-EYFP

Hyper VAcHT - camundongos modificados ChAT-ChR2-EYFP

Hz - hertz

JNM - junção neuromuscular

KDVAcHT - animais knockdown para o VAcHT

LTD - depressão de longa duração

LTP - potenciação de longa duração

MEPCs - correntes de placa em miniatura

MEPPs - potenciais de placa em miniatura

mV - milivolts

NSF- N-ethylmaleimide Sensitive Factor

PHP - potenciação homeostática pré-sináptica:

RP - reservatório de reciclagem

RRP - reservatório prontamente liberável

RtP - reservatório de repouso

SNAP-25 - synaptosomal-associated protein 25

SNAREs - soluble NSF attachment receptor

SNC - sistema nervoso central

tSNAREs – terminal soluble NSF attachment receptor

TTX - tetrodotoxina

VACht - transportador vesicular de acetilcolina

VAMP-1 - vesicle-associated membrane protein

vSNAREs – vesicular soluble NSF attachment receptor

WT - camundongos selvagens

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1 Neurotransmissão	9
1.2 Junção neuromuscular	11
1.3 Acetilcolina e receptores de acetilcolina	11
1.4 Síntese e armazenamento de ACh	13
1.5 Exocitose e endocitose	13
1.6 Liberação quântica e não quântica.....	15
1.7 Plasticidade sináptica.....	16
1.8 Plasticidade sináptica homeostática.....	18
1.9 Consequências do envelhecimento na junção neuromuscular	20
1.10 VAChT	21
2. Justificativa	23
3. Objetivos	23
4. Estratégia experimental, materiais e métodos	24
4.1 Animais	24
4.2 Solução, fármacos e reagentes.....	24
4.3 Soluções e preparação do músculo para registro	24
4.4 Sistema de registro	25
4.5 Eletrofisiologia: Current Clamp.....	25
4.6 Registros eletrofisiológicos dos potenciais de placa em miniatura (EPPs)	26
4.7 Registros Eletrofisiológicos dos potenciais de placa evocados (MEPPs)	27
4.8 Eletrofisiologia: Voltage Clamp.....	28
4.9 Registros eletrofisiológicos das correntes de placa em miniatura (MEPCs)	28
4.10 Análise estatística	29
5. Resultados	29
5.1 Medidas de liberação espontânea.....	29

5.1.1 Alterações na amplitude dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) em camundongos ChAT-ChR2-EYFP (Hyper VAcHt).....	29
5.1.2 Alterações na frequência dos MEPPs em camundongos Hyper VAcHt adultos e idosos	32
5.1.3 Mudanças nas correntes de placa em miniatura (MEPCs) pelo aumento da expressão do VAcHt	33
5.2. Medidas da liberação evocada em baixa frequência de estimulação	35
5.2.1 Alterações em potenciais de placa evocados (EPPs) de camundongos Hyper VAcHt	35
5.3 Conteúdo quântico	37
5.3.1 Mudanças produzidas no conteúdo quântico dos camundongos Chat-ChR2-EYFP (Hyper VAcHt)	37
5.4 Medidas de plasticidade sináptica a curto prazo	38
5.4.1 Facilitação	39
5.4.2 Depressão	40
9.4.3 Potenciação pós tetânica	41
5.5 Área, amplitude e tempo de decaimento dos MEPPs durante e após estimulação tetânica	43
5.6 Alterações na liberação quântica do pool vesicular prontamente liberável (RRP) durante estimulação tetânica em camundongos Hyper VAcHt.....	46
6. Discussão.....	47
6.1 Consequências do aumento da expressão do VAcHt em camundongos jovens	47
6.2 Aumento na depressão sináptica nos animais Hyper VAcHt jovens	49
6.3 Alterações na neurotransmissão com a idade.....	50
6.4 Plasticidade sináptica homeostática em camundongos Hyper VAcHt	51
6.6 Alterações no VAcHt como estratégia terapêutica	52
7. Conclusão	53
8. Referências	54

1. Introdução

Os neurônios possuem a capacidade de alterar as taxas de disparo de potenciais de ação, garantindo a homeostasia da transmissão sináptica. Esta regulação é chamada plasticidade sináptica homeostática (Turrigiano, 2012; Davis e Müller, 2015). Trabalhos anteriores mostraram que o aumento na liberação de glutamato induzido por aumento na expressão do transportador vesicular de glutamato resultou na diminuição do número de vesículas recrutadas por estimulação nervosa (Daniels *et al*, 2004). Tal resposta caracteriza um mecanismo plástico compensatório que é capaz de reestabelecer a homeostasia sináptica, este fenômeno é chamado de depressão homeostática pré-sináptica (DHP) (Gaviño *et al*, 2015; Li *et al*, 2018).

Recentemente, foi observado que a linhagem de camundongos ChAT-ChR2-EYFP criado por Zhao *et al* (2011) possuem um aumento na liberação de ACh na JNM devido ao aumento dos níveis de expressão de VACHT (Satoshi *et al*, 2016). Esta linhagem de camundongos, é, portanto, uma ferramenta muito útil para estudar a DHP na sinapse periférica colinérgica, pois este tipo de plasticidade homeostática ainda não foi reportado em mamíferos e muitas questões relacionadas a este fenômeno permanecem desconhecidas.

Portanto, nosso objetivo foi investigar se camundongos Hyper VACHT apresentam o mecanismo compensatório da DHP e quais seriam as alterações na neurotransmissão colinérgica em idades avançadas.

1.1 Neurotransmissão

O Sistema Nervoso Central (SNC) é um dos sistemas mais complexos, contendo bilhões de neurônios que recebem, integram e enviam potenciais de ação para todo o organismo. Isto permite a sinalização necessária para função normal do organismo. A propagação de potenciais de ação entre células excitáveis ocorre através de pontos de conexões chamadas de sinapses. As sinapses consistem em junções onde os neurônios podem fazer conexões diretas (sinapses elétricas) ou indiretas (sinapses químicas) nos dendritos, soma ou axônio de outros neurônios, tecidos musculares ou glandulares estimulando ou inibindo suas atividades (Furshpan e Potter, 1958; Adish *et al*, 2010).

As sinapses elétricas são caracterizadas por possuírem o terminal pré e pós-sináptico conectados. A condução dos potenciais de ação ocorre através de estruturas proteicas que formam pequenos tubos com baixa resistência elétrica, através dos quais permite a passagem de íons de uma célula para outra de forma livre. Estas pequenas estruturas proteicas tubulares são chamadas de junções comunicantes abertas (gap junctions). Devido ao fluxo de corrente direto entre as estruturas, a propagação do potencial de ação não possui atraso (delay), o que torna a sinapse elétrica mais rápida em relação a sinapse química. Outra característica específica na sinapse elétrica é sua condução bi-direcional. As sinapses elétricas podem ser encontradas em pequeno número no SNC, músculo liso e músculo cardíaco (Harris, 2001; Szczupak, 2016; Pereda, 2019).

As sinapses químicas possuem características estruturais bem distintas das sinapses elétricas. O terminal pré-sináptico é separado do terminal pós-sináptico por uma fenda sináptica. A transmissão do potencial de ação do nervo para o músculo é dependente da liberação de neurotransmissores armazenados em vesículas no citosol do terminal pré-sináptico. Os potenciais de ação propagados até o terminal pré-sináptico desencadeiam uma série de mecanismos que resultam na liberação de neurotransmissores para fenda sináptica. Ao se ligarem a seus receptores específicos localizados no terminal pós sináptico, os neurotransmissores ativam canais iônicos produzindo um potencial sináptico. Se supralimiar, os potenciais sinápticos evocam o potencial de ação no músculo esquelético. As sinapses químicas podem ser excitatórias, quando os neurotransmissores geram despolarizações no terminal pós-sináptico ou inibitórias quando os neurotransmissores produzem hiperpolarizações no terminal pós-sináptico (Hormuzdia *et al*, 2003; Pereda *et al*, 2013).

As sinapses químicas são mais lentas que as sinapses elétricas devido ao seu mecanismo mais complexo, mas por outro lado possuem a capacidade de conduzir de forma unidirecional o potencial de ação. Esta capacidade possibilita que o potencial de ação trafegue na direção necessária chegando aos neurônios ou tecidos alvo para executar as funções requeridas (Geraldine e Mennerick, 2009; Douglas *et al*, 2013). Além disto, apresentam maiores possibilidades de modulação.

1.2 Junção neuromuscular

Em mamíferos, os neurônios responsáveis por conduzir os potenciais de ação até a musculatura esquelética são chamados de neurônios motores ou motoneurônios. As fibras nervosas mielinizadas dos motoneurônios se originam nos cornos anteriores da medula espinhal, ao se aproximar sua terminação, perdem sua mielinização e se ramificam na musculatura esquelética formando botões sinápticos que se sobrepõem na superfície extracelular da fibra muscular (Adrian e Bronk, 1929; Danny-Brown, 1929). O ponto onde ocorre essa interação entre o sistema nervoso periférico e o musculo esquelético é chamado de junção neuromuscular (Robertson, 1956; Hughes *et al*, 2006). O terminal pré-sináptico não faz ligação direta com a superfície extracelular da fibra muscular (terminal pós-sináptico). Entre eles existe um espaço de 20 a 30 nanômetros de largura chamada de fenda sináptica (Goyal e Arun, 2013). A junção neuromuscular é uma sinapse química cujo neurotransmissor varia dependendo da espécie: nos vertebrados é a acetilcolina (Katz e Miledi, 1965) e nos invertebrados é o glutamato (Daniels *et al*, 2004). No terminal pré-sináptico dos vertebrados estão armazenadas centenas de milhares de vesículas preenchidas com o neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Del Castillo e Katz, 1954a, b; Katz, 1971; Van der Kloot e Molgo, 1994). O terminal pós-sináptico é formado por várias invaginações chamadas de dobras juncionais, que aumentam a área de superfície de ação onde o neurotransmissor liberado pode agir e possui receptores nicotínicos (AChR) espalhados por todo terminal (Zuber *et al*, 2005).

A junção neuromuscular de mamíferos tem sido uma ferramenta de estudo muito útil em pesquisas relacionadas a função sináptica. Isto se dá, por ela ter um papel de extrema importância no organismo e por apresentar um circuito relativamente simples, composto apenas por um terminal pré-sináptico, um terminal pós-sináptico e um neurotransmissor envolvido na neurotransmissão. Além disto, é de muito fácil acesso. Ainda assim, é um sistema onde muitas questões permanecem em aberto em relação a seu funcionamento.

1.3 Acetilcolina e receptores de acetilcolina

A acetilcolina foi primeiramente identificada como neurotransmissor através do clássico experimento realizado pelo pesquisador Otto Loewi em 1921, onde ao estimular eletricamente o nervo vago de um coração de sapo colocado em um

recipiente, foi observado que ao interconectar a solução que banhava o coração estimulado a um segundo coração sem nervo vago e sem estimulação elétrica, após algum tempo o segundo coração também apresentava uma diminuição no ritmo de seus batimentos (Loewi, 1921, revisado por Karczmar, 1996). A acetilcolina (ACh) é composta por um éster de ácido acético e colina. Tem a massa molar de 146,2 g/mol e sua fórmula química é $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{CH}_3$ ³. A ACh é o neurotransmissor da junção neuromuscular, mas também participa de processos cognitivos, memória, aprendizado, desenvolvimento do sistema nervoso, desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética (Bartus *et al*, 1982; Hasselmo, 1999; Misgeld *et al*, 2002, Brandon *et al*, 2003, De Castro *et al*, 2009). Possui papel fundamental no sistema nervoso autônomo, onde o neurotransmissor das fibras pré e pós-ganglionares parassimpáticas e fibras pré-ganglionares simpáticas, controlando várias funções que mantêm a homeostasia do organismo (Matsui *et al*, 2000; Leclere e Lefebvre, 2002; Olshansky *et al*, 2008).

A ACh atua em receptores nicotínicos e muscarínicos. Os receptores nicotínicos da ACh são canais iônicos (ionotrópicos) acionados por ligantes. Os receptores nicotínicos são constituídos por cinco subunidades proteicas. Sendo duas subunidades alfa, uma subunidade delta, beta e gama, cada receptor geralmente possui peso molecular de 275000 kDa. Cada subunidade alfa possui um sítio de ligação para ACh, que ao se ligar, gera uma mudança conformacional na estrutura do canal resultando em sua abertura, aumentando sua condutância para cátions, conseqüentemente após sua abertura, ocorre influxo de Na^+ que gera despolarização no terminal pós-sináptico. Podem ser encontrados no cérebro e na junção neuromuscular. Os receptores colinérgicos muscarínicos possuem características bem distintas em relação aos receptores colinérgicos nicotínicos, são receptores acoplados a proteína G (metabotrópicos). Foram classificados em 5 tipos, M1, M2, M3, M4 e M5. Podem ser encontrados no cérebro, coração, pâncreas e músculo liso (Dorje *et al*, 1990; Pedersen e Cohen, 1990; Taly *et al*, 2009).

Na junção neuromuscular de mamíferos, a grande quantidade de ACh liberada pelos terminais pré-sinápticos após estímulo nervoso se ligam aos receptores nicotínicos colinérgicos situados no terminal pós-sináptico no músculo esquelético. As despolarizações geradas pelo influxo de Na^+ através da abertura dos canais nicotínicos são chamadas potenciais de placa motora. Se as despolarizações forem

suficientes para alcançar o limiar da fibra muscular, resultará na produção de um potencial de ação muscular (Del Castillo e Katz, 1954a, b; Katz, 1971; Van der Kloot e Molgo, 1994).

1.4 Síntese e armazenamento de ACh

Na JNM de mamíferos, a ACh é sintetizada nos terminais pré-sináptico (Collier e Katz, 1973; Potter, 1970; Ribeiro *et al*, 2006). A Acetil-CoA e a colina são catalisados pela enzima colina acetiltransferase formando moléculas de ACh. O Acetil-CoA pode ser formado nos próprios neurônios sendo o resultado da oxidação total de moléculas orgânicas como o piruvato nas mitocôndrias. A colina é obtida por transporte ativo do líquido extracelular, pois não pode ser sintetizada por neurônios, podendo ser fornecida através da dieta, estando presente em uma grande variedade de alimentos como ovos, peixes, brócolis, farelo de aveia dentre outros (Savendahl *et al*, 1997, Scagnelli *et al*, 1991; Upadhyay, 2014).

As moléculas de ACh recém-formadas são transportadas para dentro de vesículas através do transportador vesicular de ACh (VAcHT) (Varoqui e Erickson, 1996; Kitamoto *et al*, 1998). As vesículas que armazenam a ACh possuem cerca de 40 nanômetros, geralmente possuem o formato arredondado (Gonatas *et al*, 1984; Zhang *et al*, 1998). As vesículas localizadas mais próximo da membrana do terminal pré-sináptico compõe o reservatório prontamente liberável (Readily Releasable Pool - RRP), formando a zona ativa. As vesículas localizadas na zona intermediária do terminal pré-sináptico compõe o reservatório de repouso (Resting Pool - RtP).

1.5 Exocitose e endocitose

O processo em que a vesícula se funde com a membrana do terminal pré-sináptico é chamado de exocitose (Zhang *et al*, 1998; Alabi e Tsien, 2012; Eggerman *et al*, 2013). Na exocitose, as proteínas do complexo SNARE são compostas por: Sinaptobrevina/VAMP 1 e 2, chamadas de vSNAREs, Sintaxina e SNAP-25, chamadas de t-SNAREs (Rizzoli e Betz, 2014; Südhof, 2013). A sinaptobrevina está localizada na membrana da vesícula, sintaxina e SNAP-25 na membrana plasmática do terminal pré-sináptico. A Sinaptotagmina I é a proteína que está envolvida com a sinalização do Ca^{2+} . A exocitose se inicia com o aumento na concentração de Ca^{2+} no

terminal pré-sináptico decorrente da chegada do potencial de ação e abertura dos canais Ca^{2+} sensíveis a voltagem. A sinaptotagmina I, localizada na membrana da vesícula, altera sua conformação e interage com as proteínas do complexo SNARE e com fosfolípidos da membrana. A interação entre as proteínas do complexo SNARE resulta na abertura de um poro decorrente da fusão parcial ou total das membranas promovendo a liberação dos neurotransmissores (Baig et al., 2016; Saheki; De Camilli, 2017). Este processo recruta centenas de vesículas de forma síncrona com o potencial de ação (Van der Kloot e Molgo, 1994; Betz e Angleson, 1998; Rizo, 2018)

Após serem excitadas, as vesículas passam por um processo de endocitose compensatória. Neste processo, as vesículas são formadas a partir da membrana do terminal pré-sináptico que se difundiram totalmente (endocitose mediada por clatrina diretamente da membrana plasmática) ou parcialmente (kiss and run) durante a exocitose. Após serem endocitadas, as vesículas sinápticas são preenchidas com neurotransmissor para possibilitar um novo ciclo (Van der Kloot e Molgo, 1994; Betz e Angleson, 1998; Rizzoli, 2014; Shanaday *et al*, 2019). O ciclo se inicia com a ancoragem das vesículas sinápticas à membrana no terminal pré-sináptico. As proteínas Munc13 e RIMs auxiliam na montagem de um complexo de proteínas SNARE e estabilizam a ligação das vesículas sinápticas com a membrana do terminal pré-sináptico. Durante a montagem das proteínas, as chaperonas aumentam a formação do complexo. O complexo de proteínas SNARE está parcialmente montado e assume conformação trans na etapa (amadurecimento/Priming I). A proteína complexina acopla-se ao complexo SNARE, aumentando o priming (Priming II). Após a despolarização do terminal pré-sináptico e abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem, os íons Ca^{2+} se ligam nos sítios C2 da sinaptotagmina, mudando a sua conformação e interagindo com complexo SNARE, induzindo exocitose vesicular. Ao final do ciclo as proteínas NSF e SNAPs promovem a dissociação do complexo SNARE e um novo ciclo se inicia (Südhof, 2013).

A ACh liberada para fenda sináptica se liga aos receptores nicotínicos, aumentando a condutância ao Na^+ gerando potenciais de placa motora, se as despolarizações geradas pelos potenciais de placa motora atingirem o limiar de excitabilidade da fibra muscular é gerado então, um potencial de ação muscular (Lena e Changeux, 1997; Taly *et al*, 2009). O potencial de ação muscular se propagara pelos túbulos T, desencadeando todo processo de contração muscular (Hansford e Lakatta,

1987; Block *et al*, 1988; Stokes e Wagenknecht, 2000; Di Franco *et al*, 2002; Alabi e Tsien, 2012).

A ACh é rapidamente removida de seu sitio de ligação com os receptores nicóticos. Esse processo é feito pela enzima acetilcolinesterase que quebra as moléculas de ACh por hidrólise, formando a colina e o acetato (Van der Kloot, 1993; Singh e Prior, 1998). O acetato é metabolizado enquanto que a colina é recaptada pelo terminal pré-sináptico pelos transportadores CHT1, sendo reutilizada para formação de novas moléculas de ACh. As novas moléculas de ACh são transportadas pelo VAcHT para dentro das vesículas (Scagnelli *et al.*, 1991; Savendahl *et al*, 1997, Alés *et al*, 1999; Upadhyay, 2014).

1.6 Liberação quântica e não quântica

Muito do que se sabe da neurotransmissão química foi obtido através de estudos realizados em JNM utilizando métodos eletrofisiológicos. Na década de 50, surgiu a hipótese de que pequenos pacotes de neurotransmissores eram liberados em quantidades discretas sem qualquer tipo de estímulo, gerando pequenas despolarizações no terminal pós-sináptico, essas pequenas despolarizações foram chamadas de potenciais de placa em miniatura (MEPP) (Fatt e Katz, 1952). Esses pacotes liberados de forma espontânea que geravam pequenas despolarizações (em torno de 0,5 mV), foram chamados de *quantum*. Estudos anteriores mostravam que quando o nervo era estimulado, uma despolarização mais lenta ocorria um pouco antes da fase de subida rápida de despolarização do potencial de ação muscular, essa despolarização mais lenta, foi chamada de potencial de placa evocado (EPP). Este evento foi associado como uma despolarização ocasionada pela liberação de vários quanta (Fatt e Katz, 1952; Del Castillo e Katz, 1954a, b). Alguns anos depois, a descoberta da existência de vesículas dentro do terminal pré-sináptico reforçou a hipótese da liberação quântica, sendo então denominada liberação quântica vesicular (Robertson, 1956; Heuser *et al*, 1979).

A liberação quântica espontânea ocorre de forma aleatória, geralmente na frequência de 1Hz. Cada *quantum* pode conter cerca de 7000 – 12000 moléculas de acetilcolina (Dunant, 1986; Katz, 1971; Kuffler e Voshjkaimi, 1975; Van der Kloot, 1991). A liberação quântica evocada ocorre quando o terminal é estimulado. Com isto,

centenas de quanta são liberados de forma síncrona com a estimulação, podendo chegar mais de 50.000 moléculas de acetilcolina liberadas para fenda sináptica por estímulo nervoso.

Estudos anteriores mostraram que a fibra muscular na JNM sofre uma despolarização constante. Isto ocorre devido a um vazamento de moléculas de acetilcolina do terminal pré-sináptico para fenda sináptica, este fenômeno foi chamado de liberação não quântica (Katz e Miledi, 1977). O mecanismo pelo qual ocorre esse vazamento constante de ACh pode estar associado a permanência de algumas cópias do transportador vesicular de acetilcolina (VAChT) presentes na membrana do terminal pré-sináptico, que podem permanecer por curtos períodos após a fusão das vesículas por exocitose, desta forma, transportando a acetilcolina do interior do terminal pré-sináptico diretamente para a fenda sináptica (Van der Kloot e Molgo, 1994; Petrov *et al*, 2011).

1.7 Plasticidade sináptica

A plasticidade sináptica é a capacidade que as sinapses possuem de alterar sua função, regulando a excitabilidade neuronal, podendo se adaptar em resposta ao aumento ou diminuição de sua atividade, garantindo a eficiência da neurotransmissão. Os fenômenos de plasticidade sináptica são classificados de acordo com sua duração, e também quanto ao tipo de efeito, podendo alterar elementos pré ou pós-sinápticos que podem aumentar ou diminuir a liberação ou resposta pós-sináptica ao neurotransmissor. (Katz e Miledi, 1968b; Van der Kloot e Molgo, 1994; David e Barrett, 2003; Kalkstein e Magleby, 2004).

Dos fenômenos de plasticidade sináptica a curto prazo, a facilitação é um processo onde ocorre aumento da liberação do neurotransmissor que permanece por um período muito curto de duração (milissegundos). Quando ocorre aumento na frequência de estimulação, o segundo potencial de placa evocado (EPP) é maior que o primeiro, e dizemos então que o EPP aumentado foi facilitado. Uma das hipóteses para explicar este fenômeno é a do cálcio residual: o Ca^{2+} que entrou no primeiro estímulo nervoso e não teve tempo suficiente para sair totalmente do citosol se soma à quantidade de Ca^{2+} que entra proveniente do segundo estímulo, e aumenta o segundo EPP (Katz e Miledi, 1968b; Rahamimoff, 1968; Bain e Quastel, 1992). A

aumentação e a potenciação pós-tetânica também são processos onde ocorrem aumento da liberação do neurotransmissor. Aumentação persiste em um período curto de tempo (segundos) enquanto que a potenciação pós tetânica pode persistir por um longo período de tempo (minutos). Aumentação e potencialização pós-tetânica possuem características muito semelhantes, ambas surgem após um estímulo tetânico prolongado e são dependentes do aumento da concentração de Ca^{2+} do interior do terminal pré-sináptico (Magleby e Zengel, 1976). A diferença entre os dois tipos de fenômeno é que a aumentação retorna aos níveis normais em um intervalo menor de tempo (segundos), enquanto que a potenciação pós-tetânica persiste por mais tempo (Magleby e Zengel, 1976; Van der Kloot e Molgo, 1994). Aumentação e potenciação pós-tetânica podem ser vistas pelo aumento na amplitude dos EPP após o estímulo tetânico, sendo que a potenciação também pode ser vista através do aumento na frequência dos MEPPs após estímulo tetânico (Magleby e Zengel, 1976; Yamashita e Oota, 1987; David e Barrett, 2003). A depressão é o processo onde ocorre a diminuição da liberação do neurotransmissor. Isto ocorre quando a frequência de estimulação permanece aumentada por um longo período de tempo. A depressão pode ser vista com a diminuição da amplitude dos EPPs durante estimulação tetânica, podendo chegar em um platô se a estimulação perdurar por um longo período de tempo. Este fenômeno ocorre devido a diminuição do tempo de preenchimento vesicular, ou seja, ao aumentar a frequência de estimulação, as vesículas sinápticas não têm tempo suficiente para serem preenchidas com o neurotransmissor, sendo logo ancoradas e recrutadas nas zonas ativas (Dittman e Regehr, 1998; Wu e Betz, 1998; Kalkstein e Magleby, 2004).

Dos fenômenos de plasticidade sináptica a longo prazo, a potenciação de longa duração (LTP) é induzida quando ocorre um aumento da frequência de estimulação persistente (trains de 20-100 estímulos de 100-200Hz), gerando aumento na força sináptica. O aumento da concentração de Ca^{2+} pós-sináptico está relacionado a ativação dos mecanismos que induzem a LTP (Hölscher *et al*, 1997; NicolL, 2017; Mcleod *et al*, 2018). A depressão de longa duração (LTD) é induzida quando ocorre baixa frequência de estimulação persistente (1-5 Hz, 10-15 minutos). A ativação dos mecanismos que induzem a LTD está relacionada a um aumento de Ca^{2+} pós-sináptico abaixo dos níveis necessários para induzir a LTP, resultando na diminuindo da força sináptica. A longo prazo pode levar a silenciação sináptica (Stanton, 1996).

A LTP e LTD são fenômenos de plasticidade sináptica que desempenham importante papel em mecanismos relacionados ao aprendizado e memória (Stanton, 1996; Bliss e Cooke, 2011; Pinar *et al*, 2017).

Contudo, os fenômenos relacionados a plasticidade sináptica podem gerar uma poderosa força desestabilizadora na atividade sináptica, o que a longo prazo pode prejudicar seu funcionamento. Entretanto, existem mecanismos compensatórios complexos capazes de estabilizar a atividade sináptica perante a fenômenos que podem aumentar ou diminuir a força sináptica. Esses mecanismos são chamados de plasticidade sináptica homeostática (Daniels *et al*, 2004; Turrigiano, 2012).

1.8 Plasticidade sináptica homeostática

Os neurônios possuem a capacidade de manutenção das taxas de disparo de potenciais de ação em certos limites, garantindo a homeostasia da transmissão sináptica. Esta regulação é chamada plasticidade sináptica homeostática (Turrigiano, 2012; Davis e Muller, 2015). Entretanto, se a plasticidade resultar em disfunção, ela é considerada patológica (Burgess *et al*, 2014; Casas *et al*, 2015; Khedraki *et al*, 2017)

A plasticidade sináptica homeostática pode envolver uma série de mecanismos distintos, como mudanças na excitabilidade celular (*upregulation* ou *downregulation*), alterações no preenchimento vesicular, alterações no número de receptores pós-sinápticos e alterações no número de vesículas liberadas (CQ) (Snider e Harris, 1979; Turrigiano, 2012; Wang *et al*, 2018). Uma forma de plasticidade sináptica homeostática em sinapses excitatórias no sistema nervo central já bem definida é a *Synaptic Scaling*. A *Synaptic Scaling* foi primeiramente identificada em culturas de neurônios neocorticais glutamatérgicos, onde foi observado que alterações na atividade neuronal geraram mudanças compensatórias que foram capazes de restaurar as taxas de disparos sinápticos para valores basais (Turrigiano *et al*, 1998). Este fenômeno é capaz de induzir alterações bidirecionais, aumentando ou diminuindo a força sináptica (Turrigiano *et al*. 1998; Gainey *et al*. 2009). O mecanismo de ativação da *Synaptic Scaling* é dependente de alterações no influxo de Ca^{2+} sináptico que ativam vias que podem levar ao aumento ou diminuição dos receptores pós-sinápticos (Wierenga *et al*. 2005; Goold e Nicoll 2010).

Recentemente, foi mostrado que a plasticidade sináptica homeostática pode ter um controle bi-direcional da eficiência sináptica na JNM. Além da potenciação homeostática pré-sináptica (PHP), uma depressão homeostática pré-sináptica (DHP) também foi demonstrada na JNM de drosófila (Snider e Harris, 1979; Daniels *et al*, 2004; Gaviño *et al*, 2015; Li *et al*, 2018).

Na PHP, foi mostrado que manipulações farmacológicas agudas ou manipulações genéticas crônicas que diminuem a função do AChR podem ativar o sistema de sinalização que geram aumentos compensatórios na liberação do neurotransmissor, restaurando a homeostasia sináptica. Um dos primeiros dados na literatura que reportou este mecanismo na JNM foi a demonstração da super-sensibilidade à acetilcolina e carbacol induzida por desnervação. (Axelsson e Thesleff, 1959). A desnervação gera alterações na fibra muscular. Algumas dessas alterações foram consideradas respostas homeostáticas capazes de restaurar a função sináptica como o aumento da excitabilidade muscular e contrações musculares espontâneas causadas pelo aumento da resistência de entrada e aumento do número de AChR extrajuncionais (Axelsson e Thesleff, 1959; Berg e Hall, 1975; Turrigiano e Nelson, 2004). Posteriormente, Snider e Harris (1979), através do bloqueio da atividade sináptica na JNM utilizando tratamento crônico com TTX, mostraram um aumento no preenchimento vesicular (amplitude dos quanta) e aumento no CQ. Posteriormente foi mostrado que o aumento do conteúdo quântico induzido por diminuição da ativação dos receptores pós-sinápticos está relacionado à mudança conformacional do receptor nicotínico após seu bloqueio parcial. Esta mudança conformacional iniciaria um processo de sinalização retrógrada do receptor que alteraria o recrutamento de vesículas no RRP (Valbuena e Lerma, 2016; Wang *et al*, 2016, 2018). Em drosófila, a sinalização retrógrada ativada pela mudança conformacional dos receptores de glutamato pós-sinápticos na JNM, agem na membrana do terminal pré-sináptico modificando a proteína citoesquelética actina, aumentando a inserção de canais de sódio (DegENaC) e aumentando a entrada de Ca^{2+} através dos canais Cav 2.1. (Rich e Wenner, 2007; Turrigiano, 2012; Davis e Muller, 2015; Wang *et al*, 2018).

Na DHP ocorre o inverso que a PHD. Foi mostrado que manipulações genéticas crônicas que produzem excesso de liberação de neurotransmissores podem ativar o sistema de sinalização que geram diminuições compensatórias na liberação do neurotransmissor, restaurando a homeostasia sináptica. As primeiras evidências da

PHD surgiram em trabalhos que buscavam estudar mutações em genes de endocitose vesicular em drosófila (Verstreken *et al*, 2002; Marie *et al*, 2004). Nestas mutações, o aumento do tamanho dos quanta levou à diminuição do CQ (Dickman *et al*, 2005; Chen *et al*, 2014). Entretanto, o trabalho que caracterizou a PHD foi realizado por Daniels *et al* (2004), utilizando um modelo que apresentava superexpressão do transportador vesicular de glutamato (VGlut; VGlut OE) em JNM de Drosófila. Tal mutação genética apresentou aumento no tamanho dos quanta, diminuição do QC e as amplitudes dos EPSP não apresentaram alterações. Foi mostrado que a DHP ocorre independentemente do estado dos receptores pós-sinápticos. Isto sugere que a sinalização que regula a homeostasia da liberação do neurotransmissor apresentado por esta plasticidade pode acontecer através de uma sinalização autócrina do terminal pré-sináptico (Li *et al*, 2018). Entretanto, os mecanismos que controlam a DHP ainda permanecem desconhecidos.

1.9 Consequências do envelhecimento na junção neuromuscular

O envelhecimento é um processo natural de todo organismo vivo, alterações orgânicas e funcionais ocorrem inevitavelmente com o passar do tempo. Em mamíferos, a musculatura torna-se fraca ao longo dos anos (Willadt *et al*, 2016). Diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de averiguar se alterações estruturais ou funcionais musculares devido ao envelhecimento podem trazer algum impacto na eficiência da neurotransmissão ou se alterações na estrutura ou funcionamento da neurotransmissão podem trazer algum impacto na estrutura ou funcionamento muscular. As alterações reportadas na literatura podem variar de acordo com a espécie, gênero, musculatura individual, critérios de exclusão de animais doentes e até mesmo na idade em que um animal é considerado adulto para ser usado como controle de amostragem. Alguns trabalhos consideram animais adultos a partir de 3 meses de idade, enquanto outros trabalhos consideram como adultos animais com 12 meses de idade (Anis e Robbins, 1987).

Em alguns trabalhos onde foram avaliadas as alterações sinápticas decorrentes do envelhecimento em JNM de ratos, foi reportado aumento na depressão sináptica, grande tendência a falhas na propagação do potencial de ação, redução no potencial de repouso muscular, aumento no número de vesículas por terminal nervoso, aumento na amplitude dos MEPPs, aumento na quantidade de ACh liberada durante

estimulação nervosa e aumento na frequência de liberação vesicular. Estas alterações nas capacidades de sustentabilidade da transmissão sináptica apresentadas por ratos idosos, foram associadas a um aumento no número de terminais nervosos por placa motora (Banker *et al*, 1983; Smith, 1984; Kelly e Robbins, 1987).

Entretanto, outros trabalhos utilizando a JNM de camundongos idosos, observaram aumento apenas na amplitude dos MEPPs e no CQ. As alterações encontradas na liberação do neurotransmissor foram associadas a um aumento na densidade ou estrutura das zonas ativas, aumento na corrente de cálcio e aumento no número de terminais nervosos por placa motora (Anis e Robbins, 1987; Willadt *et al*, 2016).

O CQ foi um dos parâmetros avaliados em espécies animais diferentes que apresentou alterações semelhantes. A JNM de ratos, camundongos e rã idosos apresentaram aumento no conteúdo quântico (Smith, 1984; Anis e Robbins, 1987).

Por mais que as alterações observadas em animais idosos variem dependendo da espécie, gênero e músculos individuais, todos os mecanismos envolvidos buscam de alguma forma manter a homeostasia da JNM garantindo a eficiência da neurotransmissão sináptica ao longo do processo de envelhecimento natural.

1.10 VAcHT

O transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) é responsável por transportar a ACh livre no citoplasma do terminal pré-sináptico para dentro das vesículas sinápticas. O VAcHT é uma proteína contendo 12 domínios transmembrana com massa de 75 KDa (Varoqui e Erickson, 1996; Kitamoto *et al*, 1998). O transporte é inteiramente dependente do gradiente eletroquímico, trocando dois prótons por uma molécula de ACh (Erickson *et al*, 1994; Nguyen *et al*, 1998). A quantidade de prótons, por sua vez, depende da atividade de uma bomba para H⁺, do tipo V-ATPase, também localizada na membrana da vesícula.

Estudos anteriores mostram que o bloqueio da ação do VAcHT usando vesamicol resulta na diminuição do preenchimento vesicular (Yu e Van der Kloot, 1991; Naves e Van der Kloot, 2001; Van der Kloot, 2003). Sendo assim, variações no seu funcionamento podem alterar a neurotransmissão colinérgica espontânea ou evocada por estímulo nervoso (Searl *et al*, 1991; Lima *et al*, 2010; Satoshi *et al*, 2016).

Com os avanços tecnológicos, a utilização de modelos animais geneticamente modificados vem se tornando uma ferramenta muito útil no estudo da neurotransmissão colinérgica. Alterações na expressão do VACHT podem trazer severas alterações no desenvolvimento e eficiência da neurotransmissão colinérgica. Camundongos KO VACHT, que não expressam a proteína transportadora vesicular, apresentam reciclagem vesicular normal, mas morrem minutos após o nascimento (De Castro *et al*, 2009). Camundongos KD VACHT, que apresentam cerca de 70% de redução na expressão da proteína VACHT chegam à fase adulta, mas apresentam disfunções cardíacas, alterações cognitivas, diminuição da performance motora, deficiência na força de contração muscular, diminuição no preenchimento e probabilidade de liberação vesicular (Prado *et al*, 2006; De Castro *et al*, 2009; Lara *et al*, 2010; Lima *et al*; 2010). Outra linhagem também utilizada que apresenta aumento no VACHT é o ChAT(BAC)-eGFP (Talline, 2006, Nagy e Aubert, 2012).

A linhagem de camundongos ChAT-ChR2-EYFP, que será denominado nesse trabalho “Hyper VACHT” mostrou ser uma ferramenta muito útil para estudar a função do VACHT e as consequências do aumento da liberação de ACh. A princípio o modelo animal transgênico foi criado no intuito de utilizar a optogenética para estudar a transmissão sináptica colinérgica do SNC que naturalmente não apresentasse nenhum tipo de alteração funcional ou estrutural. A especificidade colinérgica apresentada por esses animais é garantida pelo cromossomo bacteriano artificial (BAC) modificado para expressar o gene do canal de rodopsina 2 (ChR2) sob controle do promotor da colina acetiltransferase (ChAT). Os neurônios colinérgicos desses camundongos transgênicos apresentaram uma fluorescência e disparavam potenciais de ação ao utilizar o comprimento de onda adequado (460 a 490 nm). Entretanto, o gene do VACHT estava presente entre o primeiro e segundo exon dentro do primeiro intron do promotor ChAT. Com isto, foi observado aumento na expressão do VACHT, aumento do número de cópias do VACHT, aumento na liberação de ACh no SNC e periférico, déficit de memória, atenção, aprendizado, envelhecimento precoce da JNM e aumento na resistência muscular em teste de esteira (Kolisnyk *et al*, 2013; Satoshi *et al*, 2016).

2. Justificativa

Trabalhos anteriores mostraram que o aumento da expressão do transportador vesicular de glutamato na junção neuromuscular de *Drosófila* induz um aumento na liberação de glutamato por vesícula e diminuição no conteúdo quântico, diminuindo o número de vesículas liberadas por estímulo nervoso (Daniels *et al*, 2004). Este mecanismo plástico compensatório capaz de reestabelecer a homeostasia sináptica é chamado de depressão homeostática pré-sináptica (DHP) (Gaviño *et al*, 2015; Li *et al*, 2018).

Recentemente, foi observado que a linhagem de camundongos ChAT-ChR2-EYFP criado por Zhao *et al* (2011) possuem um aumento na liberação de ACh na JNM devido ao aumento dos níveis de expressão de VACHT (Satoshi *et al*, 2013). Esta linhagem de camundongos, é, portanto, uma ferramenta muito útil para estudar a DHP na sinapse periférica colinérgica, pois apresenta o mesmo tipo de modificação do modelo experimental utilizado por Daniels *et al* (2004). Este tipo de plasticidade homeostática ainda não foi reportada em mamíferos e muitas questões relacionadas a este fenômeno permanecem desconhecidas.

3. Objetivos

Neste trabalho, testamos a hipótese de que o aumento crônico da liberação de acetilcolina (ACh) por vesícula na junção neuromuscular de camundongos (JNM) pode acionar a DHP e resultar em uma diminuição compensatória na liberação vesicular evocada. Portanto, nosso objetivo foi investigar a DHP em camundongos Hyper VACHT jovens e idosos geneticamente modificados que possuem aumento na liberação de ACh por vesícula.

Como objetivos específicos, avaliamos a liberação quântica basal e evocada, CQ, facilitação, depressão sináptica e potenciação após estimulação tetânica na JNM de camundongos Hyper VACHT adultos e idosos. Para tal, utilizamos métodos eletrofisiológicos de registro de potenciais de placa em miniatura (MEPPs), correntes de placa em miniatura (MEPCs) e potenciais de placa evocados (EPP) em baixa e alta frequência de estimulação.

4. Estratégia experimental, materiais e métodos

4.1 Animais

Foram utilizados 4 camundongos WT (selvagens) e 4 camundongos ChAT-ChR2-EYFP (Hyper VACHT) com idade de 3 meses (jovens) e 5 camundongos WT e 3 camundongos Hyper VACHT com idade de 24 meses (idosos), todos de sexo masculino. Os animais foram mantidos em micro isoladores sob ar filtrado, temperatura 23° e ciclo de vigília claro escuro de 12h/12h, fornecidos pelo Biotério de Criação de Camundongos do DFIB-ICB – UFMG e mantido no Biotério de Camundongos do DFIB - ICB - UFMG. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFMG (protocolo número 76/2015).

4.2 Solução, fármacos e reagentes

Todos os fármacos e sais foram obtidos da companhia Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

4.3 Soluções e preparação do músculo para registro

Foi utilizada uma solução fisiológica Tyrode, preparada com água milli-Q para os experimentos eletrofisiológicos, contendo a seguinte composição (em mM): NaCl (134), KCl (5), CaCl₂ (2), MgCl₂ (1), NaHCO₃ (11), NaH₂PO₄ (1), D-Glicose (11), equilibrada com mistura de gás carbogênio (5% CO₂, 95% O₂) e pH ajustado em 7.4 utilizando NaOH. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Após eutanásia, as regiões torácica e abdominal foram abertas cirurgicamente para retirada do diafragma mantendo um segmento do nervo frênico intacto. Em seguida, o diafragma foi dividido ao meio (hemidiafragma), não havendo preferência para o lado a ser usado. O hemidiafragma foi fixado com pequenos alfinetes em uma câmara de 5 mL fabricado de acrílico com um leito de Sylgard no fundo. A solução Tyrode foi trocada continuamente em velocidade de 1-2 mL/min usando um sistema de perfusão por gravidade ou movido por uma bomba peristáltica.

Para evitar contrações musculares durante estímulo do nervo nos registros de Current Clamp, foi utilizada a técnica de fibras cortadas, onde eram realizados micro cortes nas fibras musculares, gerando despolarização do potencial de repouso das

células musculares que inativam os canais de Na⁺ sensíveis a voltagem causando paralisia muscular (BARSTAD AND LILLEHEIL 1968). Para inibir o surgimento de potenciais de ação muscular durante os registros de Voltage Clamp, foi utilizado tetrodotoxina (TTX), fármaco que age bloqueando os canais de Na⁺ sensíveis a voltagem (Katz e Miledi, 1968a, 1967b).

4.4 Sistema de registro

O sistema de registro continha os seguintes equipamentos:

- Osciloscópio Tektronix (TSD 1001B)
- Um par de Micromanipuladores da marca Industrial Science Associates
- Microscópio Jenco Trinocular
- Amplificador Axoclamp com condicionador de sinais Cyberamp
- Conversor Analógico/DIGITAL National Instruments PCI-6023
- Microcomputador com o Software Strathclyde Electrophysiological Software (gentilmente concedido pelo John Dempster, University of Strathclyde)
- Câmara de acrílico contendo Sylgard 184 em sua base
- Microeletrodos de registro confeccionados em vidro capilar de borosilicato (World Precision Instruments modelo 1B150 F)
- Narishire Puller PN-30
- Câmera Samsung Scb-2000
- Estimulador GRASS (SD9)

A preparação neuromuscular foi montada sobre uma mesa antivibratória (TMC), contendo um suporte para fixar a câmara de acrílico com o tecido, eletrodo de registro, eletrodo de estimulação, micromanipuladores e microscópio.

4.5 Eletrofisiologia: Current Clamp

Através de microeletrodos de registro foi possível registrar a diferença do potencial transmembrana (potencial de repouso) e os potenciais de placa

espontâneos e evocados (MEPPs e EPPs). Os sinais obtidos foram enviados ao amplificador I, configurado para amplificar os sinais em 10x, e em seguida para o amplificador II, configurado para amplificar entre 200-1000x o sinal, dependendo da situação experimental. No amplificador II, foi utilizada duas saídas: A) para o osciloscópio para visualização dos sinais, B) para o conversor analógico digital. Ao serem convertidos, os sinais digitalizados foram registrados pelo programa WinWCP ou WinEDR (Strathclyde Electrophysiology Software, cortesia de John Dempster, University of Strathclyde). Os dados foram filtrados na faixa de 0.1 – 1000 Hz. A amostragem foi de 20 KHz (figura1).

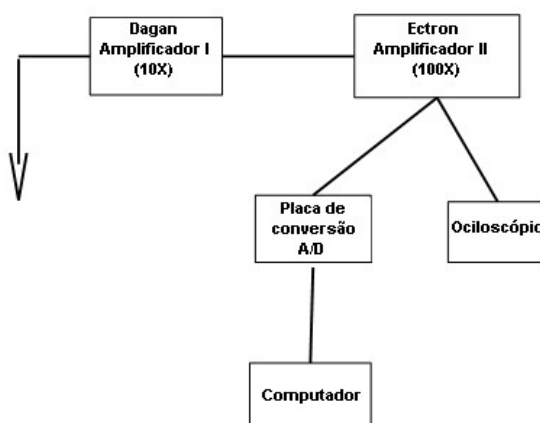


Figura 1 – Fluxo de sinais utilizado para registrar potenciais sinápticos. A. Modo *Current Clamp*

4.6 Registros eletrofisiológicos dos potenciais de placa em miniatura (EPPs)

Utilizamos o modo de *Current Clamp* para medir os potenciais de membranas na região da JNM, como descrito acima. O nervo frênico foi succionado por um microelétrodo conectado a um estimulador e estimulado 3x acima do limiar de excitação do músculo para garantir o recrutamento de uma maior quantidade de fibras nervosas. O protocolo de estimulação foram 300 segundos de estímulo em 0.2 ou 0.3 Hz, seguida por 60 segundos a 20 ou 30 Hz, retornando novamente para 0.2 ou 0.3 Hz após estímulo tetânico durante 300 segundos. Foram utilizadas frequências de estimulação diferente nos camundongos idosos para induzir o mesmo nível de depressão sináptica. As amplitudes dos EPPs foram corrigidas para um potencial de repouso padrão de -36 mV. Os EPPs obtidos também foram corrigidos para o efeito

de somação não linear (Mclachlan e Martin, 1981) (Figura 2C e D). De cada animal, registramos em 5 sinapses diferentes. Nos experimentos com animais de 3 meses de idade, utilizamos 4 animais WT e 4 animais Hyper VACHT. Nos experimentos com animais de 24 meses de idade, utilizamos 5 animais WT e 3 animais Hyper VACHT.

4.7 Registros Eletrofisiológicos dos potenciais de placa evocados (MEPPs)

Durante os intervalos entre os EPPs, também foi possível registrar os MEPPs. De cada uma de 5 junções diferentes, analisamos cerca de 100 MEPPs antes, durante e após estímulo tetânico. Foram avaliados a amplitude, área, tempo de descida e frequência dos MEPPs. As amplitudes dos MEPPs foram corrigidas pelo método descrito por Mclachlan (1981) utilizando o potencial de repouso padrão de -36 mV (Figura 2A e B).

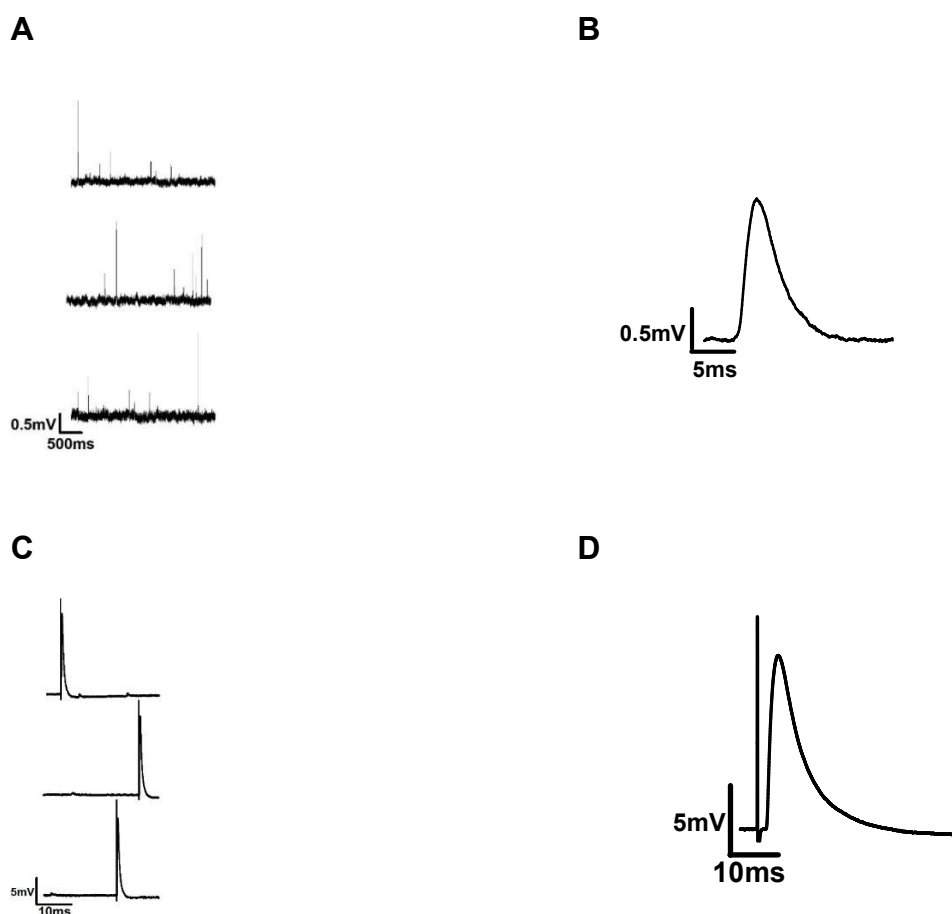


Figura 2 – Registro representativo da liberação quântica espontânea e evocada na junção neuromuscular. A. Potenciais de placa motora em miniatura (MEPP). B. Média de 10 MEPPs. C. Potenciais de placa motora (EPP, do inglês *End Plate Potential*) evocados por estímulo do nervo. D. Média de 10 EPPs.

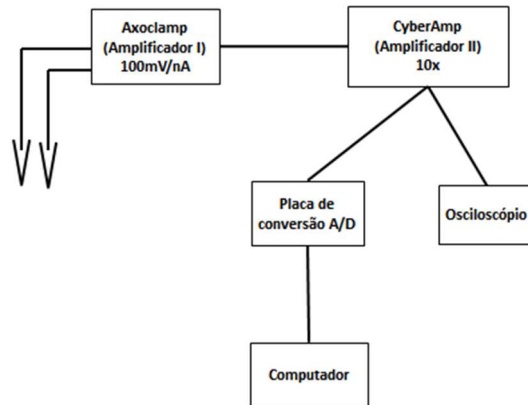


Figura 3 – Fluxo de sinais utilizado para registrar correntes sinápticas. Correntes sinápticas no modo *Voltage Clamp*.

4.8 Eletrofisiologia: Voltage Clamp

Para a utilização do modo Voltage Clamp, é necessário inserir dois microelétrodos na mesma fibra muscular. Nesta configuração, um dos microelétrodos mede o potencial de membrana e o outro injeta corrente para manter o potencial de membrana no valor fixado. As correntes de placa motora em miniatura (MEPCs) foram amplificadas pelo amplificador II, configurado para amplificar os sinais de 100-500x. Foram utilizadas duas saídas do amplificador II: A) para o osciloscópio permitindo visualização dos sinais. B) para o conversor analógico digital gerenciado pelo programa WinEDR (Figura 3).

4.9 Registros eletrofisiológicos das correntes de placa em miniatura (MEPCs)

Registramos cerca de 100 MEPCs em cinco junções diferentes em 5 camundongos WT e 4 camundongos Hyper VACHT de 3 meses de idade. Foram avaliados a amplitude e frequência das MEPCs (Figura 4A e B).

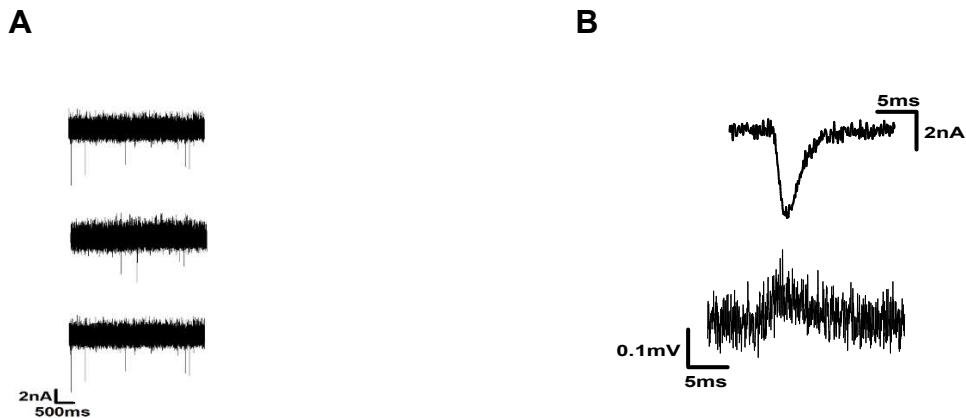


Figura 4 – Correntes de placa motora em miniatura (MEPC) na junção neuromuscular. A. Registro típico de MEPC. B. Superior: Registro representativo de uma corrente (MEPC). Inferior: escape típico <0.2mV.

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas considerando o animal como unidade de amostra. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA e ou teste t de Student..

5. Resultados

5.1 Medidas de liberação espontânea

5.1.1 Alterações na amplitude dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) em camundongos ChAT-ChR2-EYFP (Hyper VACHT)

Primeiramente, avaliamos se o aumento da expressão do VACHT nos camundongos Hyper VACHT poderia alterar a liberação vesicular espontânea. Para tal, medimos a amplitude dos MEPPs. A figura 5A e B mostra o histograma das amplitudes dos MEPPs nos camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. A figura 5C mostra o gráfico de frequência cumulativa da amplitude de 1496 MEPPs nos camundongos WT e 1666 MEPPs nos camundongos Hyper VACHT de 3 meses. A figura 5D mostra o gráfico de frequência cumulativa da amplitude de 6037 MEPPs nos camundongos WT e 4590 MEPPs nos camundongos Hyper VACHT de 24 meses. Na figura 6, observamos que a média das amplitudes dos MEPPs nos camundongos WT foi de $0.39 \pm 0,04$ mV (média \pm EPM), enquanto que nos camundongos Hyper VACHT a

média das amplitudes foi de $0.76 \pm 0,13$ mV (média \pm EPM) nos camundongos de 3 meses. Observamos que a média das amplitudes dos MEPPs nos camundongos de 24 meses WT e Hyper VAcHT foi de $0,45 \pm 0,11$ mV (média \pm EPM) e $0,5 \pm 0,09$ mV (média \pm EPM). Foram observadas uma diminuição significativa na amplitude dos MEPPs entre os camundongos WT e Hyper VAcHT de 3 meses e também uma diminuição significativa na amplitude dos MEPPs entre os camundongos Hyper VAcHT de 3 e os camundongos Hyper VAcHT de 24 meses (ANOVA, $P < 0.05$). Esses dados sugerem que existe aumento de liberação espontânea de acetilcolina na JNM nos camundongos Hyper VAcHT adultos, isto pode ser devido ao aumento no preenchimento vesicular. Já em camundongos idosos, processos adaptativos podem ter alterado os mecanismos de preenchimento vesicular ou a resposta dos receptores colinérgicos devido ao excesso de ACh liberado ao longo do tempo.

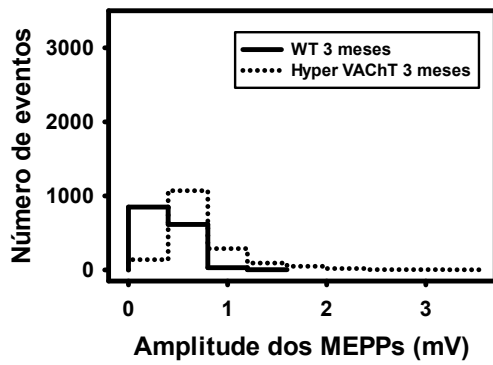
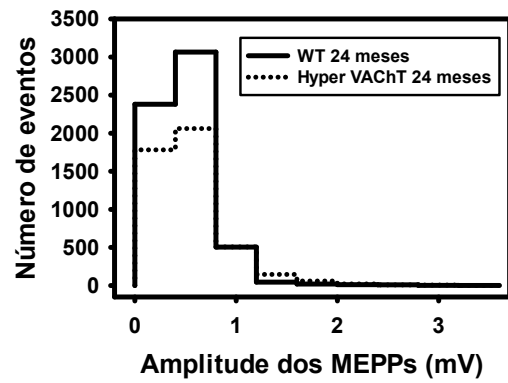
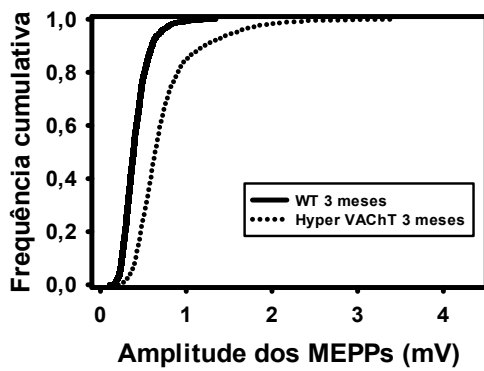
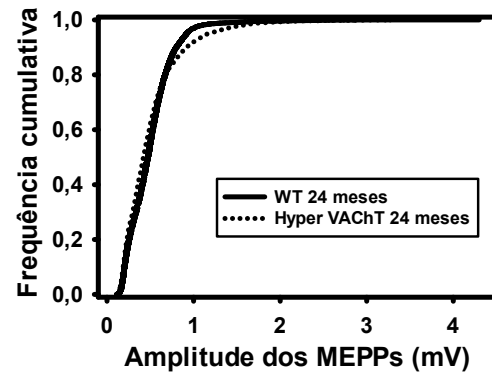
A**B****C****D**

Figura 5 – Alterações na amplitude dos MEPPs nos camundongos Hyper VACHT adultos. A e B. Distribuição das amplitudes de MEPPs registrados em camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. C e D. Mesmo dado de A e B, plotado como função de distribuição cumulativa.

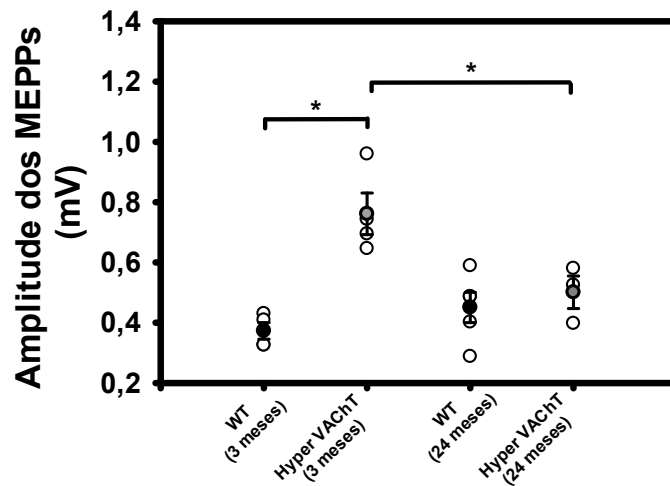


Figura 6 - Média das amplitudes dos MEPPs dos camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM. (ANOVA * $P < 0,05$).

5.1.2 Alterações na frequência dos MEPPs em camundongos Hyper VACHT adultos e idosos

Para avaliar se o aumento da expressão do VACHT além de alterar o preenchimento poderia também alterar a probabilidade de liberação vesicular, um dos parâmetros avaliados foi a frequência de liberação basal dos quanta. Na figura 7, observamos que a média das frequências dos MEPPs nos animais WT foi de $0,45 \pm 0,17$ Hz (média \pm EPM) e $0,4 \pm 0,13$ Hz (média \pm EPM) nos camundongos Hyper VACHT de 3 meses. Observamos que a média das frequências dos MEPPs nos camundongos de 24 meses WT e Hyper VACHT foi de $0,77 \pm 0,19$ Hz (média \pm EPM) e $1,02 \pm 0,16$ Hz (média \pm EPM). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em ambos os grupos (ANOVA, $P > 0,05$). Entretanto foram observados aumentos significantes na frequência entre os camundongos WT de 3 e 26 meses e nos camundongos Hyper VACHT de 3 e 26 meses. Esses dados sugerem que o aumento da expressão do VACHT possa não ter influência no recrutamento vesicular.

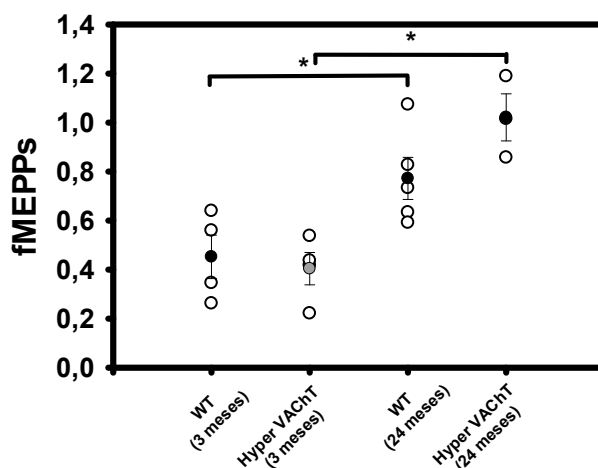


Figura 7 – Frequência dos MEPPs nos camundongos Hyper VACHT adultos e idosos. Média das frequências dos MEPPs nos camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM. (ANOVA * $P < 0,05$).

5.1.3 Mudanças nas correntes de placa em miniatura (MEPCs) pelo aumento da expressão do VACHT

Para investigar a possibilidade das diferenças observadas na amplitude dos MEPPs nos animais Hiper VACHT de 3 meses serem devido a diferenças nas propriedades passivas da membrana, nós medimos as MEPCs utilizando o modo Voltage Clamp, pois nesta técnica, as amplitudes dos eventos em miniatura não dependem destes fatores. A figura 8A, mostra o histograma das amplitudes das MEPCs dos animais WT e Hyper VACHT. A figura 8B, mostra a frequência cumulativa da amplitude de 1925 MEPCs dos animais WT e 1988 MEPCs dos animais Hyper VACHT. Na Figura 8C, observamos que a média das amplitudes das MEPCs nos animais WT foi de $2,3 \pm 0,6$ nA (média \pm EPM) enquanto que nos animais Hyper VACHT a média das amplitudes foi de $4,7 \pm 1,37$ nA (média \pm EPM). Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste t de Student, $P < 0,05$). A figura 8D, mostra que a média da frequência das MEPCs nos animais WT foi de $0,36 \pm 0,18$ Hz (média \pm EPM) e $0,79 \pm 0,23$ Hz (média \pm EPM) nos animais Hyper VACHT. Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste t de Student, $P < 0,05$). Esses dados mostram que o aumento da amplitude das correntes nos animais Hyper VACHT, corroborou com o aumento visto na amplitude dos MEPPs, confirmando que existe um aumento de liberação espontânea de acetilcolina na JNM destes animais e isto pode ser devido aumento no preenchimento vesicular. Já o aumento na frequência das correntes nos

leva a hipótese de que o aumento da expressão do VACHT nestes animais, também pode alterar a probabilidade de liberação vesicular. Este mesmo parâmetro não foi observado ao utilizar o modo Current Clamp, pois mesmo com a relação sinal/ruído estando em proporções aceitáveis para análise, talvez muitos eventos não foram captados por ter pequenas amplitudes que possam estar escondidas dentro do ruído basal. Por outro lado, a técnica de Voltage Clamp possui uma relação sinal/ruído menor que a técnica de Current Clamp possibilitando a captura de eventos com menores amplitudes.

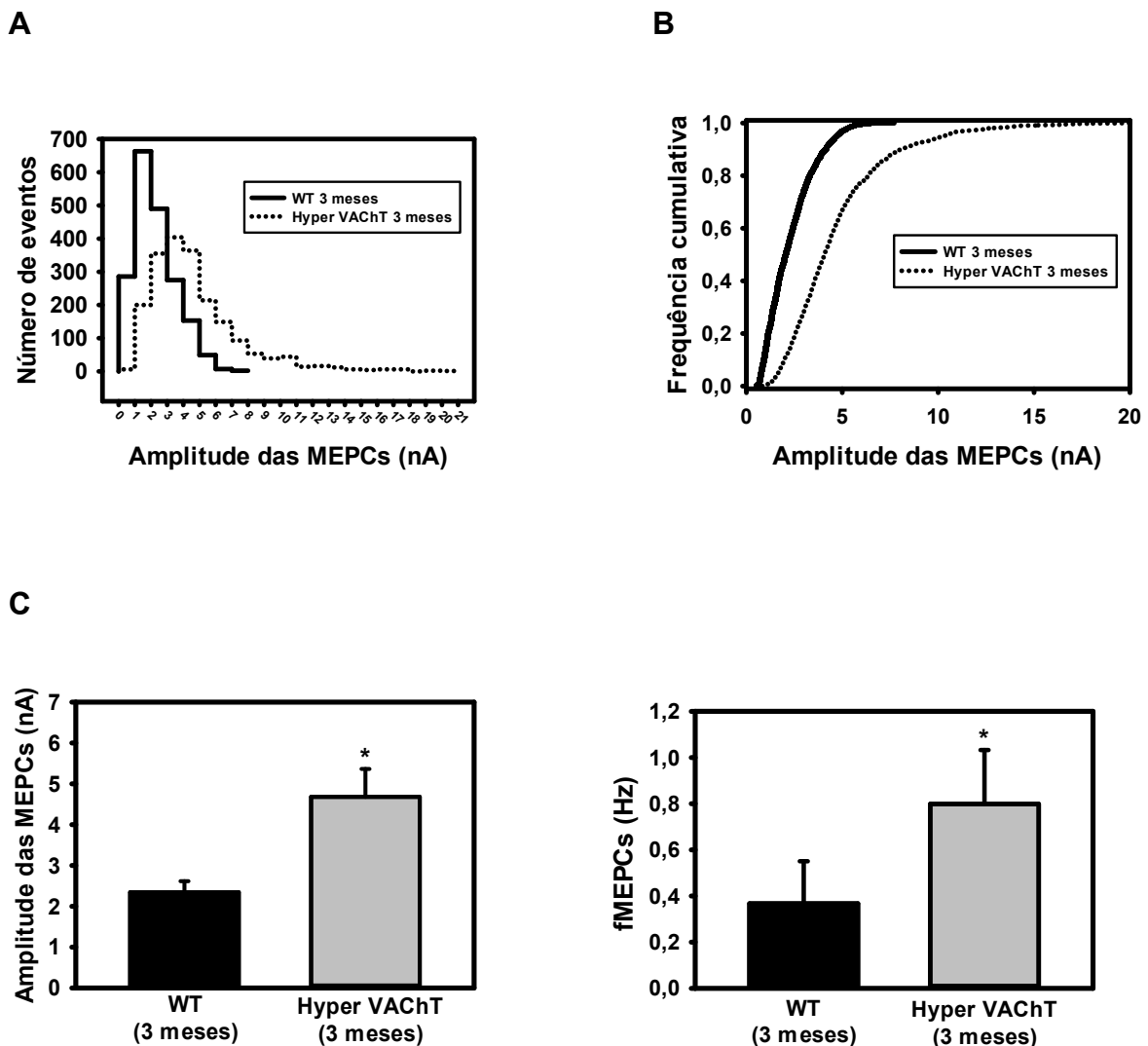


Figura 8– Aumento da amplitude e frequência das MEPCs em animais Hyper VACHT adultos. A. Histograma da amplitude das MEPCs nos animais WT ou Hyper VACHT. B. Mesmo dado de A, plotado como função de distribuição cumulativa. C. Média das amplitudes das MEPCs nos animais WT e Hyper VACHT. D. Média das frequências de liberação das MEPCs em animais WT ou Hyper VACHT. As barras de erro representam as médias \pm EPM. * $P < 0.05$ (Teste t de Student).

5.2. Medidas da liberação evocada em baixa frequência de estimulação

5.2.1 Alterações em potenciais de placa evocados (EPPs) de camundongos Hyper VACHT

Ao observar as diferenças encontradas na liberação vesicular espontânea, medidas nos parâmetros anteriores nos camundongos Hyper VACHT de 3 meses, gostaríamos de saber se a liberação vesicular evocada também poderia também estar alterada neste grupo ou apresentar alguma diferença no grupo dos camundongos de 24 meses que não apresentaram alterações. Avaliamos as diferenças nas amplitudes dos EPPs entre camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. A figura 9A e B, mostra o histograma das amplitudes dos EPPs nos camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. Na figura 9C e D, foi feito o gráfico de frequência cumulativa da amplitude de 1718 EPPs dos camundongos WT e 1656 EPPs dos camundongos Hyper VACHT de 3 meses e 1530 EPPs dos camundongos WT e 940 EPPs dos camundongos Hyper VACHT de 24 meses. Na Figura 10, observamos que a média das amplitudes dos EPPs nos camundongos de 3 meses WT foi 11.51 ± 2.81 mV (média \pm EPM), enquanto que nos animais Hyper VACHT a média das amplitudes foi de 21.84 ± 5.88 mV (média \pm EPM). Nos animais de 24 meses a média das amplitudes dos EPPs nos camundongos WT foi de $20,53 \pm 10,59$ mV (média \pm EPM) e de $11,58 \pm 3,25$ mV (média \pm EPM) nos camundongos Hyper VACHT. Foram observadas diferenças estatística significativa entre os camundongos WT e Hyper VACHT de 3 meses e entre os camundongos Hyper VACHT de 3 e 24 meses (ANOVA, $P < 0.05$).

Esses dados sugerem que sob estímulo uma maior quantidade de neurotransmissores é liberada na JNM em camundongos Hyper VACHT adultos. Isto pode ser o reflexo de uma maior quantidade de ACh por vesícula, que vai de acordo com aumento na amplitude dos MEPPs visto anteriormente ou um maior recrutamento no número de vesicular por estímulo. Nos camundongos Hyper VACHT idosos, um mecanismo compensatório pode ter se desenvolvido ao longo do tempo devido à grande quantidade de ACh liberada por vesículas sinápticas, diminuindo as taxas dos potenciais evocados.

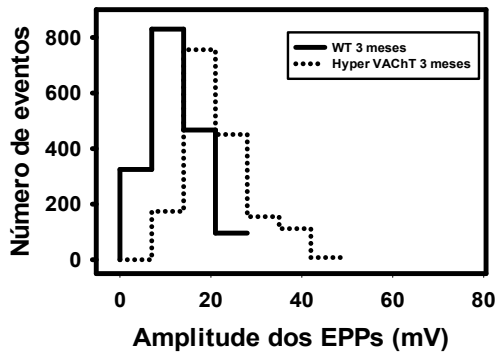
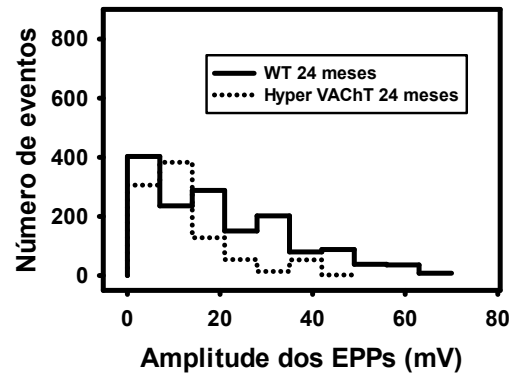
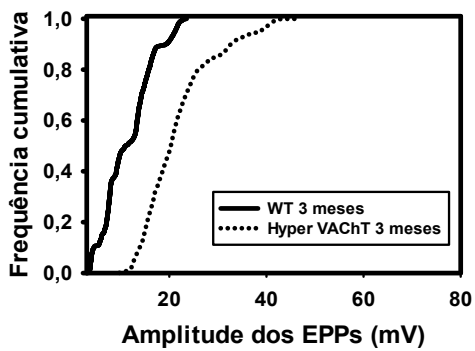
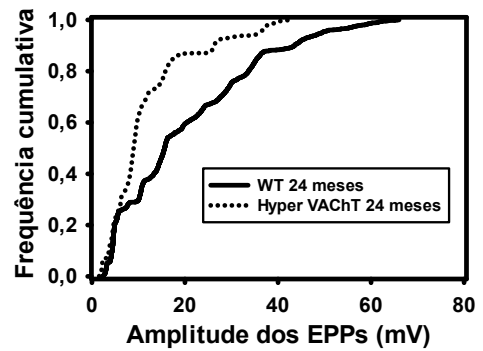
A**B****C****D**

Figura 9 – Alterações na amplitude dos EPPs dos camundongos Hyper VACHT adultos.

A e B. Distribuição das amplitudes de MEPPs registrados em camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. C e D. Mesmo dado de A e B, plotado como função de distribuição cumulativa. E e F

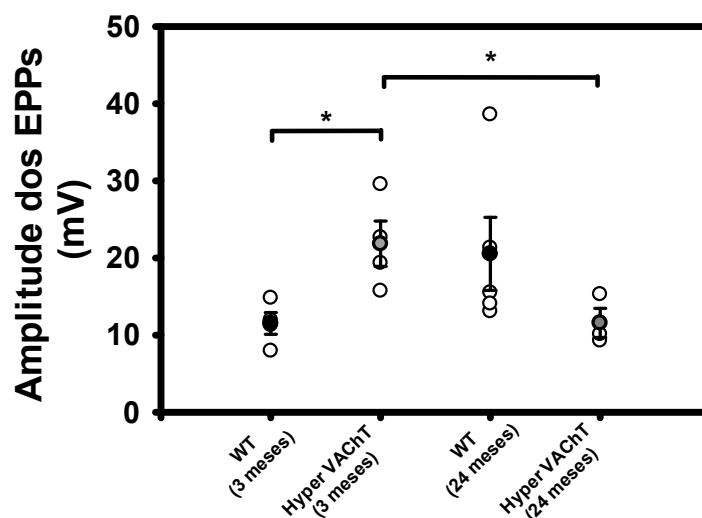


Figura 10 – Aumento da amplitude dos EPPs dos camundongos Hyper VACHT adultos
 Média das amplitudes dos MEPPs dos camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM (ANOVA * $P < 0.05$).

5.3 Conteúdo quântico

5.3.1 Mudanças produzidas no conteúdo quântico dos camundongos Chat-ChR2-EYFP (Hyper VACHT)

Alterações nas amplitudes dos EPPs, podem ocorrer devido ao aumento do preenchimento vesicular ou devido ao aumento no recrutamento do número de vesículas liberadas. Para testar essas hipóteses, nós decidimos medir o conteúdo quântico nos camundongos Hyper VACHT de 3 e 24 meses. O conteúdo quântico reflete o número de quanta liberados por cada EPP e os MEPPs refletem o efeito unitário de cada quantum, e através disto podemos calcular o conteúdo quântico através da razão da amplitude dos EPPs pela amplitude dos MEPPs. Baseado na razão das médias dos EPPs e MEPPs, o conteúdo quântico mostrado na figura 11 foi de $29 \pm 2,2$ quanta por EPP (média \pm EPM) nos camundongos WT e $31 \pm 2,5$ quanta por EPP nos camundongos Hyper VACHT de 3 meses. Essa diferença não foi estatisticamente significativa (ANOVA, $P > 0.05$). Nos camundongos de 24 meses WT a média foi de $41 \pm 6,2$ quanta por EPP (média \pm EPM) e $22 \pm 2,2$ quanta por EPP (média \pm EPM) nos animais HYPER VACHT. Essa diferença foi estatisticamente significativa (ANOVA, $P < 0.07$).

Apesar dos camundongos Hyper VACHT adultos liberarem mais acetilcolina, eles liberam o mesmo número de vesículas por estímulo nervoso. Este dado indica

que a maior quantidade de ACh liberada está associada apenas a um maior preenchimento de ACh por vesícula. Nos camundongos Hyper VAcHT idosos, foi observado uma menor quantidade de vesículas recrutadas por estímulo nervoso. A diminuição do recrutamento vesicular é um forte indicio de que a DHP pode ter se desenvolvido ao longo do tempo, diminuindo o número de vesículas liberadas fazendo com que as taxas dos potenciais evocados permanecessem em valores próximos aos camundongos controle, como foi visto anteriormente na amplitude dos EPPs, mantendo a homeostasia sináptica.

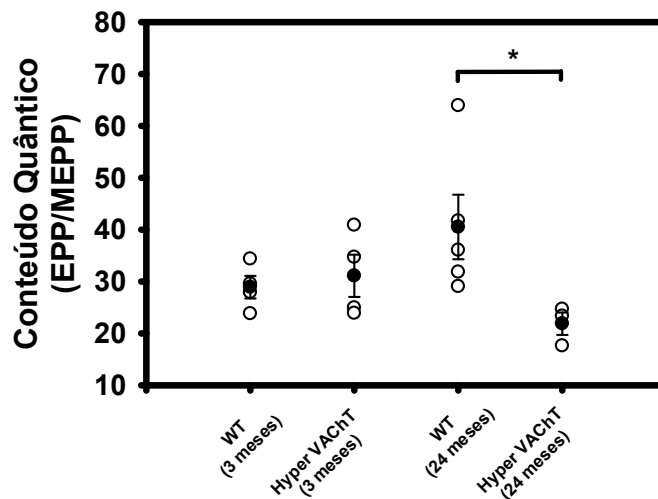


Figura 11 – Diminuição do Conteúdo quântico da junção neuromuscular de camundongos Hyper VAcHT idosos. A e B. Média do conteúdo quântico calculado pelo método direto em camundongos WT e Hyper VAcHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM. * $P < 0.07$ (ANOVA).

5.4 Medidas de plasticidade sináptica a curto prazo

As medidas de plasticidade sináptica a curto prazo refletem a eficiência da JNM em resposta ao aumento ou diminuição da sua atividade. Verificamos então, se a DHP poderia alterar a facilitação, depressão e potenciação pós tetânica em camundongos WT e Hyper VAcHT adultos e idosos. Para avaliar tais fenômenos, nos aplicamos um protocolo de alta frequência de estimulação seguido pela diminuição do estímulo para níveis basais. Os EPPs e MEPPs foram registrados antes, durante e após estimulação tetânica. A figura 12A e B mostra a média da amplitude dos EPPs registrados em registrados em alta (30Hz jovens e 20Hz idosos) e baixa frequência de estimulação (0.3 Hz jovens e 0.2Hz idosos) nos camundongos WT e Hyper VAcHT.

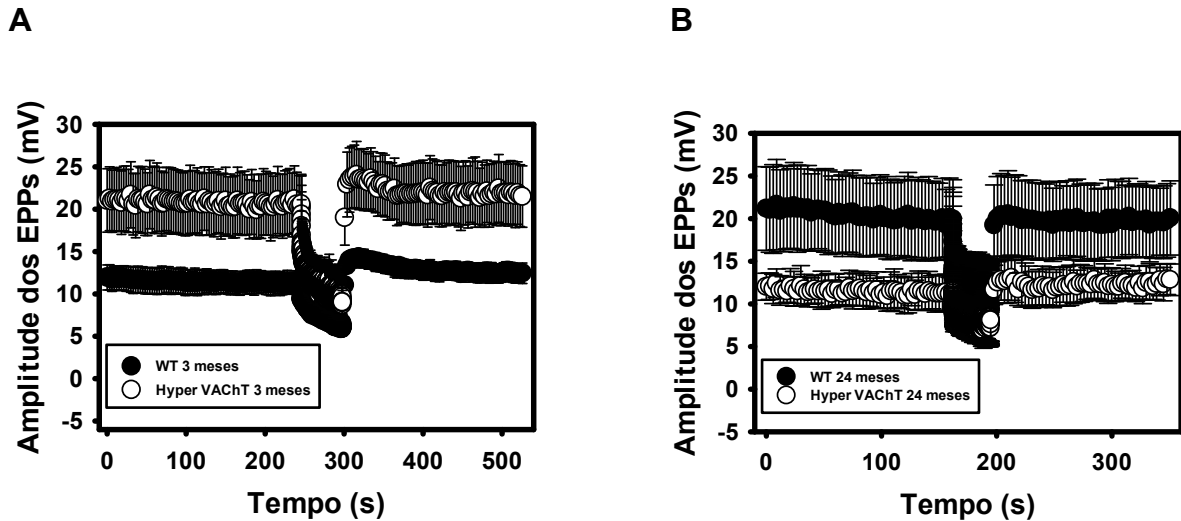


Figura 12 - Alterações na amplitude dos EPPs durante e após estimulação tetânica em camundongos WT e Hyper VAcHT adultos e idosos. A.e B. Medias das amplitudes dos EPPs normalizados na frequência de estimulação a 0.3 Hz, 30Hz e 0.3 Hz. As barras de erro representam as médias \pm EPM.

5.4.1 Facilitação

Primeiramente, avaliamos a facilitação sináptica através do aumento da frequência de estimulação. Quando estímulos são aplicados em um curto intervalo de tempo, o EPP do segundo pulso geralmente é maior que o do primeiro pulso e assim por diante, ou seja, houve uma facilitação no segundo EPP. Esse fenômeno pode ocorrer devido a resquícios da entrada de cálcio do primeiro estímulo que não teve o tempo suficiente para ser tamponado e se somou à entrada de cálcio do segundo estímulo, liberando assim uma maior quantidade de vesículas. A facilitação foi avaliada utilizando a média das amplitudes dos EPPs normalizadas (amplitude normalizada pelo último EPP registrado em baixa frequência de estimulação) pela amplitude do maior EPP (facilitação máxima) durante a estimulação tetânica (20 e 30Hz). A figura 13A mostra que a média da facilitação em camundongos jovens foi de $1,1 \pm 0,02$ nos WT e de $1,02 \pm 0,02$ nos Hyper VAcHT. Na figura 13B, em camundongos idosos, a média da facilitação foi de $1 \pm 0,08$ nos WT e de $1,03 \pm 0,28$ nos Hyper VAcHT. Não observamos diferença estatística significativa na facilitação em ambos os grupos (teste t de Student, $P > 0,05$). Mesmo não observando facilitação nos grupos avaliados, esses dados podem ser um indicativo que a DHP não altera a homeostasia de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico durante estimulação tetânica.

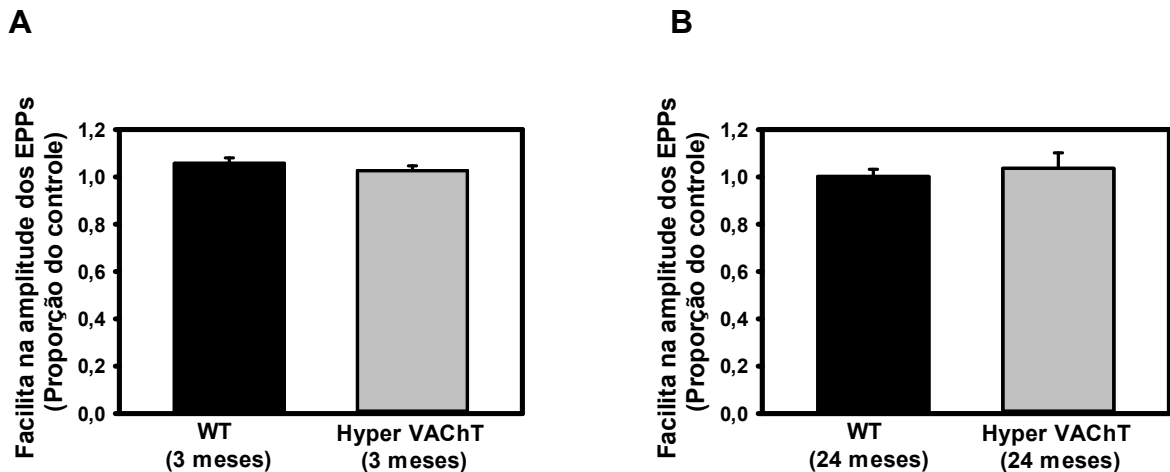


Figura 13 - Facilitação no início da estimulação tetânica em camundongos WT e Hyper VACHT adultos e idosos. A. B. Média da amplitude normalizada dos EPPs, em camundongos jovens e idosos. As barras de erro representam as médias \pm EPM.

5.4.2 Depressão

A diminuição ou aumento da depressão sináptica pode estar associada a alterações na reciclagem vesicular, recrutamento ou quantidade de vesículas disponíveis no terminal pré-sináptico. A depressão foi avaliada pela amplitude dos EPPs registrados durante estimulação tetânica em camundongos WT e Hyper VACHT adultos e idosos. A figura 14A e B, mostram as médias das amplitudes dos EPPs normalizadas (amplitude normalizada pelo último EPP registrado em baixa frequência de estimulação) em camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses durante a estimulação tetânica. A figura 14C mostra que a depressão induzida após 30 segundos de estímulo tetânico nos camundongos de 3 meses WT foi de $29\pm 6\%$ (média \pm EPM) enquanto que nos camundongos Hyper VACHT foi de $50\pm 5\%$ (média \pm EPM). Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste t de Student, $P < 0.05$). Na figura 14D, a depressão induzida nos camundongos de 24 meses WT foi de $34\pm 7\%$ (média \pm EPM) e $28\pm 10\%$ (média \pm EPM) nos Hyper VACHT. Essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste t de Student, $P > 0.05$). Esses dados mostram que houve alteração apenas nos parâmetros de depressão sináptica nos camundongos Hyper VACHT adultos. Essa diminuição pode estar associada a piora da capacidade de reciclagem vesicular, diminuição do número de vesículas no RRP ou dessensibilização dos receptores nicotínicos pós-sinápticos. Em camundongos Hyper VACHT idosos, podemos sugerir que a PHD foi capaz de manter os potenciais

evocados em alta frequência de estimulação em valores semelhantes aos camundongos controle.

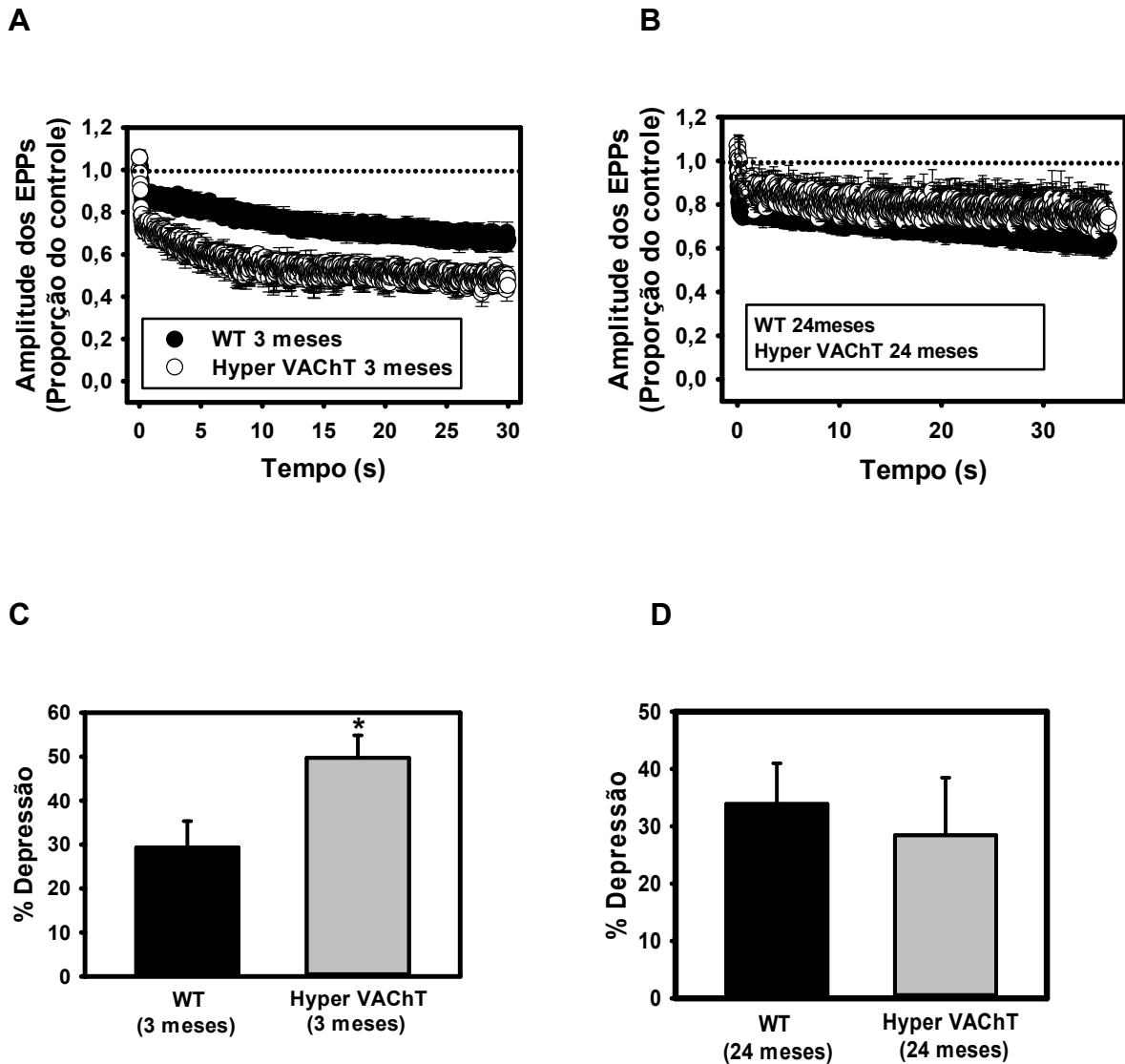


Figura 14 - Diminuição na amplitude dos EPPs durante estimulação tetânica em camundongos Hyper VAcHT adultos. A e B. Médias normalizadas das amplitudes dos EPPs durante a estimulação tetânica nos camundongos WT e Hyper VAcHT de 3 e 24 meses. C e D. Média da extensão da depressão induzida por estimulação tetânica nos camundongos WT ou Hyper VAcHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM. * $P < 0.05$ (Teste t de Student).

9.4.3 Potenciação pós tetânica

A potenciação pós tetânica pode estar associada a manutenção de cálcio do terminal pré-sináptico, podendo influenciar no recrutamento vesicular e na recuperação da depressão causada após estímulo tetânico. A potenciação pós

tetânica foi avaliada pela amplitude dos EPPs e intervalo dos MEPPs registrados após estimulação tetânica. Nas figuras 15A e B mostram as medias das amplitudes dos EPPs normalizados (amplitude normalizada pelo último EPP registrado em baixa frequência de estimulação), após estimulação tetânica em camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (teste t de Student, $P > 0.05$). A figura 15C e D mostram uma outra forma de medida da potenciação pós tetânica através da frequência de liberação dos MEPPs. A média dos intervalos entre os MEPPs antes e após estimulação tetânica foi medida nos camundongos WT e Hyper VACHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM. Foi observada uma diminuição dos intervalos de liberação dos MEPPs em ambos os grupos, indicando que houve potenciação pós tetânica, mas não foi observada diferença significativa entre os grupos (teste t de Student, $P > 0.05$). Esses dados reforçam a hipótese que a PHD não altera a homeostasia de Ca no citosol do terminal pré-sináptico durante estimulação tetânica.

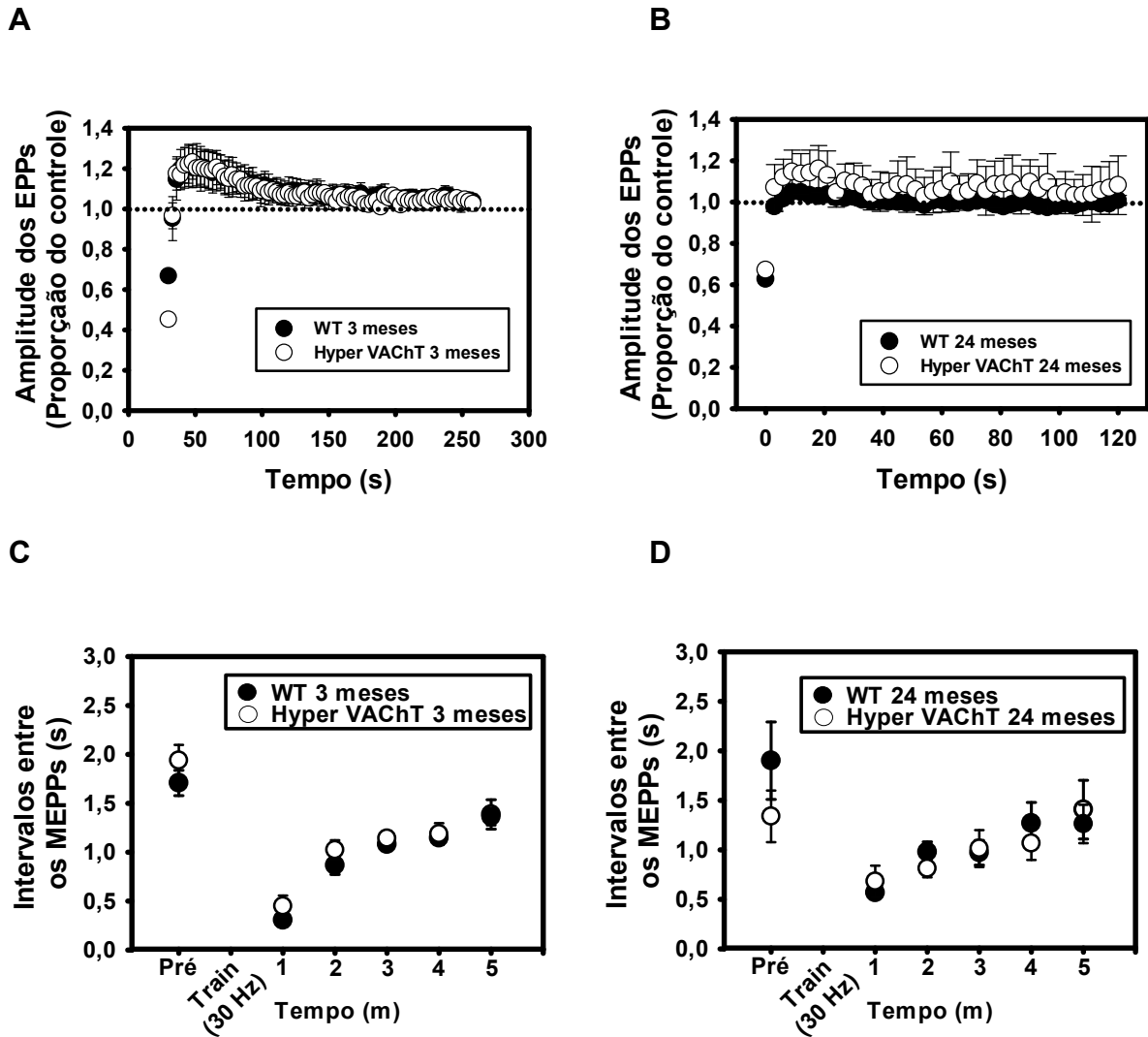


Figura 15 - Alterações na amplitude dos EPPs e intervalo dos MEPPs após estimulação tetânica em camundongos Hyper VACHT adultos e idosos. A e B. Medias normalizadas da amplitude dos EPPs após estimulação tetânica nos camundongos WT ou HyperVACHT de 3 e 24 meses. C e D. Media dos intervalos entre os MEPPs antes e após estimulação tetânica em camundongos WT ou Hyper VACHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM.

5.5 Área, amplitude e tempo de decaimento dos MEPPs durante e após estimulação tetânica

Avaliamos a área, amplitude e tempo de decaimento dos MEPPs registrados antes, durante e após estimulação tetânica no intuito de averiguar se alguma alteração poderia indicar variações no funcionamento dos elementos pré ou pós-sinápticos. Na figura 16A a área dos MEPPs nos camundongos WT adultos foi de $1,83 \pm 0,84$, $0,86 \pm 0,13$ e $1,96 \pm 0,62$ ms (médias \pm EPM) e de $4,18 \pm 1,65$, $1,01 \pm 0,32$ e $2,69 \pm 0,61$ ms

(médias±EPM) nos camundongos Hyper VACHT adultos. Na figura 16B, em camundongos WT idosos a área foi de $1,11\pm0,4$, $0,81\pm0,24$ e $0,84\pm0,27$ ms (médias ± EPM) e de $1,37\pm0,18$, $0,73\pm0,17$ e $0,95\pm0,14$ ms (médias ± EPM) nos camundongos Hyper VACHT idosos. A figura 16C mostra que amplitude dos MEPPs antes, durante e após estimulação tetânica nos camundongos WT adultos foi de $0,4\pm0,1$, $0,39\pm0,02$ e de $0,42\pm0,08$ mV (médias ± EPM), nos camundongos Hyper VACHT adultos foi de $0,76\pm0,22$, $0,61\pm0,13$ e $0,53\pm0,2$ mV (médias ± EPM). Na figura 16D, a amplitude dos camundongos WT idosos foi de $0,5\pm0,05$, $0,46\pm0,06$ e de $0,46\pm0,05$ mV (médias ± EPM), nos camundongos Hyper VACHT idosos foi de $0,53\pm0,15$, $0,49\pm0,17$ e $0,48\pm0,15$ mV (médias ± EPM). A figura 16E mostra que o tempo de decaimento dos MEPPs foi de $3,6\pm0,72$, $1,9\pm0,51$ e $3,37\pm0,72$ ms nos camundongos WT adultos e de $3,8\pm1,75$, $2,14\pm0,58$ e $3,3\pm1,58$ ms nos camundongos Hyper VACHT adultos. A figura 16F mostra que nos WT idosos, o tempo de decaimento foi de $2,3\pm0,5$, $1,9\pm0,43$ e $1,9\pm0,37$ ms e $2,8\pm0,24$, $2,05\pm0,18$ e $2,22\pm0,24$ ms nos camundongos Hyper VACHT idosos (* indica diferença estatística significativa entre os camundongos WT e Hyper VACHT e ** indica diferença estatística significativa em comparação ao parâmetro pré estimulação tetânica no próprio grupo (teste t de Student, $P<0.05$)). A área dos camundongos WT e Hyper VACHT adultos e idosos além de apresentarem uma diferença estatística significativa entre os grupos antes e após estimulação tetânica, que vai de acordo com os resultados observados na amplitude, também mostraram uma diminuição significativa durante a estimulação tetânica. Este efeito foi refletido no tempo de decaimento dos MEPPs e apenas os camundongos WT apresentaram um retorno ao valor basal após estimulação tetânica. Estes dados sugerem que diversos fatores pré e pós-sinápticos podem estar contribuindo para o aumento da depressão sináptica observada nos camundongos Hyper VACHT jovens e idosos.

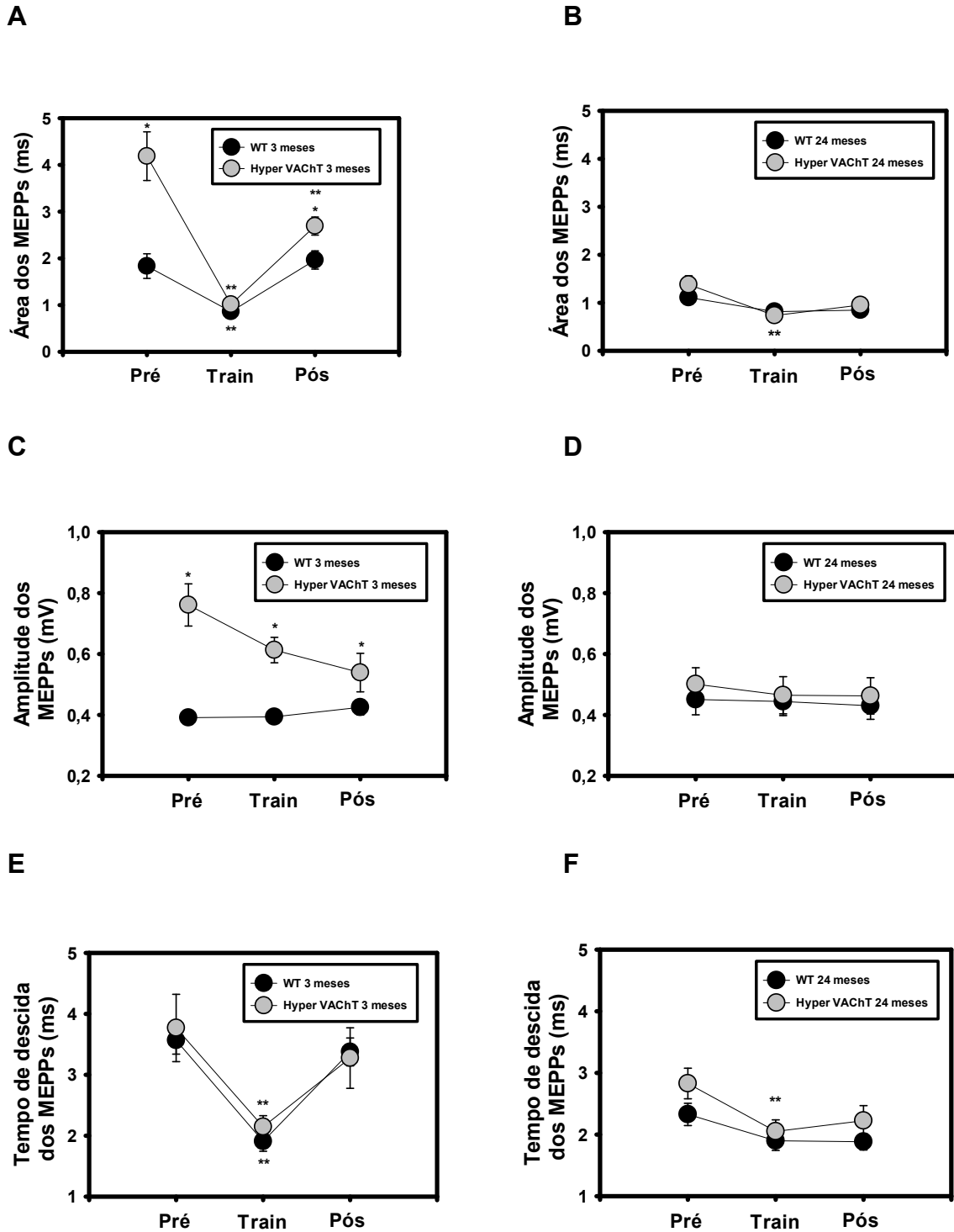


Figura 16 – Alterações na área, amplitude e tempo de decaimento dos MEPPs durante e após estímulo tetânico. A e B. Média das áreas dos MEPPs antes, durante e após estimulação tetânica nos camundongos WT e Hyper VAcHT de 3 e 24 meses. C e D. Média das amplitudes dos MEPPs antes, durante e após estimulação tetânica nos camundongos WT e Hyper VAcHT de 3 e 24 meses. E e F. Média do tempo de decaimento dos MEPPs antes, durante e após estimulação tetânica nos camundongos WT e Hyper VAcHT de 3 e 24 meses. As barras de erro representam as médias \pm EPM (* indica diferença estatística significativa entre os camundongos WT e Hyper VAcHT e ** indica diferença estatística significativa em comparação ao parâmetro pré-estimulação tetânica no próprio grupo (teste t de Student, $P < 0.05$)).

5.6 Alterações na liberação quântica do pool vesicular prontamente liberável (RRP) durante estimulação tetânica em camundongos Hyper VACHT

Para avaliar se a PHD poderia alterar a quantidade de vesículas disponíveis para serem liberadas no terminal pré-sináptico, nós fizemos uma estimativa da quantidade de vesículas do RRP nos camundongos WT e Hyper VACHT idosos. Para estimativa do RRP utilizamos a média da amplitude dos EPPs de cada fibra individual durante estimulação tetânica e dividimos pela média da amplitude dos MEPPs registrados na mesma fibra antes do início da estimulação tetânica para calcular o conteúdo quântico. A média do conteúdo quântico foi plotado *versus* o conteúdo quântico cumulativo e foi feita uma extrapolação da fase linear inicial da depressão para o eixo horizontal para estimar o valor do RRP. A figura 17 A mostra as linhas que indicam a extrapolação da fase linear inicial da depressão para o eixo horizontal estimando o valor do RRP. Em B mostram que a estimativa do RRP foi de $940 \pm 126,69$ (média \pm EPM) vesículas nos camundongos WT e $890 \pm 167,41$ vesículas nos camundongos Hyper VACHT. Não foram observadas alterações significativas (teste t de Student, $P > 0.05$). Esses dados sugerem que a DHP não altera o número de vesículas disponíveis a serem liberadas.

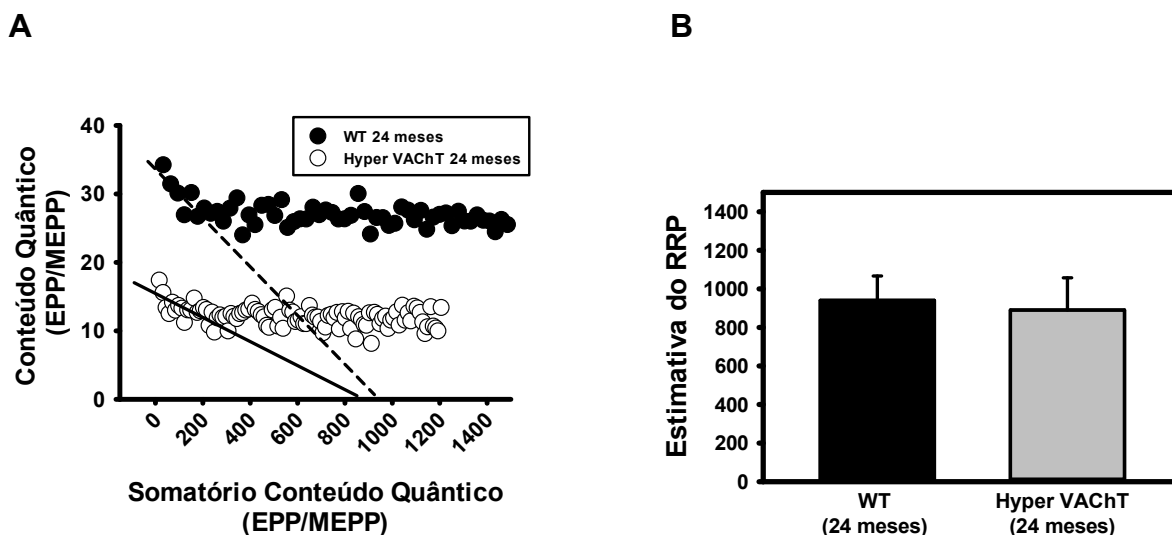


Figura 17 – Estimativa no número de quanta no RRP durante estimulação tetânica em camundongos Hyper VACHT idosos. A. Média do conteúdo quântico de cada EPP durante o estímulo tetânico plotado contra o conteúdo quântico cumulativo em camundongos WT ou Hyper VACHT de 24 meses. As linhas indicam a extrapolação da fase linear inicial da depressão para o eixo horizontal estimando o valor do RRP. B. Estimativa do RRP (teste t de Student, $P < 0.05$).

6. Discussão

6.1 Consequências do aumento da expressão do VACHT em camundongos jovens

Recentemente, estudos utilizando os animais ChAT-ChR2-EYFP (Hyper VACHT) tem sido realizados com intuito de estudar o circuito de neurotransmissão colinérgica (Misgeld *et al*, 2005; Kolinsky *et al*, 2013; Satoshi *et al*, 2016). Esta linhagem foi inicialmente planejada para estudos utilizando a optogenética em neurônios colinérgicos, onde o procedimento adotado para inserção do canal rodopsina nos neurônios colinérgicos produziu um aumento da expressão do VACHT. Kolinsky *et al* (2013) mostraram que camundongos adultos ChAT-ChR2-EYFP apresentaram um aumento no número de cópias do gene do VACHT com consequente aumento da superexpressão do transportador no tronco encefálico e hipocampo. Isto aumentou o tônus colinérgico mostrado como um aumento da liberação de ACh no hipocampo. Em nossos resultados, observamos que os camundongos Hyper VACHT adultos apresentaram um aumento significativo da amplitude e área dos MEPPs. Esses dados sugerem que esses animais modificados apresentam um aumento na liberação de ACh vesicular no terminal nervoso colinérgico periférico, corroborando com a hipótese de que o aumento da expressão do VACHT aumenta a liberação de acetilcolina. A amplitude das correntes em miniatura (MEPCs) nos animais Hyper VACHT adultos também apresentaram aumento significativo, excluindo a possibilidade das alterações vistas nos MEPPs serem devido a alterações nas propriedades passivas de membrana.

Além de alterações no preenchimento vesicular, alterações na expressão do VACHT também poderiam afetar outros parâmetros relacionados a neurotransmissão. Lima *et al* (2010) sugeriram que alterações no VACHT poderiam alterar a homeostasia do cálcio do terminal pré-sináptico, e como consequência, alterações nos parâmetros relacionados ao recrutamento vesicular. Eles mostraram que camundongos adultos geneticamente modificados que apresentavam 70% de redução da expressão do VACHT (KDVAChT), apresentavam diminuição na amplitude dos MEPPs, diminuição na frequência dos MEPPs, diminuição no CQ e diminuição na potenciação pós-tetânica. Nós hipotetizamos que, se este efeito fosse dependente do VACHT, nossos camundongos Hyper VACHT adultos apresentariam um aumento nos mesmos parâmetros avaliados por Lima, *et al* (2010). Entretanto, apesar deles apresentarem

aumento na frequência dos MEPCs, os outros parâmetros como o conteúdo quântico e a potenciação pós tetânica, não apresentaram alterações.

Duas outras explicações para a diminuição na frequência dos MEPPs foram propostas por Lima *et al* (2010). Uma hipótese foi que alguns MEPPs poderiam desaparecer no ruído basal do registro. Outra hipótese foi que pudesse haver liberação de vesículas vazias, devido à diminuição do transportador. Se houvesse perda do registro de MEPPs pequenos, uma consequência seria uma aparente diminuição do conteúdo quântico, tendo em vista que o EPP seria dividido por um valor de amplitude de MEPP maior. Nossos dados sugerem que a superexpressão do VACHT em camundongos adultos não altera os mecanismos de homeostasia de Ca^{2+} . Neste caso, talvez o aumento observado na frequência das MEPCs possa estar associado a um tipo de amadurecimento vesicular precoce, podendo ser rapidamente preenchida e pronta para ser recrutada ou devido a múltiplas inervações das fibras musculares (Satoshi *et al*, 2016).

Estudos anteriores mostraram que o aumento da expressão do VACHT em camundongos adultos também refletiu de forma negativa em parâmetros relacionados a cognição, e indícios envelhecimento precoce da JNM (Satoshi *et al* 2016). Entretanto, esses animais apresentaram um aumento na performance em teste de esteira. Foi sugerido então que o VACHT poderia alterar a resistência muscular. (Kolisnyk *et al*, 2013). A melhor performance na esteira poderia estar associada à uma menor depressão sináptica, entretanto nossos resultados mostram uma maior depressão sináptica em alta frequência de estimulação nos animais Hyper VACHT. Estas alterações podem ser um indicio de um mecanismo compensatório capaz de manter as taxas de disparo de potenciais de ação semelhantes aos camundongos controle.

Nossos dados sugerem que o aumento na performance em esteira visto anteriormente possa não ter relação com as alterações sinápticas causadas pelo aumento da expressão do VACHT na JNM. Talvez esses animais possam ter alterações em outras estruturas que melhore a resistência muscular neste tipo de teste.

6.2 Aumento na depressão sináptica nos animais Hyper VACHT jovens

Os camundongos Hyper VACHT jovens apresentaram um aumento na depressão sináptica durante estimulação em alta frequência. Uma das primeiras hipóteses para explicar tal aumento é uma possível dessensibilização dos receptores nicotínicos pós-sinápticos devido ao aumento na quantidade de ACh que esses camundongos apresentam. A diminuição na área e tempo de decaimento dos MEPPs observados nos camundongos Hyper VACHT jovens durante estimulação tetânica são dados que poderiam confirmar essa hipótese. Entretanto, também observamos uma diminuição no tempo de decaimento dos MEPPs nos camundongos WT semelhante ao decaimento observado nos camundongos Hyper VACHT que também retorna a valores basais após estimulação tetânica. Isto sugere que o fator diferencial entre os Hyper VACHT e WT seja a queda da amplitude durante o estímulo de alta frequência. A diminuição observada na área dos MEPPs é o reflexo da diminuição do tempo de decaimento e tendência de diminuição da amplitude dos MEPPs observados nos camundongos Hyper VACHT. A diminuição na amplitude pode refletir alterações em elementos pré-sinápticos que estejam contribuindo para o aumento observado na depressão sináptica durante estimulação tetânica.

Outra hipótese para explicar o aumento da depressão seria que os camundongos Hyper VACHT pudessem apresentar uma diminuição do número de vesículas no RRP. Em nosso trabalho não foi possível fazer a estimativa do RRP nos camundongos Hyper VACHT jovens pois como houve diminuição do tamanho dos quanta, a amplitude dos EPPs poderia estar subestimada nesses camundongos, o que poderia mostrar uma falsa alteração no RRP. Estamos procurando uma forma de calcular o quanto a dessensibilização poderia alterar a amplitude dos EPPs durante estimulação tetânica, assim poderemos fazer uma estimativa mais fiel do RRP. Outra hipótese seria que os camundongos Hyper VACHT também pudessem apresentar uma piora da capacidade de reciclagem vesicular. Esta hipótese vai de acordo com os resultados observados no trabalho realizado Magalhães Gomes (2018). Neste trabalho, foi utilizado o marcador fluorescente FM1-43 fx para avaliar a endocitose e exocitose vesicular na JNM do músculo diafragma dos camundongos Hyper VACHT de 3 meses de idade. Não foram observadas alterações na exocitose, entretanto, foi observado que os camundongos Hyper VACHT apresentaram comprometimento na endocitose vesicular.

Nossos dados sugerem que alterações em elementos pré-sinápticas também podem ter contribuído para o aumento da depressão sináptica observado nos camundongos Hyper VACHT jovem.

6.3 Alterações na neurotransmissão com a idade

O processo de envelhecimento está associado a alterações fisiológicas naturais na JNM que ocorrem ao longo dos anos, diminuindo a eficiência da neurotransmissão. Porém, alterações plásticas são capazes de sustentar a transmissão sináptica. Em estudos anteriores utilizando junção neuromuscular de camundongos idosos, foi observado aumento na amplitude dos MEPPs, aumento da frequência dos MEPPs e aumento do CQ (Smith, 1984; Anis e Robbins, 1987; Willadt *et al*, 2016). Essas alterações foram associadas ao aumento na arborização dos terminais sinápticos, tal fenômeno pode ser considerado um mecanismo plástico capaz de compensar a gradual deterioração da massa muscular e sistema neuromuscular. Em nosso trabalho, ao comparar camundongos WT jovens e idosos, os resultados observados corroboram em parte com os estudos realizados anteriormente. Observamos que os camundongos WT idosos apresentaram aumento na frequência dos MEPPs ($p=0,018$, ANOVA, $p<0,05$, figura 7) e CQ ($p=0,012$, teste t de student, $p<0,05$, figura 11) em relação aos camundongos WT jovens.

Foi mostrado no trabalho realizado por Satoshi *et al* (2016) que o aumento da expressão do VACHT não apresentou alterações no tamanho dos clusters de AChR, porcentagem de aposição entre os terminais pré e pós-sinápticos, propriedades funcionais dos AChR, incidência de múltiplas inervações na JNM e níveis de mRNA das isoformas tipo 2A, 2B e 2X de cadeia pesada de miosina no musculo tibial anterior e EDL em camundongos com 9 dias de idade. Isto mostra que o aumento da expressão do VACHT não altera o desenvolvimento da JNM e fibras musculares. Entretanto, camundongos Hyper VACHT com 5 meses de idade apresentaram aumento da fragmentação e deservação em relação aos WT. Com 19 meses de idade apresentaram redução significativa de acetilcolinesterase e diminuição do tamanho da fibra muscular do tibial anterior. Esse estudo sugeriu que o aumento da expressão do VACHT acelera o envelhecimento da JNM.

De acordo como o que foi visto por Satoshi *et al* (2016), seria de se esperar que com o processo de envelhecimento natural, os camundongos Hyper VACHT idosos utilizados em nosso trabalho, apresentassem severas alterações nos parâmetros eletrofisiológicos avaliados. Entretanto, ao comparar os camundongos Hyper VACHT jovens com os camundongos Hyper VACHT idosos (figura 10), observamos uma diminuição significativa na amplitude dos MEPPs, EPPs e aumento significativo na frequência dos MEPPs ($p= 0,011$, ANOVA, $p<0,05$) nos camundongos Hyper VACHT idosos. A diminuição na amplitude dos MEPPs e EPPs sugere que processos plásticos adaptativos podem ter alterado os mecanismos de preenchimento vesicular ou resposta dos receptores colinérgicos devido ao excesso de ACh liberado ao longo do tempo. O aumento na frequência dos MEPPs pode ser devido ao aumento na arborização dos terminais pré-sinápticos e ou surgimento de múltiplas inervações. Esses resultados podem ser reflexo da ação de fenômenos de plasticidade sináptica que perante desestabilizações na JNM são capazes de alterar a atividade sináptica no intuito de manter a estabilidade da neurotransmissão.

6.4 Plasticidade sináptica homeostática em camundongos Hyper VACHT

Em nosso trabalho observamos que os camundongos Hyper VACHT apresentaram modificações homeostáticas. Durante o processo de envelhecimento, os camundongos Hyper VACHT compensaram o aumento no tamanho dos quanta de duas maneiras diferentes: aos 3 meses, os EPPs em altas frequências de estimulação reduziram por aumento de dessensibilização, enquanto que aos 24 meses observamos diminuição do conteúdo quântico em relação aos camundongos controle. Podemos supor que um mecanismo compensatório já está estabelecido nos camundongos Hyper VACHT idosos e que o aumento crônico da liberação de ACh por vesícula sináptica apresentado nos camundongos Hyper VACHT jovens pode ser o gatilho de acionamento desse mecanismo.

Nossos dados sugerem então que a diminuição do CQ observada nos animais idosos pode ser consequência da ação de um mecanismo compensatório capaz de diminuir a liberação de ACh no terminal pré-sináptico.

6.5 Depressão homeostática pré-sináptica

A diminuição no conteúdo quântico observada nos camundongos Hyper VAcHAT idosos é um processo semelhante ao observado por Daniels *et al* (2004) na JNM de drosófila, chamado de depressão homeostática pré-sináptica (DHP). Diferentemente da potenciação homeostática pré-sináptica (PHP), onde ocorre um aumento da liberação do neurotransmissor (Turrigiano, 2012, 2004), na DHP ocorre uma diminuição da liberação do neurotransmissor. O estudo feito por Daniels *et al* (2004), mostrou um aumento no tamanho dos quanta e diminuição do QC utilizando um modelo geneticamente modificado que apresentava superexpressão do transportador vesicular de glutamato (VGlut; VGlut OE) em JNM de Drosófila. Os resultados observados em camundongos Hyper VAcHT em nosso trabalho mostram o mesmo fenômeno. Estas evidências de DHP ainda não foram reportadas em JNM de mamíferos. A DHP nos camundongos Hyper VAcHT pode ter se desenvolvido durante o processo de envelhecimento. O aumento crônico da liberação de ACh e a dessensibilização dos receptores nicotínicos pós-sinápticos e ou piora na reciclagem ou preenchimento vesicular apresentados na fase adulta desses animais, pode ter gerado alterações na homeostasia sináptica da JNM ao longo do tempo. A DHP nos camundongos Hyper VAcHT pode ter se desenvolvido na tentativa de reestabelecer a homeostasia sináptica.

6.6 Alterações no VAcHT como estratégia terapêutica

Algumas patologias como a doença de Huntington, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e síndrome miastênica são caracterizadas pela diminuição da ação colinérgica, podendo agir nos elementos pré ou pós-sinápticos, gerando graves disfunções no sistema nervoso central e ou periférico (Bartus *et al*, 1982; Pinto *et al*, 1998; Andersen *et al*, 2005; Smith *et al*, 2006).

O uso de fármacos que aumentam do tônus colinérgico como por exemplo anticolinesterásicos são comumente utilizados para auxiliar no tratamento deste tipo de patologia (Chan e Calvey, 1977; Li, 2015; Noufi *et al*, 2019). Como foi mostrado em trabalhos anteriores e reforçado em nosso estudo, o aumento da expressão do VAcHT gera um aumento da quantidade de ACh liberada através de um aumento no preenchimento vesicular, portanto, poderíamos supor que o aumento o tônus

colinérgico através do aumento da expressão do VACHT também poderia ser uma boa estratégia terapêutica para o auxílio de doenças que afligem o tônus colinérgico. Entretanto, o trabalho realizado por Satoshi *et al* (2016), mostrou que o modelo animal geneticamente modificado para esclerose lateral amiotrófica e aumento na expressão do VACHT apresentou degeneração da JNM acelerada, déficits motores e morte prematura. Ao contrário do que poderíamos imaginar, o aumento do tônus colinérgico apresentado pelo aumento crônico da expressão do VACHT pode não ser benéfico para os sintomas apresentados por patologias colinérgicas, mostrando que a degeneração apresentada pelo aumento da expressão do VACHT pode amplificar a degeneração causada pela patologia. Em casos patológicos, podemos supor que o desenvolvimento de qualquer tipo de mecanismo de plasticidade sináptica homeostática compensatório possa não ser capaz de regular a homeostasia sináptica como sugerimos que aconteça nos Hyper VACHT idosos, visto que os animais em nosso estudo chegaram a idade avançada. Isto reforça a hipótese de que exista uma quantidade ideal de liberação de ACh e que a diminuição ou o aumento da liberação pode trazer severas consequências.

7. Conclusão

A análise dos resultados obtidos em camundongos Hyper VACHT jovens nos permitiu observar que o aumento no número de transportadores para ACh produz aumento na sua liberação para a fenda sináptica. Isto foi observado pelo aumento da amplitude dos MEPP e MEPCs sendo refletida na amplitude dos EPPs. Embora tenha alterado a frequência das MEPCs, o VACHT parece não ter influência na probabilidade de liberação vesicular, pois não foram observadas alterações em outros parâmetros que refletem alterações neste mecanismo como o conteúdo quântico, facilitação ou potenciação pós tetânica. Podemos supor então, que o aumento da liberação de ACh é devido ao aumento do preenchimento vesicular.

Em camundongos Hyper VACHT idosos, nossos resultados mostraram que através da DHP, houve diminuição do CQ. O aparecimento desta modificação foi dependente de um tempo prolongado de aumento de liberação de acetilcolina. Tal mecanismo seria uma forma menos dispendiosa de manter a homeostasia sináptica e diminuir os danos causados pelo excesso de liberação de ACh.

Concluimos então que o excesso de liberação de ACh aciona o mecanismo pré-sináptico de DHP, produzindo alterações plásticas a curto e longo prazo. Nos animais jovens, a compensação se dá pelo aumento da depressão durante grande atividade neuronal. Com o tempo, se desenvolve uma diminuição do número de vesículas liberadas, que mantém a economia do terminal pré-sináptico. Mais experimentos são necessários para complementar nossos resultados e desvendar os mecanismos subjacentes a estas adaptações na neurotransmissão colinérgica.

8. Referências

- ADISH D., HUANG B., BERGAN J., DULAC C. AND ZHUANG X. Super-resolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron* 68: 843–856. 2010
- ADRIAN E.D. AND BRONK D.W. The discharge of impulses in motor nerve fibres. Part II: The frequency of discharge in reflex and voluntary contractions. *J Physiol* .119-51. 1929.
- ALABI A.A. AND TSIEN R.W. Synaptic vesicle pools and dynamics cold. *Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a013680. 2012.
- ALÉS, E., TABARES, L., POYATO, J. M., VALERO, V., LINDAU, M., & ALVAREZ DE TOLEDO, G. High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nature Cell Biology*, 1(1), 40–44. 1999.
- ANIS, N. A., & ROBBINS, N. General and strain-specific age changes at mouse limb neuromuscular junctions. *Neurobiology of Aging*, 8(4), 309–318. 1987.
- AXELSSON J, THESLEFF S. A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle. *J Physiol*.147(1):178–193, 1959.
- BAIN A. I. AND QUASTEL, D. M. J. Multiplicative and additive Ca²⁺-dependent components of facilitation at mouse endplates. *J Physiol*. 455: 383-405, 1992.
- BAIG, S.S., STRONG, M., QUARRELL, O.W.,. The global prevalence of Huntington's disease: a systematic review and discussion. *Neurodegener. Dis. Manag.* 6 (4), 331e343. 2016.

BANKER, B. Q., KELLY, S. S., & ROBBINS. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *The Journal of Physiology*, 339(1), 355–377. 1983.

BARTUS, R. T., DEAN III, R. L., BEER, B. AND LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*.217:408–414, 1982.

BERG, D. K., & HALL, Z. W. (1975). Increased extrajunctional acetylcholine sensitivity produced by chronic acetylcholine sensitivity produced by chronic post-synaptic neuromuscular blockade. *The Journal of Physiology*, 244(3), 659–676, 1975.

BETZ, W. J., & ANGLESON, J. K. (1998). THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 347–363. 60.1.347. 1998.

BIRKS, R., & MACINTOSH, F. C. Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 39(4), 787–827, 1961.

BLISS TV, COOKE SF. Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66 Suppl 1(Suppl 1):3–17.

BLOCK B.A., IMAGAWA T., CAMPBELL K.P. AND FRANZINI-ARMSTRONG C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*.107: 2587-2600, 1988.

BRANDON E.P., LIN W., D'AMOUR K.A., PIZZO D.P., DOMINGUES B., SUGIURA Y., THODE S., KO C.P., THAL L.J., GAGE F.H. AND LEE K.F. Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficit mice. *J. Neurosci*. 23:539-549. 2003

BROADIE K, PROKOP A., BELLEN H.J., O'KANE C.J. AND SCHULZE K.L. syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in drosophila. *Neuron*. 15: 663-673. 1995.

BURGESS, A., DUBEY, S., YEUNG, S., HOUGH, O., ETERMAN, N., AUBERT, I., & HYNYNEN, K. Alzheimer Disease in a Mouse Model: MR Imaging–guided Focused Ultrasound Targeted to the Hippocampus Opens the Blood-Brain Barrier and Improves Pathologic Abnormalities and Behavior. *Radiology*, 273(3), 736–745, 2014.

CASAS, C., MANZANO, R., VAZ, R., OSTA, R., & BRITES, D. Synaptic Failure: Focus in an Integrative View of ALS. *Brain Plasticity*, 1(2), 159–175. 2016.

CHAN, K., & CALVEY, T. N. Plasma concentration of pyridostigmine and effects in myasthenia gravis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 22(5part1), 596–601. 1977.

CHEN CK, BREGERE C, PALUCH J, LU JF, DICKMAN DK, CHANG KT. Activity-dependent facilitation of Synaptojanin and synaptic vesicle recycling by the Minibrain kinase. *Nat Commun*;5:4246, 2014.

COLLIER B, KATZ HS. Acetylcholine synthesis from recaptured choline by a sympathetic ganglion. *J Physiol*;238(3):639–655. 1974.

COLOVIĆ MB, KRSTIĆ DZ, LAZAREVIĆ-PAŠTI TD, BONDŽIĆ AM, VASIĆ VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3):315–335.

CULL-CANDY, S. G., & USHERWOOD, P. N. R. Two Populations of L-Glutamate Receptors on Locust Muscle Fibres. *Nature New Biology*, 246(150), 62–64, 1973.

CULLY, D. F., WILKINSON, H., VASSILATIS, D. K., ETTER, A., & ARENA, J. P. Molecular biology and electrophysiology of glutamate-gated chloride channels of invertebrates. *Parasitology*, 113(S1), S191, 1996.

DANIELS, R. W. CATHERINE A. COLLINS, MARIA V. GELFAND, JAIME DANT, ELIZABETH S. BROOKS, DAVID E. KRANTZ, AND AARON DIANTONIO. Increased Expression of the *Drosophila* Vesicular Glutamate Transporter Leads to Excess Glutamate Release and a Compensatory Decrease in Quantal Content. *Journal of Neuroscience*, 24(46), 10466–10474, 2004.

DAVID G. AND BARRETT, E. F. Mitochondrial Ca²⁺ uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol*. 548: 425-38, 2003.

DAVIS, G. W., & MÜLLER, M. (). Homeostatic Control of Presynaptic Neurotransmitter Release. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 251–270. 2015.

DE CASTRO B.W., DE JAEGER X., SILVA C.M., LIMA R.D.F., AMARAL E., MENEZES C., LIMA P., NEVES C.M.L., PIRES R.G., GOULD T.W., WELCH I.,

KUSHMERICK C., GUATIMOSIM C., IZQUIERDO I., CAMMAROTA M., RYLETT R.J., GOMEZ M.V., CARON M.G., OPPENHEIM R.W. AND PRADO M.A.M. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. *Mol. Cell Biol.*, 29:5238-5250. 2009.

DEL CASTILLO J, KATZ B. The membrane change produced by the neuromuscular transmitter. *J Physiol.* 1954;125(3):546–565. 1954c.

DEL CASTILLO, J. AND KATZ, B. Quantal components of the end plate potential. *J. Physiol.* 124: 560-573, 1954b.

DEL CASTILLO, J. AND KATZ, B. The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J. Physiol.* 124: 553-559, 1954a

DENNY-BROWN D. E. On the nature of the postural reflexes. *Proc. R. Soc. Lond.* 252-301. 1929

DI FRANCO M., NOVO D. AND VERGARA J.L. Characterization of the calcium release domains during excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres. *Eur. J. Physiol.* 443: 508-519, 2002

DICKMAN, D. K., HORNE, J. A., MEINERTZHAGEN, I. A., & SCHWARZ, T. L. A Slowed Classical Pathway Rather Than Kiss-and-Run Mediates Endocytosis at Synapses Lacking Synaptotagmin and Endophilin. *Cell*, 123(3), 521–533, 2005.

DITTMAN, J. S. AND REGEHR, W. G. Calcium dependence and recovery kinetics of presynaptic depression at the climbing fiber to purkinje cell synapse. *J. Neurosci.* 18: 6147-62, 1998

DORJE F., WESS J., LAMBRECHT G., TACKE R., MUTSCHLER E. AND BRANN, M.R. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J. Pharmacol.* 256:727-733. 1990.

DOUGLAS J. BAKKUM^{1,2}, URS FREY³, MILOS RADIVOJEVIC¹, THOMAS L. RUSSELL¹, JAN MÜLLER¹, MICHELE FISCELLA¹, HIROKAZU TAKAHASHI^{2,4} & ANDREAS HIERLEMAN. Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites. *NATURE COMMUNICATIONS.* 4:2181. 2013

DUNANT Y. On the mechanism of acetylcholine release *Progress in Neurobiology*. 26: 55-92. 1986.

EGGERMANN E., BUCURENCIU I., GOSWAMI S.P, AND JONAS P. Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat. Rev. Neuro sci.* 13: 7–21. 2013.

ELMQVIST D, QUASTEL DM. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J Physiol*. 1965;178(3):505–529,1965.

ERICKSON, J. D., VAROQUI, H., SHAFER, M. K., MODI, W., DIEBLER, M. F., WEIHE E., RAND J., EIDEN L.E., BONNER T.I. AND USDINM T.B. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a “cholinergic” gene locus. *J. Biol. Chem.* 269: 21929-32, 1994.

FATT P, KATZ B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol*. 115(3):320–370. 1951

FATT P. AND KATZ B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve-endings. *J. Phy8iol*. 117, 109-128. 1952.

FELDBERG W, GADDUM JH. The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion. *J Physiol*; 81(3):305–319, 1934.

FIORAVANTE, D., & REGEHR, W. G. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 269–274, 2011.

FOX K, STRYKER M. Integrating Hebbian and homeostatic plasticity: introduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*;372(1715):20160413. 2017.

FURSHPAN E.J. AND POTTER D.D. transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol*, 145:289-325. 1958

GAINEY MA, HURVITZ-WOLFF JR, LAMBO ME, TURRIGIANO GG. Synaptic scaling requires the GluR2 subunit of the AMPA receptor. *J Neurosci*;29(20):6479–6489, 2009.

GAVIÑO MA, FORD KJ, ARCHILA S, DAVIS GW. Homeostatic synaptic depression is achieved through a regulated decrease in presynaptic calcium channel abundance. *Elife*. 2015;4:e05473. Published Apr 17, 2015.

GERALDINE J. KRESS1 AND STEVEN MENNERICK. Action potential initiation and propagation: upstream influences on neurotransmission. *Neuroscience*. January 12; 158(1): 211–222. 2009.

GONATAS N.K., STIEBER A., HICKEY W.F., HERBERT S.H. AND GONATAS J.O. endosomes and golgi vesicles in adsorptive and fluid phase endocytosis. *Journal of cell biology*: 99: 1379-1390. 1984.

GOULD V.E., WIEDENMANN B., LEE I., SCHWECHHEIMER K., DOCKHORN-DWORNICZAK B., RADOSEVICH J.A., MOLL R. AND FRANKE W. W. Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *AJP*. 126:243-256. 1987

GOYAL RK AND ARUN C. Structure activity relationship of synaptic and junctional neurotransmission. *Auton Neurosci*. 176: 11–31. 2013

HANSFORD R.G. AND LAKATTA E.G. Ryanodine releases calcium from sarcoplasmic reticulum in calcium-tolerant rat cardiac myocytes. *J. Physiol*. 390: 453-467. 1987.

HARLOS, P., LEE, D.A. AND STADLER, H. Characterization of a Mg²⁺-ATPase and a proton pump in cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Eur. J. Biochem*. 144, 441–446. 1984

HARRIS AL: EMERGING ISSUES OF CONNEXIN CHANNELS: BIOPHYSICAL FILLS THE GAP. *Quart Rev Biophys*, 34:325-472. 2001.

HASSELMO, M. E. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences*, 3(9), 351–359. 1999.

HEUSER J., REESE T.S., DENNIS M.J., JAN Y., JAN I. AND EVANS I. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell biology*. 81: 275-300. 1979.

HEUSER, J. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of Cell Biology*, 57(2), 315–344, 1973.

HIKICHI M. Y, POLO-PARADA L, KASTANENKA KV, LANDMESSER LT. Frequency-dependent modes of synaptic vesicle endocytosis and exocytosis at adult mouse neuromuscular junctions. *J Neurosci*; 31(3):1093–1105, 2011.

HÖLSCHER, C., MCGLINCHEY, L., ANWYL, R., & ROWAN, M. J. HFS-induced long-term potentiation and LFS-induced depotentiation in area CA1 of the hippocampus are not good models for learning. *Psychopharmacology*, 130(2), 174–182. 1997.

HORMUZDIA S.G., FILIPPOVA M.A., MITROPOULOU G., MONYERA H., BRUZZONEA R., Electrical synapses: a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1662: 113–137. 2003.

HUBEL, D. H. (1979). The Brain. *Scientific American*, 241(3), 44–52, 1979.

HUGHES, B. W., KUSNER, L. L., & KAMINSKI, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle & Nerve*, 33(4), 445–461. 2006.

JAMES TD, ZWIEFELHOFER DJ, FRANK CA. Maintenance of homeostatic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular synapse requires continuous IP₃-directed signaling. *Elife*. 2019;8:e39643, 2019.

KALLKSTEIN J. M. AND MAGLEBY K. L. Aumentation increases vesicular release probability in the presence of masking depression at the frog neuromuscular junction. *J Neurosci*. 24: 11391-403, 2004.

KARCZMAR, A. G. The Otto Loewi Lecture Loewi's discovery and the XXI century. *Progress in Brain Research*, 1–27. 1996.

KATZ B AND MILEDI R. The effect of local blockage of motor nerve terminals. *J. Physiol*. 199:729-741.1968a

KATZ B AND MILEDI R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Phy8iol*. 195:481-492. 1968b

KATZ B AND MILEDI R. A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J. Physiol.* 192: 407-436. 1967b.

KATZ B. AND MILEDI, R Transmitter leakage from motor nerve endings. *Proc. R. Soc. Lond.* 196: 59-72. 1977.

KATZ B. Quantal mechanism of neural transmitter release. *Science*. 173: 123-126, 1971.

KATZ B., MILEDI R. The Quantal Release of Transmitter Substances. In: Curtis D.R., McIntyre A.K. (eds) *Studies in Physiology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 118-128; 1965.

KELLY, S. S., & ROBBINS, N. Statistics of neuromuscular transmitter release in young and old mouse muscle. *The Journal of Physiology*, 385(1), 507–516. 1987.

KHEDRAKI, A., REED, E. J., ROMER, S. H., WANG, Q., ROMINE, W., RICH, M. M., VOSS, A. A. Depressed Synaptic Transmission and Reduced Vesicle Release Sites in Huntington's Disease Neuromuscular Junctions. *The Journal of Neuroscience*, 37(34), 8077–8091. 2017.

KITAMOTO T., WANG W. AND SALVATERRA P.M. Structure and Organization of the *Drosophila* Cholinergic Locus. *The journal of biological chemistry*. 273: 2706–2713. 1998.

KOBILKA, B. K., & DEUPI, X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 397–406, 2007.

KOELLE, G. B. The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 100(1), 211–235, 1954.

KOLISNYK BENJAMIN, MONICA S. GUZMAN, SANDA RAULIC, JUE FAN, ANA C. MAGALHÃES, GUOPING FENG, ROBERT GROS, VANIA F. PRADO AND MARCO A. M. PRADO. ChAT-ChR2-EYFP Mice Have Enhanced Motor Endurance But Show Deficits in Attention and Several Additional Cognitive Domains *The Journal of Neuroscience*, June 19, 2013

KREBS, H. A. Metabolism of amino-acids. *Biochemical Journal*, 29(8), 1951–1969. 1935.

KUFFLER W. AND YOSHJKAIMI D. The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from Iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse. *J. Physiol.* 251: 465-482. 1975.

Kuromi, H., & Kidokoro, Y. Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology*, 32(5-8), 551–565, 2003.

LARA A., DENIS D., PIRES D.R., GROS R., GOMES E.R., GAVIOLI M., LIMA R.F., GUIMARAES D., LIMA P., BUENO C.R., VASCONCELOS J.A., CAMPOS D.R., MENEZES C.A.S., SIRVENTE R.A., SALEMI V.M., MADY C., CARON M.G., FERREIRA A.J., BRUM P.C., RESENDE R., CRUZ J.S., GOMEZ M.V., PRADO V.F., ALMEIDA A.P., PRADO M.A.M. AND GUATIMOSIM S. Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Molecular and cellular biology* 113: 1746–1756. 2010.

LEA, T. J., & Usherwood, P. N. R. The site of action of ibotenic acid and the identification of two populations of glutamate receptors on insect muscle-fibres. *Comparative and General Pharmacology*, 4(16), 333–350, 1973.

LECLERE P.G. AND LEFEBVRE R.A. Characterization of pre and postsynaptic muscarinic receptors in circular muscle of pig gastric fundus. *British Journal of Pharmacology*. 135, 1245-1254. 2002

LENA C. AND CHANGEUX J.P. Pathological mutations of nicotinic receptors and nicotine-based therapies for brain disorders. *Current Opinion in Neurobiology*.7:674–682. 1997.

LENT, R., AZEVEDO, F. A. C., Andrade-Moraes, C. H., & Pinto, A. V. O. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *European Journal of Neuroscience*, 35(1), 1–9. 2011.

LI X, GOEL P, WONDOLOWSKI J, PALUCH J, DICKMAN D. A Glutamate Homeostat Controls the Presynaptic Inhibition of Neurotransmitter Release. *Cell Rep*;23(6):1716–1727. 2018.

LIMA R.F.,PRADO V. F., PRADO M.A., KUSHMERICK C. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J Neurochem*. 113:943–951. 2010.

LOVINGER D.M. communication networks in the brain neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Res Health*; 31(3): 196–214. 2008.

MAGANHÃES GOMES M. P. S. Alterações neuromusculares em modelos animais de disfunção colinérgica e sua relação com as Síndromes Miastênicas Congênitas. Trabalho de Tese. Departamento de Morfologia ICB – UFMG. Minas Gerais. 2018.

MAGLEBY K.L. AND ZENGEL J. Long term changes in augmentation, potentiation, and depression of transmitter release as a function of repeated synaptic activity at the frog neuromuscular junction. *J. Phy8iol.* 257:471-494. 1976.

MARIE, B., SWEENEY, S. T., POSKANZER, K. E., ROOS, J., KELLY, R. B., & DAVIS, G. W. (2004). Dap160/Intersectin Scaffolds the Periaxonal Zone to Achieve High-Fidelity Endocytosis and Normal Synaptic Growth. *Neuron*, 43(2), 207–219, 2004.

MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ A.J. intra-golgi transport: roles for vesicles, tubules, and cisternae. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2013, Article ID 126731, 15 pages. 2013

MATSUI M., MOTOMURA D., KARASAWA H., FUJIKAWA T., JIANG J., KOMIYA Y., TAKAHASHI S. AND TAKETO M.M. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype. *PNAS* . 97: 9579–9584. 2000

MCLEOD, F., BOSSIO, A., MARZO, A., CIANI, L., SIBILLA, S., HANNAN, S., ... SALINAS, P. C. (2018). Wnt Signaling Mediates LTP-Dependent Spine Plasticity and AMPAR Localization through Frizzled-7 Receptors. *Cell reports*, 23(4), 1060–1071, 2018.

MICHAELSON, D.M., ANGEL, I.. Saturable acetylcholine transport into purified cholinergic synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 2048–2052. 1981

MISGELD T, KUMMER TT, LICHTMAN JW, SANES JR. Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:11088–93. 2005

MISGELD T., BURGESS R.W., LEWIS R.M., CUNNINGHAM J.M., LICHTMAN J.W. AND SANES J.R. Roles of neurotransmitter in synapse formation: developed of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36:635-648. 2002

NACHMANSOHN, D., & MACHADO, A. L. The formation of acetylcholine. a new enzyme: "choline acetylase." *Journal of Neurophysiology*, 6(5), 397–403. 1943.

NAVES L.A. AND VAN DER KLOOT W. Repetitive nerve stimulation decreases the acetylcholine content of quanta at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology*.532: 637–647. 2001.

NGUYEN M.L., COX, G.D. AND PARSONS S.M. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. *Biochemistry*.37: 13400-13410, 1998.

NICOLL, R. A. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290. 2017.

NOUFI P, KHOURY R, JEYAKUMAR S, GROSSBERG GT. Use of Cholinesterase Inhibitors in Non-Alzheimer's Dementias. *Drugs Aging*. Jun 14. 2019

ODA, Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology International*, 49(11), 921–937, 1999.

OLSHANSKY B., HANI N., SABBAH P., HAUPTMAN, P.J., WILSON S. COLUCCI W.S. Parasympathetic nervous system and heart failure. *Pathophysiology and potential implications for therapy*. *Circulation*. 118:863-871. 2008.

ONDREJCAK, T., KLYUBIN, I., CORBETT, G. T., FRASER, G., HONG, W., MABLY, A. J., ROWAN, M. J. Cellular Prion Protein Mediates the Disruption of Hippocampal Synaptic Plasticity by Soluble Tau In Vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 38(50), 10595–10606, 2018.

OYLER, G. A., HIGGINS, G. A., HART, R. A., BATTENBERG, E., BILLINGSLEY. M., BLOOM, F. E. AND WILSON, M. C. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J.Cell Biol*. 109, 3039-3052. 1989.

PARSONS, S. M., PRIOR, C., & MARSHALL, I. G. Acetylcholine Transport, Storage, And Release. *International Review of Neurobiology*, 279–390, 1993.

PEDERSEN S.E. AND COHEN J.B. d-Tubocurarine binding sites are located at a-γ and c-6 subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*.87:2785-2789. 1990.

PERALTA E. G., ASHKENAZI A., WINSLOW J. W., SMITH O. H., RAMACHANDRAN J. AND CAPON, O. J. Distinct primary structure, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 8: 3923-3929, 1987.

PEREDA A.E., CURTI S., HOGE G., CACHOPE R., FLORES C.E. AND RASH J.E. Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity. *Biochim. Biophys Acta.* 1828: 134–146. 2013

PEREDA, A. E. Neuroscience: The Hidden Diversity of Electrical Synapses. *Current Biology*, 29(10), R372–R375. 2019.

PERRY WL. ACETYLCHOLINE RELEASE IN THE CAT'S SUPERIOR CERVICAL GANGLION. *J PHYSIOL.* 1953;119(4):439–454, 1953.

PETROV A.M., NAUMENKO N.V., UZINSKAYA K. V., GINIATULLIN R., URAZAEV K. AND ZEFIROVA L. Increased non-quantal release of acetylcholine after inhibition of endocytosis by methyl- β - cyclodextrin: the role of vesicular acetylcholine transporter. *Neuroscience* 186: 1–12. 2011.

PINAR, C., FONTAINE, C. J., TRIVIÑO-PAREDES, J., LOTTENBERG, C. P., GIL-MOHAPEL, J., & CHRISTIE, B. R. Revisiting the flip side: Long-term depression of synaptic efficacy in the hippocampus. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 80, 394–413, 2017.

PINTO A., GILLARD S., MOSS, F., WHYTE K., BRUST P., WILLIAMS M., STAUDERMAN K., HARPOLD M., LANG B., DAVIS J.N., BLEAKMAN D., LODGE D. AND BOOT J.. Human autoantibodies specific for the α 1A calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *PNAS*, 95: 8328-33, 1998.

POTTER L.T. Synthesis, storage and release of (14 C) acetylcholine in isolated rat diaphragm muscles. *J Physiol* . 206: 145-166. 1970

PRADO V.F., SILVA C.M., DE CASTRO B.M., LIMA R.F., BARROS D.M., AMARAL E., RAMSEY A.J., SOTNIKOVA T.D., RAMIREZ M.R., KIM H.G., ROSSATO J.I., KOENEN J., QUAN H., COTA V.R., MORAES M.F.D., GOMEZ M.V., GUATIMOSIM C., WETSEL W.C., KUSHMERICK C., PEREIRA G.S., GAINETDINOV R.R., IZQUIERDO I., CARON M.G., AND PRADO M.A.M. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*.51: 601-12. 2006.

RAFTERY, M., HUNKAPILLER, M., STRADER, C., & HOOD, L. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science*, 208(4451), 1454–1456, 1980.

RAHAMIMOFF R. A. Dual effect of calcium ions on neuromuscular facilitation. *J Physiol*. 195: 471-80, 1968.

SAHEKI, YASUNORI; DE CAMILLI, Pietro. Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Contact Sites. *Annual Review of Biochemistry*, v. 86, n. 1, p. 659–684, 20 jun. 2017.

RIBEIRO F.M., BLACK S.A.G., PRADO W.F. AND RYLETT J.R. Ferguson S.S.G. AND Prado M.A. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1, *J Neurochem* 97:1-12. 2006.

RICH, M. M., & WENNER, P. Sensing and expressing homeostatic synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 30(3), 119–125. 2007.

RIZO JOSEPH. Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Science*; vol 27:1364—1391. 2018

RIZZOLI, S. O. Synaptic vesicle recycling: Steps and principles. *EMBO Journal*. [S.l.]: EMBO Press. 2014.

RIZZOLI, S.O. AND BETZ, W.J., 2004. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* 303 (5666), 2037e2039. 2004.

RIZZOLI S.O. AND BETZ W.J. Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci*. 6:57 – 69. 2005

ROBERTSON, J. D. The ultrastructure of a reptilian myoneuraljunction. *J. biophys.biochem. Cytol.*25:381-94. 1956

RODARTE, E. M., RAMOS, M. A., DAVALOS, A. J., MOREIRA, D. C., MORENO, D. S., CARDENAS, E. I. ADACHI, R. Munc13 proteins control regulated exocytosis in mast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 293(1), 345–358, 2017.

ROSENBAUM, D. M., RASMUSSEN, S. G. F., & KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356–363, 2009.

SAKABA, T., & NEHER, E. Calmodulin Mediates Rapid Recruitment of Fast-Releasing Synaptic Vesicles at a Calyx-Type Synapse. *Neuron*, 32(6), 1119–1131, 2001.

SATOSHI SUGITA, LELAND L. FLEMING¹, CALEB WOOD¹, SYDNEY K. VAUGHAN, MATHEUS P. S. M. GOMES⁵, WALLACE CAMARGO, LIGIA A. NAVES, VANIA F. PRADO, MARCO A. M. PRADO, CRISTINA GUATIMOSIM⁵ AND GREGORIO VALDEZ. VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions Sugita et al. *Skeletal Muscle* 6:31. 2016

SAVENDAHL L., MAR M.,H., UNDERWOOD L.E. AND ZEISEL S.H. Prolonged fasting in humans results in diminished plasma choline concentrations but does not cause liver dysfunction. *Am J Clin. Nutr.* 66: 622-625. 1997

SCAGNELLI G.P., COOPER P.S., VANDENBROEK J.M., BERMAN W.F. AND SCHWARTZG C.C. Plasma 1-Palmitoyl-2-linoleoyl phosphatidylcholine: Evidence for extensive phospholipase A₂ hydrolysis and hepatic metabolism of the products. *The journal of biologic chemistry*. 266: 18002-18011. 1991

SEARL T, PRIOR C. AND MARSHALL I.G. Acetylcholine recycling and release at rat motor nerve terminals studied using (-)-vesamicol and troxpyrrolium. *Journal of physiology*. 444: 99-116. 1991.

NATALI L. CHANADAY, MICHAEL A. COUSIN, IRA MILOSEVIC, SHIGEKI WATANABE AND JENNIFER R. MORGAN. The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: *Journal of Neuroscience* 16 October, 39 (42) 8209-8216. 2019.

SINGH S. AND PRIOR C. Prejunctional effects of the nicotinic ACh receptor agonist dimethylphenylpiperazinium at the rat neuromuscular. *Journal of Physiology.*, 511: 451-460. 1998.

SMART T, AND PAOLETI P. Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb. Perspect Bio.*4:a009662. 2012

SMITH O. CHUNG H..RUNDQUIST S. AND MAAT-SCHIEMAN M. L. Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum. Mol Genet.*15: 3119-31, 2006.

SMITH, D. O. Acetylcholine storage, release and leakage at the neuromuscular junction of mature adult and aged rats. *The Journal of Physiology*, 347(1), 161–176. 1984.

SNIDER W. D AND HARRIS G. L. A physiological correlate of disuse-induced sprouting at the neuromuscular junction. *Nature* 281, 69–71. 1979.

SOLLNER, T., BENNETT, M.K., WHITEHEART, S.W., SCHELLER, R.H. AND ROTHMAN, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409–418. 1993.

SPURNY R., DEBAVEYE S., FARINHA A., VEYS K., VOS A.M., GOSSAS T., ATACK J., BERTRAND S., BERTRAND D., DANIELSON U.H., TRESADERN G. AND ULENS C. Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. 12; 43-52; 2015

STADLER, H. AND TSUKITA, S. Synaptic vesicles contain an ATP-dependent proton pump and show 'knob-like' protrusions on their surface. *EMBO J*. 3, 3333–3337. 1984

STANTON, P. K. LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus*, 6(1), 35–42, 1996.

STOKES, D.L. AND WAGENKNECHT, T. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: Structure and function of Ca^{+2} -ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem*. 267: 5274-79, 2000.

SUDHOF, T. C. Calcium Control of Neurotransmitter Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), a011353–a011353. 2012.

SÜDHOF, Thomas C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, v. 80, n. 3, p. 675–90, 30 out. 2013.

SZCZUPAK, L. Functional contributions of electrical synapses in sensory and motor networks. *Current Opinion in Neurobiology*, 41, 99–105. 2016.

TALY A., CORRINGER P.J., GUEDIN D., LESTAGE P. AND CHANGEUX J.P. Nicotinic receptors: Allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 8:733–750. 2009.

TRIMBLE, W. S., COWAN, D. M., AND SCHELLER, R. H. VAMP-I: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 4538-4542. 1988.

TURECEK, R., & TRUSSELL, L. O. Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature*, 411(6837), 587–590. 2001.

TURRIGIANO GG, NELSON SB. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97–107. 2004.

TURRIGIANO GG. The dialectic of Hebb and homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1715):20160258. 2017.

TURRIGIANO, G. G., LESLIE, K. R., DESAI, N. S., RUTHERFORD, L. C., & NELSON, S. B. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391(6670), 892–896, 1998.

TURRIGIANO, G. Homeostatic Synaptic Plasticity: Local and Global Mechanisms for Stabilizing Neuronal Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(1), a005736–a005736. 2012.

UPADHYAY R.K. trans endothelial transport and its role in therapeutics. Hindawi Publishing Corporation. Volume, Article ID 309404, 39 pages. 2014.

VALADÃO, P. A. C., GOMES, M. P. S. M., ARAGÃO, B. C., RODRIGUES, H. A., ANDRADE, J. N., GARCIAS, R. GUATIMOSIM, C. Neuromuscular synapse degeneration without muscle function loss in the diaphragm of a murine model for Huntington's Disease. *Neurochemistry International*, 116, 30–42. 2018.

VALBUENA, S., & LERMA, J. Non-canonical Signaling, the Hidden Life of Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron*, 92(2), 316–329. 2016.

VAN DER KLOOT W. Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. *Prog. Neurobiol.* 71: 269-303. 2003.

VAN DER KLOOT W. The regulation of quantal size. *Progress in Neurobiology*. 36-93 to 130, 1991

VAN DER KLOOT, W., & MOLGÓ, J. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiological Reviews*, 74(4), 899–991. 1994.

VAROQUI H. AND ERICKSON J.D. Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. *The journal of biological chemistry* . 44: 271: 27229–27232. 1996.

KJAERULFF O, LLOYD TE, ATKINSON R, ZHOU Y, MEINERTZHAGEN IA, BELLEN HJ. Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*;109(1):101-12, 2002.

WANG, X., MCINTOSH, J. M., & RICH, M. M. Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptors May Mediate Trans-Synaptic Signaling at the Mouse Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience*, 38(7), 1725–1736. 2018.

WANG, X., PINTER, M. J., & RICH, M. M. Reversible Recruitment of a Homeostatic Reserve Pool of Synaptic Vesicles Underlies Rapid Homeostatic Plasticity of Quantal Content. *Journal of Neuroscience*, 36(3), 828–836. 2016.

WEBER T., ZEMELMAN B.V., MCNEW J. A., WESTERMANN B., GMACHL M., PARLATI F., SOLLNER T. H. AND ROTHMAN J. E. SNARE pins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. 92, 759–772. 1998.

WIERENGA CJ, IBATA K, TURRIGIANO GG. Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J Neurosci*;25(11):2895–2905, 2005.

WIERSMA, C. A. G. Giant nerve fiber system of the crayfish. A contribution to comparative physiology of synapse. *Journal of Neurophysiology*, 10(1), 23–38, 1947.

WILLADT, S., NASH, M., & SLATER, C. R. Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm. *Scientific Reports*, 6(1). 2016.

WU, L. G. AND BETZ W. J. Kinetic of synaptic depression and vesicle recycling after tetanic stimulation of frog motor nerve terminals. *Biophys J*. 74: 3003-3009, 1998.

WURTMAN, R. J., CANSEV, M., & ULUS, I. H. Choline and Its Products Acetylcholine and Phosphatidylcholine. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 443–501, 2009.

YAMASHITA, T. AND OOTA, I. Post-tetanic potentiation of miniature end-plate potential frequency at neuromuscular junction of the rat soleus muscle. Comp. Biochem. Physiol. 87: 737-744, 1987.

YU, S AND WILLIAM VAN DER KLOOT. Increasing quantal size at the mouse neuromuscular junction and the role of choline. Journal of Physiology . 433; 677-704. 1991

ZHANG B., KOH Y.H., BECKSTEAD R.B., BUDNIK V., GANETZKY B. AND BELLEN H.J. synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. Neuron, 21:1465–1475. 1998.

ZHAO S, TING JT, ATALLAH HE. Cell-type Specific Optogenetic Mice for Dissecting Neural Circuitry Function. Nature methods. 8(9):745-752. 2011

ZUBER B., NIKONENKO I., KLAUSER P., MULLER D. AND DUBOCHET J. The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. PNAS. 102; 52. 2005

ZUBER BENOR, IRINA NIKONENKO, PAUL KLAUSE, DOMINIQUE MULLE, AND JACQUES DUBOCHET. The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. 19192–19197; PNAS; vol. 102; no. 52. 2005