



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Fisiologia e Biofísica

## **Dissertação de Mestrado**

**Wallace Lucio de Camargo**


**Efeito duradouro da solução hipertônica sobre o tamanho dos quanta na junção neuromuscular de camundongos com deficiência do transportador vesicular de acetilcolina**

Belo Horizonte

2015

Wallace Lucio de Camargo

**Efeito duradouro da solução hipertônica sobre o tamanho dos quanta na junção neuromuscular de camundongos com deficiência do transportador vesicular de acetilcolina**



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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lígia Araújo Naves

Belo Horizonte

2015

043

Camargo, Wallace Lucio de.

Efeito duradouro da solução hipertônica sobre o tamanho dos quanta na junção neuromuscular de camundongos com deficiência do transportador vesicular de acetilcolina [manuscrito] / Wallace Lucio de Camargo. - 2015.

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

Orientadora: Lígia Araújo Naves. Co-orientador: Christopher Kushmerick.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

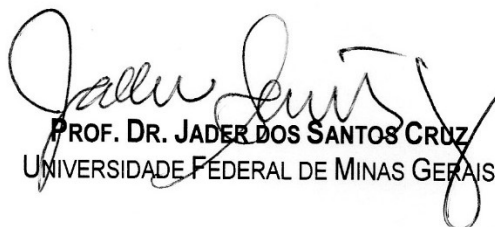
1. Junção neuromuscular - Teses. 2. Acetilcolina - Teses. 3. Soluções hipertônicas - Teses. 4. Proteínas vesiculares de transporte de acetilcolina. 5. Fisiologia - Teses. I. Naves, Lígia Araújo. II. Kushmerick, Christopher. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612


**"EFEITO DURADOURO DA SOLUÇÃO HIPERTÔNICA SOBRE O TAMANHO DOS QUANTA NA JUNCÃO NEUROMUSCULAR DE CAMUNDONGOS COM DEFICIÊNCIA DO TRANSPORTADOR VESICULAR DE ACETILCOLINA"**

**WALLACE LUCIO DE CAMARGO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 29 de outubro de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
PROF. DR. JADER DOS SANTOS CRUZ  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
PROF. DR. THEO ROLLA PAULA MOTA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
PROFA. DR<sup>ª</sup>. LÍGIA ARAÚJO NAVES KUSHMERICK  
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, 29 de outubro de 2015

## 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 Lúgia Araújo Naves, por toda atenção, disponibilidade e conhecimento dedicados durante esses anos. Obrigado pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao Professor Doutor Christopher Kushmerick, por toda atenção, ensinamento e apoio .

Aos meus professores, pelos ensinamentos, dentro e fora de sala, durante todos os anos da minha vida escolar.

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

A minha namorada Natalia Reine por todo amor, carinho e apoio.

Aos meus antigos amigos que sempre se preocuparam e torceram por mim.

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, no seu íntimo, o quanto contribuíram.

## RESUMO

Após a aplicação de solução hipertônica nas sinapses, ocorre aumento duradouro na liberação de neurotransmissores, evidenciado pelo aumento no tamanho dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs). O aumento no tamanho dos quanta foi interpretado como sendo devido à maior incorporação de acetilcolina mediada pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) nas vesículas prontamente disponíveis para liberação, num processo chamado de segundo estágio de preenchimento vesicular. Nosso objetivo foi testar esta hipótese sem a utilização de fármacos, utilizando animais geneticamente deficientes do VACHT, no intuito de pesquisar o papel deste transportador nestas modificações duradouras na neurotransmissão. Nós utilizamos preparações neuromusculares de camundongos C57BL machos, que apresentam reduzida expressão de VACHT (KDVACHT). Para avaliar o desenvolvimento temporal do segundo estágio de preenchimento vesicular, nós utilizamos animais em diferentes idades. Para medida dos MEPPs, utilizamos a técnica de current clamp. Foram registrados cerca de 100 MEPPs durante 300 segundos, em cinco fibras diferentes de cada animal, antes e após o tratamento com solução hipertônica (234 mM de NaCl, 521 mOsmol/kg). Para medida das correntes de placa em miniatura (MEPCs), utilizamos a técnica de voltage clamp e um protocolo semelhante de amostragem. Nós não observamos diferenças significativas no tamanho dos MEPPs dos camundongos KDVACHT quando comparados aos selvagens (WT). Nos animais de 3 meses, após o tratamento hipertônico, a amplitude nos WT passou de  $1,13 \pm 0,19$  mV para  $1,55 \pm 0,13$  mV (n=9) e nos KDVACHT passou de  $0,79 \pm 0,09$  mV para  $1,21 \pm 0,11$  mV (n=5). Nos animais de 12 meses, após o tratamento hipertônico, a amplitude nos WT passou de  $1,29 \pm 0,14$  mV para  $1,69 \pm 0,15$  mV (n=11) e nos KDVACHT passou de  $0,98 \pm 0,14$  mV para  $1,75 \pm 0,15$  mV (n=9). As diferenças entre as medições pré e pós tratamento hipertônico foram estatisticamente significativas nos grupos WT e KDVACHT. Entretanto não houve diferença no aumento dos MEPPs entre estes grupos. Também não observamos diferenças significativas no tamanho das MEPCs entre os grupos WT e KDVACHT sem o tratamento hipertônico. O tamanho das MEPCs nos animais WT foi de  $3,02 \pm 0,19$  nA (n=3), e nos animais KDVACHT foi de  $2,57 \pm 0,23$  nA (n=4). Nós concluímos que a diminuição do VACHT não alterou o segundo estágio de preenchimento vesicular de acetilcolina, o que sugere que o VACHT pode não ser o alvo deste processo, ou que possam existir mecanismos ainda desconhecidos capazes de suprir a redução desta proteína no transporte vesicular.

Palavras-chave: Junção neuromuscular, VACHT, acetilcolina, tratamento hipertônico, camundongo.

## ABSTRACT

After application of hypertonic solution to synapses, there is a long lasting increase in neurotransmitter release, as evidenced by an increase in the size of miniature endplate potentials (MEPPs). The increase in quantal size was interpreted as being due to increased incorporation of the acetylcholine into readily available to release vesicles in a process dependent of the vesicle acetylcholine transporter (VACHT). This process was called vesicle second stage loading. Our goal was to test this hypothesis using non pharmacological tools, in order to study the participation of VACHT in this long lasting changes in neurotransmission. We used neuromuscular preparations from genetically modified C57BL male mice with reduced VACHT expression (KDVACHT). We used animals at two different ages to evaluate the temporal development of second stage loading. To measure MEPPs, we used the current clamp technique. We recorded about 100 MEPPs during 300 seconds at five different fibers of each animal, before and after treatment with hypertonic solution (NaCl 234mM). To measure the MEPCs, we used the voltage clamp technique and a similar sampling protocol. We did not detect significant differences between WT and KDVACHT in MEPP size before and after treatment with hypertonic solution. In WT 3 months old animals hypertonic treatment increased MEPPs from  $1.13 \pm 0.19$  to  $1.55 \pm 0.13$  mV ( $n = 9$ ) and in KDVACHT it increased from  $0.79 \pm 0, 09$  mV to  $1.21 \pm 0.11$  mV ( $n = 5$ ). In 12 months old animals hypertonic treatment increased MEPP amplitude from  $1.29 \pm 0.14$  mV to  $1.69 \pm 0.15$  mV ( $n = 11$ ) and in KDVACHT it increased from  $0.98 \pm 0, 14$  mV to  $1.75 \pm 0.15$  mV ( $n = 9$ ). We did not observe significant differences in the size of MEPCs between WT and KDVACHT mice, when recorded before hypertonic stimulation. MEPCs size in WT animals was  $3.02 \pm 0.19$  nA,  $n = 3$ , while in KDVACHT animals it was  $2:57 \pm 0:23$  nA,  $n = 4$ . We conclude that reducing VACHT did not change second stage loading, which suggests that VACHT is not the target of hypertonic solution effect, or there may be unknown mechanisms to compensate vesicular filling in reduced VACHT animals.

Keywords: neuromuscular junction, VACHT, acetylcholine, hypertonic treatment, mice.



## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Medidas do tamanho, frequência e área das MEPCs dos animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade .....	39
Figura 1 - Registro representativo do fluxo de sinais do modo Current Clamp ...	23
Figura 2 - Registro representativo do fluxo de sinais do modo Voltage Clamp ...	24
Figura 3 - Registros representativos dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) .....	25
Figura 4 - Registro representativo de uma corrente de placa em miniatura (MEPC) .....	26
Figura 5 - Propriedades da liberação quântica em duas faixas etárias em animais selvagens (WT) .....	28
Figura 6 - Histograma do tamanho dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) .....	30
Figura 7 - Tamanho dos MEPPs de animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade .....	31
Figura 8 - Histograma do tamanho dos MEPPs medidos em solução normal, de animais WT ou KDVACHT de 12 meses de idade .....	33
Figura 9 - Tamanho dos MEPPs de animais WT ou KDVACHT de 12 meses de idade .....	34
Figura 10 - Frequência dos MEPPs de animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade .....	35
Figura 11 - Frequência dos MEPPs de animais WT ou KDVACHT de 12 meses de idade .....	36
Figura 12 - Registros representativos mostrando as variações no tamanho das correntes de placa em miniatura (MEPCs) .....	38

Figura 13 - Tamanho das MEPCs de animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade ..... 38

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: Acetilcolina

CHT1: Transportados de colina de alta afinidade 1

DFP: Difenilmetilpiperazínio

EPP: Potencial de placa evocado

GABA: Acido gama aminobutírico

KDVChT: Animais knockdown para o VChT

MEPCs: Correntes de placa em miniatura

MEPPs: Potenciais de placa em miniatura

RP: Reservatório de reciclagem

RrP: Reservatório prontamente liberável

RtP: Reservatório de repouso

RyR: Receptores de rianodina

TTX: Tetrodotoxina

VChT: Transportador vesicular de acetilcolina

WT: Animais selvagens

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 Neurotransmissão .....	2
1.2 Junção neuromuscular .....	4
1.3 Acetilcolina .....	5
1.4 Síntese e armazenamento de acetilcolina .....	6
1.5 Exocitose .....	8
1.6 Contração muscular .....	9
1.7 Liberação quântica .....	10
1.8 Ferramentas farmacológicas que podem interferir na neurotransmissão .....	12
1.9 Plasticidade sináptica .....	13
1.10 VACHT como alvo de estudo .....	16
1.11 Modelo animal KDVACHT e KO VACHT .....	17
1.12 Aumento da liberação de ACh por solução hipertônica .....	18
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Objetivo</b> .....	<b>20</b>
<b>4. Métodos</b> .....	<b>21</b>
4.1 Animais .....	21
4.2 Solução, fármacos e reagentes .....	21

4.3 Solução e preparação do músculo para registro .....	22
4.4 Sistema de perfusão .....	22
4.5 Sistema de registro .....	23
4.6 Eletrofisiologia: Current Clamp .....	24
4.7 Eletrofisiologia: Voltage Clamp .....	24
4.8 Registros eletrofisiológicos dos MEPPs .....	25
4.9 Registros eletrofisiológicos dos MEPCs .....	26
4.10 Análise estatística .....	27
<b>5. Resultados .....</b>	<b>27</b>
5.1 Alterações observadas com a idade .....	27
5.2 Alterações produzidas no tamanho dos quanta pela diminuição do VACHT, observadas aos 3 meses de idade .....	29
5.3 Alterações produzidas no tamanho dos quanta pela diminuição do VACHT, observadas aos 12 meses de idade .....	32
5.4 Alterações produzidas na frequência dos MEPPs pela diminuição do VACHT, observadas aos 3 meses de idade .....	34
5.5 Alterações produzidas na frequência dos MEPPs pela diminuição do VACHT, observadas aos 12 meses de idade .....	36
5.6 Alterações produzidas nas MEPCs pela diminuição do VACHT, observadas aos 3 meses de idade .....	38
<b>6. Discussão .....</b>	<b>42</b>

6.1 Papel do VAcHT na neurotransmissão .....	42
6.2 Segundo estágio de preenchimento vesicular de acetilcolina .....	44
6.3 Papel do VAcHT em outros processos .....	47
6.4 Modificações na neurotransmissão decorrentes da idade .....	49
6.5 Medida das MEPCs .....	54
6.6 Análise estatística .....	56
<b>7. Conclusão .....</b>	<b>58</b>
<b>8. Referências .....</b>	<b>59</b>

## 1 – Introdução

A aplicação de solução hipertônica nas sinapses produz aumento na liberação de neurotransmissores. Nas preparações neuromusculares, este efeito é evidenciado pelo aumento na frequência dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs). Após o retorno da preparação para solução isotônica, observa-se uma redução na frequência dos MEPPs com concomitante aumento nos seus tamanhos. Este aumento de tamanho é bloqueado por drogas que inibem o transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) ou o transporte de colina (YU AND VAN DER KLOOT, 1991). Desta forma, o aumento no tamanho dos quanta foi interpretado como sendo devido à maior incorporação de acetilcolina (ACh) nas vesículas prontamente disponíveis para liberação, num processo chamado de segundo estágio de preenchimento vesicular (VAN DER KLOOT AND MOLGÓ, 1994). Com a descoberta de uma rota preferencial de vesículas recicladas (RICHARDS *et al*, 2000), o fenômeno passou a ser interpretado como um aumento no preenchimento de vesículas recicladas prontamente disponíveis para liberação (VAN DER KLOOT, 2003)

Animais com reduzida expressão de VACHT apresentam reciclagem vesicular normal, entretanto, eles não são capazes de manter a liberação vesicular durante estímulo nervoso (PRADO *et al*, 2006) ou em solução hipertônica (RODRIGUES *et al*, 2013). Estes animais também apresentam reduzida potenciação pós-tetânica (LIMA *et al*, 2010). Todos estes processos sinápticos são modificações plásticas de curto prazo. O efeito de aumento dos quanta após solução hipertônica é prolongado, tendo uma duração de mais de uma hora. Neste trabalho nós estudamos a participação do VACHT neste

processo, no intuito de pesquisar o papel deste transportador em modificações duradouras nas sinapses colinérgicas.

Como vários parâmetros fisiológicos da junção neuromuscular variam com a idade (SMITH, 1984), nós estudamos o efeito da solução hipertônica em animais jovens e idosos, para avaliarmos a evolução temporal deste processo de plasticidade sináptica.

### **1.1 Neurotransmissão**

Todas as nossas sensações e respostas motoras, assim como sentimentos, pensamentos, emoções, aprendizagem e memória dependem da capacidade das células nervosas de se comunicar, recebendo e enviando sinais a todo o momento, que são traduzidos e executados pelos tecidos. Os neurônios podem se comunicar com outros neurônios, com tecidos musculares ou glandulares através de ligações elétricas diretas ou indiretas mediadas por neurotransmissores, que geram potenciais pós-sinápticos. Estes impulsos, se atingirem o limiar, geram sinais propagáveis (potenciais de ação) que trafegam em um emaranhado extremamente organizado de fibras nervosas. Os pontos de comunicação entre as células são chamadas de sinapses. Em mamíferos existem dois tipos de sinapses, as sinapses elétricas e as sinapses químicas (ADISH, 2010; FURSHPAN AND POTTER, 1959; KATZ, 1966). Nas sinapses elétricas, a transmissão ocorre através da passagem de corrente elétrica em canais que ligam uma célula à outra (junções abertas). Essas estruturas podem ser encontradas em muitos tecidos inclusive no coração, fígado e no sistema nervoso.



Nas sinapses químicas, a transmissão depende da liberação de neurotransmissores das terminações nervosas pré-sinápticas, que quando atingem as células pós-sinápticas podem ter efeitos excitatórios, gerando despolarizações nas membranas celulares ou efeitos inibitórios, gerando hiperpolarizações nas membranas celulares. As despolarizações, se atingirem o limiar excitatório, podem elicitar potenciais de ação, e as hiperpolarizações, que tendem a afastar a célula de seu limiar de excitação, inibem a transmissão sináptica. Na maioria das sinapses, o neurotransmissor inibitório não chega a produzir hiperpolarização da membrana, pelo fato do potencial de repouso estar próximo do potencial de equilíbrio do íon permeante no canal aberto pelo neurotransmissor (HORMUZDIA, 2004; KATZ, 1966; PEREDA, 2013). Atualmente, sabe-se da existência de vários tipos diferentes de neurotransmissores (LOVINGER, 2008; SMART AND PAOLETI, 2012) dos quais os mais comuns são a acetilcolina, GABA, serotonina, adrenalina, noradrenalina, glutamato, dopamina, glicina e aspartato. Os neurotransmissores encontram-se empacotados e armazenados dentro de vesículas nos terminais pré-sinápticos dos neurônios. As vesículas são liberadas por exocitose em baixo número e frequência no repouso. Após um potencial de ação, a sinapse libera um grande número de neurotransmissores de forma sincronizadas com a estimulação, liberando grande quantidade de acetilcolina que se liga e ativa seus receptores específicos. As sinapses químicas são mais abundantes que as sinapses elétricas.

## 1.2 Junção neuromuscular

Em mamíferos, as fibras musculares esqueléticas são inervadas por fibras nervosas que se originam dos neurônios motores nos cornos anteriores da medula espinhal (ADRIAN AND BRONK, 1929; DANNY-BROWN, 1929). Na região perto da sua terminação nervosa os axônios perdem sua bainha de mielina e se ramificam na superfície extracelular da fibra muscular formando uma sinapse chamada “junção neuromuscular” ou “placa motora” (ECCLES, 1958; KATZ, 1966; ROBERTSON, 1956). Cada fibra nervosa pode se ramificar e estimular de três a centenas de fibras musculares (ADRIAN, 1929; ENOKA, 1995).

A junção neuromuscular é uma forma de comunicação onde o sistema nervoso se conecta com o sistema muscular via sinapse, composta por terminais pré e pós-sináptico. Os terminais pré-sinápticos armazenam centenas de milhares de vesículas preenchidas com acetilcolina, neurotransmissor presente em neurônios colinérgicos (DEL CASTILLO AND KATZ, 1954a, b; KATZ, 1966; 1971; VAN DER KLOOT AND MOLGO, 1994). O terminal pré-sináptico não faz ligação direta com o terminal pós-sináptico, entre eles existe um espaço em torno de 20 a 30 nanômetros de largura chamada de fenda sináptica (GOYAL AND ARUN, 2013). O terminal pós-sináptico no músculo esquelético é formado por várias invaginações chamadas de dobras juncionais, que aumentam a área de superfície de ação onde o neurotransmissor liberado pode agir. Após liberado para a fenda sináptica, o neurotransmissor pode ligar-se a receptores nicotínicos espalhados por todo terminal pós-sináptico (ZUBER *et al*, 2005; KATZ, 1966; ECCLES, 1958).

### 1.3 Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é uma molécula orgânica composta por um éster de ácido acético e colina. Sua fórmula química é  $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{CH}_3$ <sup>3</sup>. A ACh das sinapses colinérgicas é armazenada nas vesículas com co-transmissores como o ATP e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (MICHAELSON AND ANGEL, 1981; HARLOS *et al*, 1984; STADLER AND TSUKITA, 1984). Em 1914, era conhecido o efeito vaso depressor e a capacidade de estimular nervos simpáticos da acetilcolina (DALE, 1914), que só foi identificada como neurotransmissor por Loewi em 1921 (revisado por KATZ, 1966). Além de ser o neurotransmissor da junção neuromuscular a acetilcolina possui papel fundamental no sistema nervoso autonômico, onde é transmissor das fibras pré e pós ganglionares parassimpáticas e fibras pré-ganglionares simpáticas, controlando várias funções que mantêm a homeostasia (OLSHANSKY *et al*, 2008; MATSUI *et al*, 2000; LECLERE AND LEFEBVRE, 2002). A ACh também participa de processos cognitivos, memória, aprendizado, desenvolvimento do sistema nervoso, desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética (MISGELD *et al*, 2002, BRANDON *et al*, 2003, DE CASTRO *et al*, 2009; BARTUS *et al*, 1982; HASSELMO, 1999).

A ACh dos neurônios colinérgicos ativa suas funções através dos tipos de receptores nicotínicos e muscarínicos, que são distribuídos em vários tipos de células. Os receptores colinérgicos podem ser divididos em dois grupos: receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são ativados quando os neurotransmissores se ligam aos receptores nicotínicos presentes nos canais iônicos musculares, mudando sua conformação estrutural e abrindo-o, ou seja, é uma ativação do canal pelo próprio neurotransmissor.

Os receptores metabotrópicos são receptores que, ao serem ativados, desencadeiam reações intercelulares que ativam os canais iônicos, isso acontece por sistema de “segundos-mensageiros”. (DOË RJE *et al*, 1991; PERALTA *et al*, 1987; PEDERSEN AND COHEN, 1990; SPURNY *et al*, 2015; TALY *et al*, 2009).

#### **1.4 Síntese e armazenamento de acetilcolina**

A acetilcolina da junção neuromuscular de mamíferos é sintetizada no citosol dos terminais pré-sinápticos de neurônios colinérgicos a partir da colina e acetil-coenzima A (Acetil-CoA). A reação que utiliza como doador o acetil-CoA é controlada pela enzima colina acetiltransferase (COLLIER AND KATZ, 1974; POTTER, 1970; RIBEIRO *et al*, 2006). O acetil-CoA é sintetizado na maioria das células, no entanto, a colina é fornecida, pois não pode ser sintetizada pelos tecidos nervosos. A colina é fornecida principalmente da dieta e é transportada para as células nervosas pela corrente sanguínea (SAVENDAHL, 1997, SCAGNELLI *et al.*, 1991; UPADHYAY, 2014). Os neurônios colinérgicos captam de forma a colina através do transportador de colina (CHT1) dependente de Na<sup>+</sup>. Após ser liberada para fenda sináptica a acetilcolina é rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase, formando colina e acetato. O acetato é metabolizado, enquanto a colina é transportada para o citosol do terminal pré-sináptico pelos transportadores CHT1, estando disponível para ser utilizada novamente para formação de novas moléculas de acetilcolina.

Após sua formação, a ACh livre no citoplasma é transportada para dentro de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina

(VACHT), uma proteína contendo 12 domínios transmembrana com massa de 75 KDa (VAROQUI, 1996; KITAMOTO, 1998). O transportador 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<sup>+</sup>, do tipo V-ATPase, também localizada na membrana da vesícula.

Cerca de 500.000 vesículas são acumuladas nos terminais nervosos de uma única placa motora (RIZZOLI AND BETZ, 2005). O diâmetro das vesículas sinápticas varia em torno de 40 nanômetros, são formadas por brotamento do aparelho de Golgi no corpo celular do neurônio motor, na medula espinhal, sendo então transportadas pelo axoplasma onde trafegam do corpo celular até suas terminações nervosas periféricas na junção neuromuscular (MARTINEZ, 2013; GONATAS, 1984; ZHANG, 1998).

Após serem preenchidas com o neurotransmissor, as vesículas são agrupadas no terminal pré-sináptico formando três reservatórios que possuem propriedades funcionais distintas. O reservatório prontamente liberável (Readily Releasable Pool - RRP), forma a primeira linha de vesículas mais próximas do terminal, que são as primeiras a serem liberadas. O reservatório de reciclagem (Recycling Pool - RP) formam uma zona intermediária onde as vesículas são preenchidas com a ACh e o reservatório de repouso (Resting Pool - RtP), zona mais distante da membrana do terminal, onde as vesículas encontram-se vazias (RIZZOLI AND BETZ, 2005, ALABI AND TSIEN, 2012).

## 1.5 Exocitose

As vesículas que formam o RRP são ancoradas em um conjunto de proteínas que evitam a exocitose indesejada (RIZO AND SUDHOF, 2002). As vesículas e a membrana do terminal são interconectadas por um complexo peptídico, que incluem proteínas vesiculares (v-SNARE), compostas pelas proteínas sinaptobrevina, sinaptotagmina, sinaptofisina, sinaptobrevina e a sinapsina. As v-SNAREs se ligam somente nas membranas que possuem as proteínas de membrana específicas (t-SNARE), compostas pelas proteínas neurexina e syntaxina (BROADIE *et al*, 1995; GOULD *et al*, 1987; OYLER *et al*, 1989; SOLLNER *et al*, 1993; TRIMPLE *et al*, 1988; VAN DER KLOOT AND MOLGÓ, 1994; WEBER, *et al*, 1998). As duas SNAREs são conectadas por outras proteínas, compostas pela rab, SNEPs e NSF. Essas conexões são essenciais para a ancoragem e contribuem para a fusão das vesículas (MAYER *et al*, 1996; SORENSEN, 2005; VAN DER KLOOT AND MOLGÓ, 1994).

A liberação vesicular (exocitose) sincronizada é dependente da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol do terminal pré-sináptico pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem. Quando um potencial de ação neuronal despolariza a membrana do terminal pré-sináptico ocorre a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis a voltagem, ocasionando o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro do terminal. O  $\text{Ca}^{2+}$  se liga aos sítios de ligação específicos nas proteínas ancoradoras, modulando-as e desfazendo a ligação das SNAREs. Isto permite que as vesículas possam se fundir com a membrana do terminal pré-sináptico liberando as moléculas de acetilcolina contidas em seu interior para a fenda sináptica. As vesículas podem se fundir totalmente com a membrana do terminal ou podem se fundir

apenas parcialmente (ALABI AND TSIEN, 2012; EGGERMAN *et al*, 2013; ZHANG *et al*, 1998).

Na fenda sináptica, a acetilcolina se liga aos receptores nicotínicos colinérgicos situados no terminal pós-sináptico do músculo. Os receptores nicotínicos da acetilcolina são constituídos por cinco subunidades, dois do tipo  $\alpha$ , um  $\beta$ , um  $\gamma$ , e mais um que pode ser  $\delta$  ou  $\varepsilon$  que formam um canal (LENA AND CHANGEUX, 1997; TALY *et al*, 2009). Cada subunidade  $\alpha$  possui um sítio de ligação para a acetilcolina. Sendo então, necessária a ligação de ACh em ambas as subunidades  $\alpha$  para que o canal se abra. Quando a acetilcolina se liga à subunidade  $\alpha$ , provoca uma mudança conformacional na configuração no canal, resultando em sua abertura. A abertura do canal aumenta a condutância para cátions, principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . O influxo de  $\text{Na}^+$  resulta na despolarização da placa motora das células musculares. Estas despolarizações 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.

## **1.6 Contração muscular**

A contração muscular ocorre a partir de várias etapas de reações, que no final resultam no deslizamento das pontes cruzadas de actina e miosina. Quando a ACh se liga em receptores nicotínicos da placa motora, abrem-se canais para cátions causando despolarizações locais, chamadas de potenciais de placa. Os potenciais de placa, se supralimiais, estimulam a abertura de mais canais de  $\text{Na}^+$  sensíveis à voltagem, que desencadeará um potencial de ação muscular. O potencial de ação muscular se propaga pela membrana da

célula muscular até os túbulos T, onde o ativa os canais sensíveis a voltagem de dihidropiridina. Sua ativação libera moléculas  $\text{Ca}^{2+}$  que se ligam a receptores de rianodina (RyR) do retículo sarcoplasmático. A abertura dos RyR acarretam aumentos da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol das fibras musculares. O  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a seus receptores na troponina C, produzindo alterações conformacionais no complexo troponina – tropomiosina. As alterações fazem com que a tropomiosina que antes bloqueava a interação actina com a miosina, seja liberada pelo seu deslocamento, permitindo então o início do ciclo das pontes cruzadas, ocasionando no deslizamento e aproximação dos sítios da actina e miosina, resultando na contração muscular (ALABI AND TSIEN, 2012; BLOCK *et al*, 1988; DI FRANCO *et al*, 2002; HANSFORD AND LAKATTA, 1987; STOKES AND WAGENKNECHT, 2000). Após o fechamento dos RyR, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  são removidos pela bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA), retirando-o do citosol das fibras musculares, sendo armazenados novamente no retículo sarcoplasmático. A remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol intramuscular resulta no relaxamento da fibra muscular (HANSFORD AND LAKATTA, 1987; STOKES AND WAGENKNECHT, 2000).

### **1.7 Liberação quântica**

Estudos utilizando a junção neuromuscular esclareceram muitas das bases do atual conhecimento da neurotransmissão química. Os primeiros estudos sugeriram que os neurotransmissores eram liberados como se tivessem sido empacotados em pequenas quantidades discretas no terminal pré-sináptico, antes de serem liberados, esses pacotes foram chamados de quantum (DEL CASTILLO AND KATZ, 1954a, b; FATT AND KATZ, 1952).



Posteriormente, a hipótese da liberação quântica foi reforçada pela descoberta da presença de vesículas (HEUSER *et al*, 1979; ROBERTSON, 1956) denominada liberação vesicular. Nesse modelo a resposta quântica seria a resposta pós-sináptica do conteúdo de neurotransmissor de uma única vesícula, enquanto que a liberação de várias dessas vesículas no terminal colinérgico da junção neuromuscular leva à neurotransmissão (DEL CASTILLO AND KATZ, 1954a, b; KATZ 1966; 1971; KATZ AND MILEDI, 1965; 1967a).

Mesmo na ausência de estímulo, pode-se verificar a liberação quântica de neurotransmissores. A placa motora libera pequenas quantidades de vesículas de forma aleatória e espontânea, sendo que cada quantum pode liberar cerca de 7000 – 12000 moléculas de acetilcolina (DUNANT, 1986; KATZ, 1971; KUFFLER AND YOSHJKAIMI, 1975; VAN DER KLOOT, 1991). Essas vesículas liberadas resultam em pequenas despolarizações na membrana das células musculares (em torno de 0,5 mV), essas despolarizações são chamadas de MEPP (potencial de placa em miniatura) (DEL CASTILLO AND KATZ, 1954b; FATT AND KATZ, 1952; KUFFLER AND YOSHJKAIMI, 1975).

Quando ocorre a estimulação do nervo motor, o influxo e aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  no terminal pré-sináptico resulta na excitose de dezenas de vesículas armazenadas (DEL CASTILLO AND KATZ, 1954a; FATT AND; KATZ, 1952; HEUSER *et al*, 1979). Com isto, mais de 50.000 moléculas de acetilcolina são liberadas por estímulo nervoso, e a despolarização produzida na membrana das células musculares são chamadas de EPP (potencial de placa evocado).

Existe também a liberação não quântica de ACh, que seria um vazamento de acetilcolina da placa motora. Essa liberação causa uma despolarização consistente da fibra muscular em torno de 1 a 2 mV (EDWARDS *et al*, 1985; PETROV *et al*, 2011; VAN DER KLOOT AND MOLGO, 1994). Trabalhos anteriores sugerem que o mecanismo de tal vazamento é devido a permanência de algumas cópias do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) na membrana do terminal pré-sináptico, que permanecem por curtos períodos após a fusão das vesículas por exocitose, transportando a acetilcolina do interior do terminal pré-sináptico diretamente para a fenda sináptica (PETROV *et al*, 2011; VAN DER KLOOT AND MOLGO, 1994).

### **1.8 Ferramentas farmacológicas que podem interferir na neurotransmissão**

Existem diferentes mecanismos capazes de modular a neurotransmissão, e tais mecanismos podem atuar na região pós-sináptica, na fenda sináptica ou na região pré-sináptica.

Na região pós-sináptica, a modulação pode ocorrer pelo uso de antagonistas que agem nos receptores nicotínicos de acetilcolina, como por exemplo, utilizando a D-tubocurarina, que é capaz de evitar a contração muscular por bloquear o sítio de ligação da acetilcolina com seu receptor (PATON AND ZAIMIS, 1951; PEDERSEN AND COHEN, 1990; VAN DER KLOOT, 1993). Outro bloqueador pós-sináptico é a  $\mu$ -conotoxina, que bloqueia os canais de sódio musculares e não afeta os canais de sódio pré-sinápticos (SHON *et al*, 1998)

A modulação da fenda sináptica pode ocorrer com o uso de um bloqueador da enzima acetilcolinesterase, responsável pela quebra da molécula de acetilcolina por hidrólise. Substâncias conhecidas como anticolinesterásicos, como a neostigmina e o difenilmetilpiperazínio (DFP) (SINGH AND PRIOR, 1998; VAN DER KLOOT, 1993) podem ser usados para bloquear a ação da acetilcolinesterase, resultando em um aumento na duração e tamanho do potencial de placa motora.

Na região pré-sináptica, estudos anteriores mostraram que é possível modular a neurotransmissão utilizando bloqueadores capazes de reduzir ou até mesmo interromper o preenchimento das vesículas com acetilcolina, como por exemplo, pela redução da atividade da V-ATPase, bomba de H<sup>+</sup> responsável pelo gradiente de H<sup>+</sup> utilizado pelo VACHT ou o uso de vesamicol, capaz de bloquear o VACHT (NAVES AND VAN DER KLOOT, 2001; YU AND VAN DER KLOOT, 1991; VAN DER KLOOT AND MOLGO, 1994).

Fatores que alteram a cinética dos canais de Na<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> pré-sinápticos podem modular a liberação dos neurotransmissores, pois o potencial de ação é determinado por esses canais. O uso de tetrodotoxina (TTX), por exemplo, é usado em experimentos para inibir o potencial de ação muscular e nervoso, pois age bloqueando os canais de sódio dependentes de voltagem (KATZ AND MILEDI, 1968a, 1967b).

## **1.9 Plasticidade sináptica**

O termo plasticidade se aplica a alterações funcionais ou morfológicas de tecidos ou células. Existem vários tipos de plasticidade. Aqui irei citar apenas as que aumentam a liberação do neurotransmissor. Esses fenômenos

podem ser determinados de acordo com sua duração. Os processos são chamados de facilitação, aumento e potenciação pós-tetânica (KATZ AND MILEDI, 1968b; KALKSTEIN AND MAGLEBY, 2004; DAVID AND BARRETT, 2003; VAN DER KLOOT AND MOLGO, 1994).

A facilitação ocorre em intervalos curtíssimos de tempo (milissegundos), é dependente da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e do intervalo de tempo entre os pulsos. Este fenômeno é claramente visto quando o nervo é estimulado duas vezes, com o intervalo de tempo de milissegundos entre o primeiro e o segundo pulso. Quando o segundo potencial de placa evocado (EPP) é maior que o primeiro EPP, dizemos que o EPP foi facilitado. A facilitação do segundo EPP ocorre devido o aumento de concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no interior do terminal pré-sináptico. Se o intervalo de tempo entre os pulsos for curto, o  $\text{Ca}^{2+}$  que entrou no primeiro pulso não tem tempo suficiente para sair totalmente do terminal, em seguida o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do segundo pulso adiciona-se com o restante de  $\text{Ca}^{2+}$  do primeiro pulso, com a concentração aumentada, o  $\text{Ca}^{2+}$  interage com a maquinaria excitotóxica aumentando a liberação quântica (KATZ AND MILEDI, 1968b; RAHAMIMOFF, 1968; BAIN AND QUASTEL, 1992).

A aumento ocorre em intervalos curtos de tempo (segundos), já a potenciação pós-tetânica ocorre à longo prazo (minutos). A aumento e potencialização pós-tetânica têm características muito semelhantes, ambas surgem após um estímulo tetânico prolongado e são dependentes da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  do interior do terminal pré-sináptico (MAGLEBY AND ZENGEL, 1976). A diferença entre esses fenômenos é que a aumento retorna aos níveis normais em um intervalo menor de tempo (segundos), enquanto que a potenciação pós-tetânica é mais duradoura (minutos), por esse

motivo o fenômeno é chamado de potenciação pós-tetânica (MAGLEBY AND ZENGEL, 1976). A potenciação pós-tetânica pode ser avaliada pela frequência dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) ou pela amplitude dos EPP após o estímulo tetânico (MAGLEBY. AND ZENGEL, 1976; DAVID AND BARRETT, 2003; YAMASHITA AND OOTA, 1987). Esse fenômeno é gerado devido o aumento prolongado da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular no terminal pré-sináptico. O responsável pela manutenção dos níveis elevados de  $Ca^{2+}$  intracelular é a mitocôndria, que armazena  $Ca^{2+}$  durante estímulo prolongado e o libera gradualmente (DAVID AND BARRETT, 2003).

### **1.10 VACHT como alvo de estudo**

Estudos anteriores vêm demonstrando a possibilidade de aumentar o tamanho dos quanta através do aumento da quantidade de acetilcolina armazenada em cada vesícula (VAN DER KLOOT AND VAN DER KLOOT 1986; VAN DER KLOOT *et al*, 1998; YU AND VAN DER KLOOT, 1991). Esses achados levantam a possibilidade de alterar a eficiência sináptica pela alteração do preenchimento vesicular resultando no aumento do tamanho dos quanta, o que seria uma estratégia terapêutica para o tratamento de doenças caracterizadas pela deficiência na liberação de acetilcolina, como a doença de Huntington, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e síndrome miastênica (ANDERSEN *et al*, 2005; BARTUS *et al*, 1982; SMITH *et al*, 2006; PINTO *et al*, 1998).

Os mecanismos de preenchimento vesicular não estão totalmente esclarecidos, mas dados anteriores indicam um papel essencial do VACHT no processo de preenchimento vesicular e regulação do tamanho dos quanta

(WILLIAMS, 1997). Estudos anteriores mostram que o bloqueio da ação do VACHT usando vesamicol resulta na diminuição do preenchimento vesicular (NAVES AND VAN DER KLOOT, 2001; VAN DER KLOOT, 2003; YU AND VAN DER KLOOT, 1991). Mas sempre existem limitações com o uso de fármacos. Além de inibir o VACHT, o vesamicol pode apresentar efeitos não específicos no bloqueio do receptor nicotínico pós-sinápticos e nos  $\alpha$ -adrenoreceptores (BUCKINGHAM *et al*, 1993; WANNAN *et al*, 1991). Com isso, foi motivada a procura por métodos alternativos para o estudo do papel do VACHT no preenchimento vesicular.

### **1.11 Modelo animal KDVACHT e KO VACHT**

Os camundongos geneticamente modificados KDVACHT, apresentam cerca de 70% de redução na expressão da proteína VACHT (PRADO *et al*, 2006). Considerando que vesículas sinápticas obtidas de animais selvagens (WT) apresentam, em media, quatro copias do VACHT, é de se esperar que as vesículas de animais KDVACHT teriam apenas uma, ou até nenhuma copia. Esses animais modificados chegam à fase adulta, mas apresentam disfunções cardíacas, alterações cognitivas e uma deficiência na transmissão neuromuscular caracterizada pela redução na liberação quântica, tanto no tamanho quanto na frequência dos quanta, observados através de uma diminuição da frequência e do tamanho dos potenciais de placa em miniatura (LIMA *et al*; 2010), que resulta na diminuição da performance motora e uma grave deficiência na força de contração muscular (PRADO *et al*, 2006; DE CASTRO *et al*, 2009; LARA *et al*, 2010).

Os camundongos KO VAcHT, que não expressam a proteína transportadora vesicular, apesar de terem a reciclagem vesicular normal e a capacidade de estocar e liberar o neurotransmissor em resposta a atividade neural, apresentam limitações experimentais, pois morrem minutos após o nascimento (DE CASTRO *et al*, 2009). Isto demonstra a importância do VAcHT para o desenvolvimento da neurotransmissão.

### **1.12 Aumento da liberação de ACh por solução hipertônica**

O terminal nervoso motor, quando imerso em uma solução hipertônica (utilizando cloreto de sódio ou gluconato de sódio), produz aumento na frequência e no tamanho dos MEPPs. Após retorno para solução isotônica a frequência diminui mas o tamanho dos MEPPs permanece aumentado (VAN DER KLOOT, 1993; YU AND VAN DER KLOOT, 1991). Os mecanismos envolvidos não são bem esclarecidos. Em uma pesquisa, os autores sugeriram que o aumento da frequência dos MEPPs está relacionado com a força eletrostática presente na superfície do terminal sináptico. No terminal sináptico em repouso, as cargas das vesículas preenchidas com acetilcolina e os locais onde são excitadas têm o mesmo sinal (negativo) se repelindo pela força eletrostática formando assim uma barreira. Ocasionalmente, algumas vesículas tem força cinética suficiente para passar através dessa barreira e se fundir em determinados pontos da membrana do terminal. Na presença da solução hipertônica ocorre um aumento na força iônica no terminal nervoso, causando uma diminuição na força da barreira eletrostática e aumentando a frequência de liberação vesicular (RODRIGUES *et al*, 2013; KITA AND VAN DER KLOOT, 1976). O aumento no tamanho dos MEPPs na presença da solução hipertônica

é explicado devido ao aumento na concentração de Na<sup>+</sup> na fenda sináptica, ocasionando maiores despolarizações na membrana muscular (VAN DER KLOOT, 1987; YU AND VAN DER KLOOT, 1991). A provável via de ativação é através da ativação da proteína kinase A. (VAN DER KLOOT, 1993; VAN DER KLOOT AND BRANISTEANU, 1992).

O tratamento com solução hipertônica é reversível. Após retornar à solução isotônica, a frequência dos MEPPs diminui, mas o tamanho dos quanta permanece aumentado por cerca de uma hora após o tratamento (YU; VAN DER KLOOT, 1991). Estudos sugerem que a provável causa do aumento é a liberação de mais acetilcolina, portanto o tratamento promove uma adição de acetilcolina por quanta. Esta interpretação se apoia no fato de que o aumento no tamanho dos MEPPs é bloqueado na presença de inibidores do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) como o vesamicol, tetrafenilboron e hexanitrodifenilamina (BUCKINGHAM, 1993; YU AND VAN DER KLOOT, 1991; VAN DER KLOOT, 1998).

## **2 – Justificativa**

O animal KDVACHT apresenta redução da expressão do transportador vesicular (VACHT). Quando comparados com animais selvagens (WT), os KDVACHT apresentam cerca de 70% de redução da proteína VACHT na medula espinhal, córtex, estriado e hipocampo (PRADO *et al*, 2006). Isto faz com que este tipo animal se torne uma oportunidade para estudar o efeito e a importância do VACHT na função da sinapse colinérgica.

Testes utilizando o tratamento com solução hipertônica em animais selvagens mostram um aumento no preenchimento de acetilcolina pelas



vesículas. Após o tratamento utilizando cloreto de sódio (NaCl), foi visto aumento de duas vezes no tamanho dos quanta, enquanto que quando utilizado gluconato de sódio ( $\text{NaC}_6\text{H}_{11}\text{O}_7$ ) o aumento foi de até quatro vezes (YU; VAN DER KLOOT, 1991). Esses resultados não são vistos na presença de vesamicol (bloqueador do VAcHT). Esses dados sugerem que o VAcHT tem papel fundamental na maquinaria de preenchimento vesicular e que essa maquinaria pode ser modulada de acordo com sua necessidade. A utilização de modelo animal geneticamente modificado nos permite verificar a participação do VAcHT como mecanismo pré-sináptico capaz de regular o preenchimento das vesículas sem a utilização de fármacos, que têm a desvantagem de poder agir e alterar a função de outras proteínas que podem interferir nos resultados. Portanto, utilizando esse modelo buscamos, caracterizar a importância do VAcHT como modulador do mecanismo de preenchimento vesicular no complexo neuromuscular, em animais de diferentes idade

### **3 – Objetivo**

Este trabalho testa a hipótese de que o VAcHT é o alvo das modificações produzidas no tamanho dos quanta após estímulo com solução hipertônica utilizando métodos não farmacológicos. Portanto, nosso objetivo é verificar as alterações no preenchimento vesicular após submissão ao tratamento com solução hipertônica em animais que possuem alterações na expressão do transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT).

Objetivos específicos:

- Verificar alterações na frequência e tamanho dos MEPPs em diferentes idades.

- Verificar as proporções de variação na frequência e tamanho dos MEPPs após estímulo com solução hipertônica nos grupos controle e KDVACHT.

- Verificar a frequência e tamanho das respostas quânticas em repouso no grupo controle e KDVACHT, utilizando medidas de corrente.

## **4 - Métodos**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL KDVACHT e WT de sexo masculino, em duas idades: 3 e 12 meses. Os animais foram mantidos em microisoladores sob ar filtrado, temperatura 23° e ciclo vigília de claro escuro 12h/12h, fornecidos pelo Laboratório de Criação de Camundongos do ICB – UFMG e mantido no Biotério de Camundongos do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFMG (protocolo número 106/2015).

### **4.2 Solução, fármacos e reagentes**

Todos os fármacos e sais utilizados 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 solução em mM: NaCl (134), KCl (5), CaCl<sub>2</sub> (2), MgCl<sub>2</sub> (1), NaHCO<sub>3</sub> (11), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1), D-Glicose (11) e PH a 7.4. Para o tratamento usando solução hipertônica, alteramos a concentração de NaCl para 234 Mm (521 mOsmol). Utilizamos 100 nM de tetrodotoxina na solução para evitar a contração muscular.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após eutanásia, a região torácica e abdominal foi aberta cirurgicamente para retirada do diafragma. Em seguida, o diafragma foi dividido ao meio, não havendo preferência para o lado a ser usado. O hemidiafragma era fixado com pequenos alfinetes, em câmara de acrílico contendo Sylgard no fundo, a câmara tinha capacidade de 5 ml, contendo solução Tyrode. Após cirurgia, o tecido era mantido em solução Tyrode borbulhado com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) em todo procedimento experimental e a temperatura ambiente variava entre 22 a 24° C.

### **4.4 Sistemas de perfusão**

O sistema de perfusão era composto por um recipiente suspenso (via A), com capacidade para 500 ml, fixado a uma torre capaz de prover, via gravidade, um fluxo contínuo de solução Tyrode na razão de 1,0 ml/min. Um segundo recipiente (via B), também fixado a torre de perfusão, com capacidade para 60 ml era preparado, contendo solução hipertônica, onde também provinha um fluxo na razão de 1,0 ml/min. A solução Tyroide era sugada

através de uma bomba peristáltica por um tubo localizado na parte superior da câmara de registro ajustada para manter a quantidade de 5 ml em seu interior.

No primeiro momento a via A ficava aberta perfundindo o musculo continuamente, após coletado os registros eletrofisiológicos basais a via A era fechada e imediatamente a via B era aberta para inicializar o tratamento hipertônico, após 30 minutos a via B era fechada e imediatamente a via A era aberta retornando com a solução Tyrode para lavagem e coleta dos registros após o tratamento com solução hipertônica.

#### **4.5 Sistema de registro**

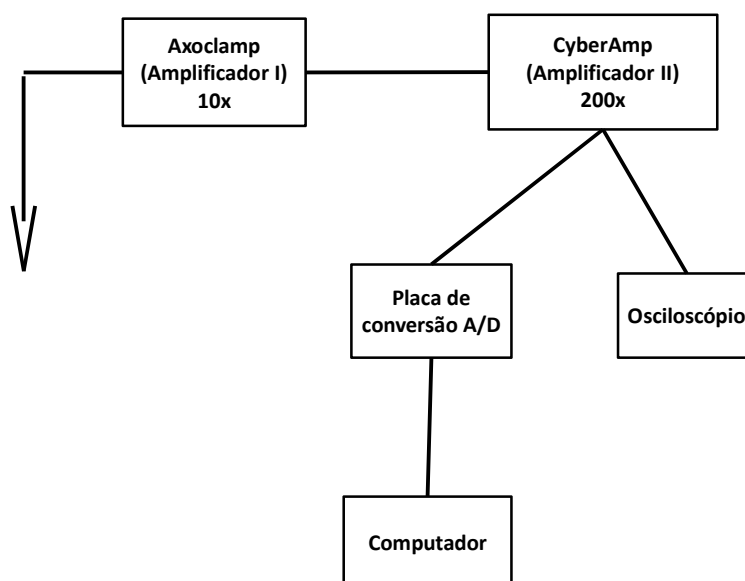
O sistema de registro possuía os seguintes equipamentos:

- Osciloscópio GW -INSTEK (GDS-2102)
- Micromanipulador Siskiyou (MC1000 E-R/T)
- Microscópio JENCO (GL7 – 290)
- Amplificador Axon Instruments (Axoclamp-2A)
- Amplificador II Axon Instruments (Cyber Amp 320)
- Conversor BCN National Instruments (BNC2090)
- Microcomputador com o Software WinEDR
- Câmara de acrílico contendo Sylgard 184 em sua base
- Microeletrodos de registro World Precision Instruments (Barosilicato modelo 1B150 F)
- Câmera DAGE – MTI (IR-1000)

A preparação neuromuscular era montada sobre uma mesa antivibratória, contendo um suporte para fixar a câmara de acrílico com o tecido, eletrodos de registro, micromanipuladores e microscópio.

#### 4.6 Eletrofisiologia: Current Clamp

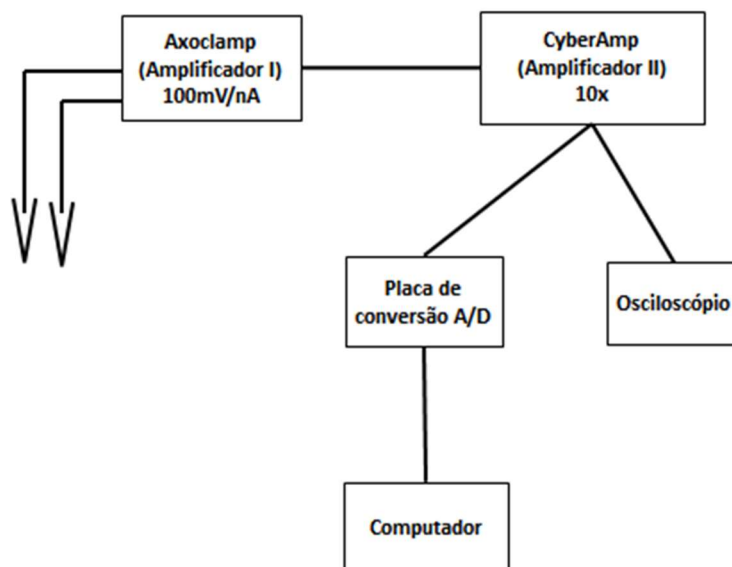
Através do microeletrodo de registro é possível registrar a diferença do potencial transmembrana (potencial de repouso) e os potenciais de placa em miniatura (MEPPs). Os sinais obtidos são enviados ao amplificador I, configurado para amplificar os sinais em 10x, sendo enviados direto para o amplificador II, configurado para amplificar em 200x o sinal. 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 WinEDR (Strathclyde Electrophysiology Software, cortesia de John Dempster). Os dados foram filtrados na faixa de 0.1 – 1000 Hz. A amostragem foi de 20 KHz.



**Figura 1** – Registro representativo do fluxo de sinais do modo Current Clamp.

#### 4.7 Eletrofisiologia: Voltage Clamp

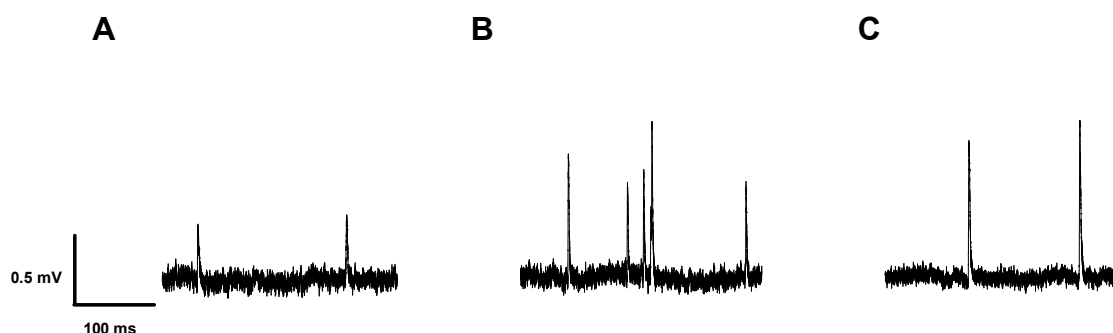
Através dos microeletrodos de registro é possível registrar a diferença do potencial transmembrana (potencial de repouso) e as correntes de placa em miniatura (MEPCs). Os sinais obtidos são enviados ao amplificador I, que amplifica e converte os sinais obtidos em milivolts para nanoampéres. Após convertidos os sinais vão direto para o amplificador II, configurado para amplificar os sinais em 10x. Foram utilizadas duas saídas do amplificador II: A) para o osciloscópio permitindo visualização dos sinais. B) para o conversor analógico digital. Ao serem convertidos os sinais digitalizados foram registrados pelo programa WinEDR (Strathclyde Electrophysiology Software, cortesia de John Dempster). Os dados foram filtrados na faixa de 0,1 – 1000 Hz. A amostragem foi de 20 KHz.



**Figura 2** – Registro representativo do fluxo de sinais do modo Voltage Clamp

#### 4.8 Registros eletrofisiológicos dos MEPPs

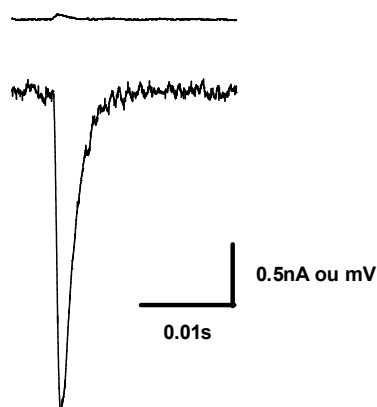
Utilizamos o modo de current clamp para medir os potenciais de placa em miniatura (MEPPs), onde, um microelétrodo era acoplado em um probe, interconectado a um amplificador, que era inserido na fibra muito próximo a junção neuromuscular do hemi diafragma para captação das despolarizações geradas pela liberação espontânea de ACh (MEPPs). Os MEPPs foram avaliados pela técnica de micropunção (empalamento) onde são medidas as variações de voltagem intracelulares. A técnica permite a gravação precisa e em tempo real dos eventos. Utilizamos um protocolo onde eram registrados cerca de 100 MEPPs em cerca de 300 segundos (tempo estimado por conter mais de 100 MEPPS) em cinco fibras diferentes antes e após o tratamento com solução hipertônica em cada animal. Foram avaliados as frequências e o tamanho dos MEPPs. O erro nas amplitudes dos MEPPs devido à alterações dos potenciais de repouso foram corrigidos utilizando a formula  $(-70-(0))/(mV-(0))$ . Utilizando o potencial de repouso padrão de -70 mV, potencial de reversão (de 0 mV) e o potencial de repouso da membrana celular (mV). (formula fornecida pelo professor Dr. Christopher Kushmerick).



**Figura 3** – Registros representativos dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) utilizando a técnica de current clamp. A) Registro basal dos MEPPs. B) Registro dos MEPPs durante o tratamento com solução hipertônica (234 mM, 521 mOsmol) C) Registro dos MEPPs após o tratamento com solução hipertônica.

#### 4.9 Registros eletrofisiológicos dos MEPCs

Utilizamos o modo de voltage clamp para medir as correntes de placa em miniatura (MEPCs), onde, um microelétrodo era acoplado em um probe, interconectado a um amplificador era inserido na fibra muito próximo a junção neuromuscular do hemi diafragma, com a função de injetar a corrente necessária para manter o potencial de repouso clampeado no valor padrão estipulado. Um segundo microeletrodo, também interconectado a um probe e ao amplificador era inserido na mesma fibra bem próximo a junção neuromuscular para captação dos eventos (MEPCs) da fibra muscular. Os MEPCs foram avaliados pela técnica de micropunção (empalhamento) onde são medidas as corrente iônicas geradas pela abertura do canal nicotínico pós-sináptico. A técnica permite a gravação precisa em tempo real das correntes. Utilizamos um protocolo onde eram registrado cerca de 100 MEPCs em cerca de 300 segundos (tempo estimado por conter mais de 100 MEPCs) em cinco fibras diferentes. Foram avaliados as frequências e o tamanho dos MEPCs.



**Figura 4** - Registro representativo de uma corrente de placa em miniatura (MEPC). Superior: mostrando escape típico,  $< 0,1 \text{ mV}$ . Inferior, mostrando corrente típica.



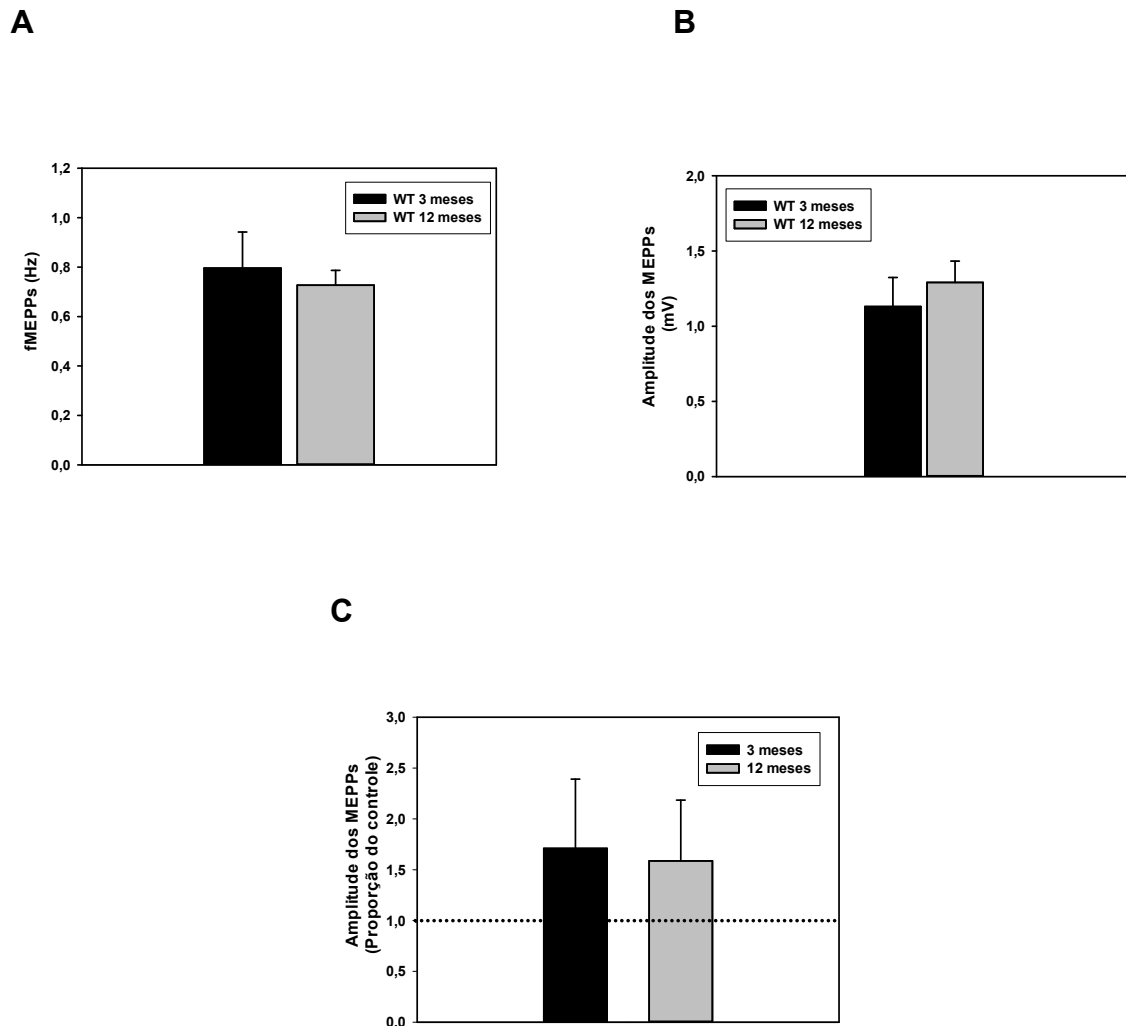
#### **4.10 Análise estatística**

A significância estatística foi determinada pelo teste t de Student. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando o valor de p for  $<0,05$ .

### **5-Resultados**

#### **5.1 Alterações observadas com a idade**

Foi mostrado que o tamanho e frequência dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) apresentam variações com a idade (SMITH, 1979). Nós estudamos o efeito do tratamento com solução hipertônica em diferentes idades nos animais selvagens (WT). Na figura 5, a frequência basal aos 3 meses de idade foi de  $0,79 \pm 0,14$  Hz (média  $\pm$  EPM), enquanto que aos 12 meses os valores foram de  $0,72 \pm 0,05$  Hz. O tamanho dos MEPPs, aos 3 meses, foi de  $1,13 \pm 0,19$  mV, enquanto que aos 12 meses foi de  $1,29 \pm 0,14$  mV. Após tratamento hipertônico, o tamanho passou de  $1,13 \pm 0,19$  mV para  $1,55 \pm 0,13$  mV (n=9), nos animais de 3 meses, uma variação de  $71 \pm 68\%$  (média  $\pm$  IC95%). Aos 12 meses, o tamanho passou de  $1,29 \pm 0,14$  para  $1,69 \pm 0,52$  (n=11) um aumento de  $59 \pm 60\%$ . Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de frequência, tamanho ou no efeito da solução hipertônica no tamanho dos MEPPs entre os grupos de 3 e 12 meses de idade.

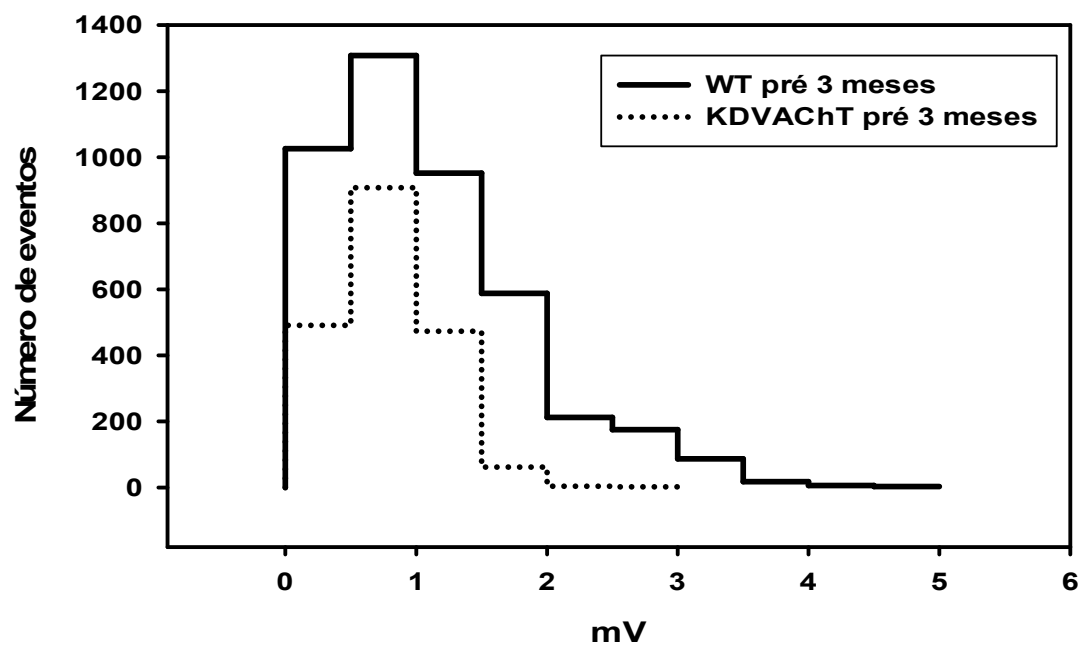


**Figura 5** – Propriedades da liberação quântica em duas faixas etárias em animais selvagens (WT). Frequência (A) e tamanho (B) dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) de animais de 3 ou 12 meses de idade. As barras representam as médias  $\pm$  EPM.  $P > 0.05$ . (C) Efeito da solução hipertônica sobre o tamanho dos MEPPs, medida em solução Tyroide. As barras representam as médias  $\pm$  IC95%.  $n=9$  (3 meses) ou (12 meses).

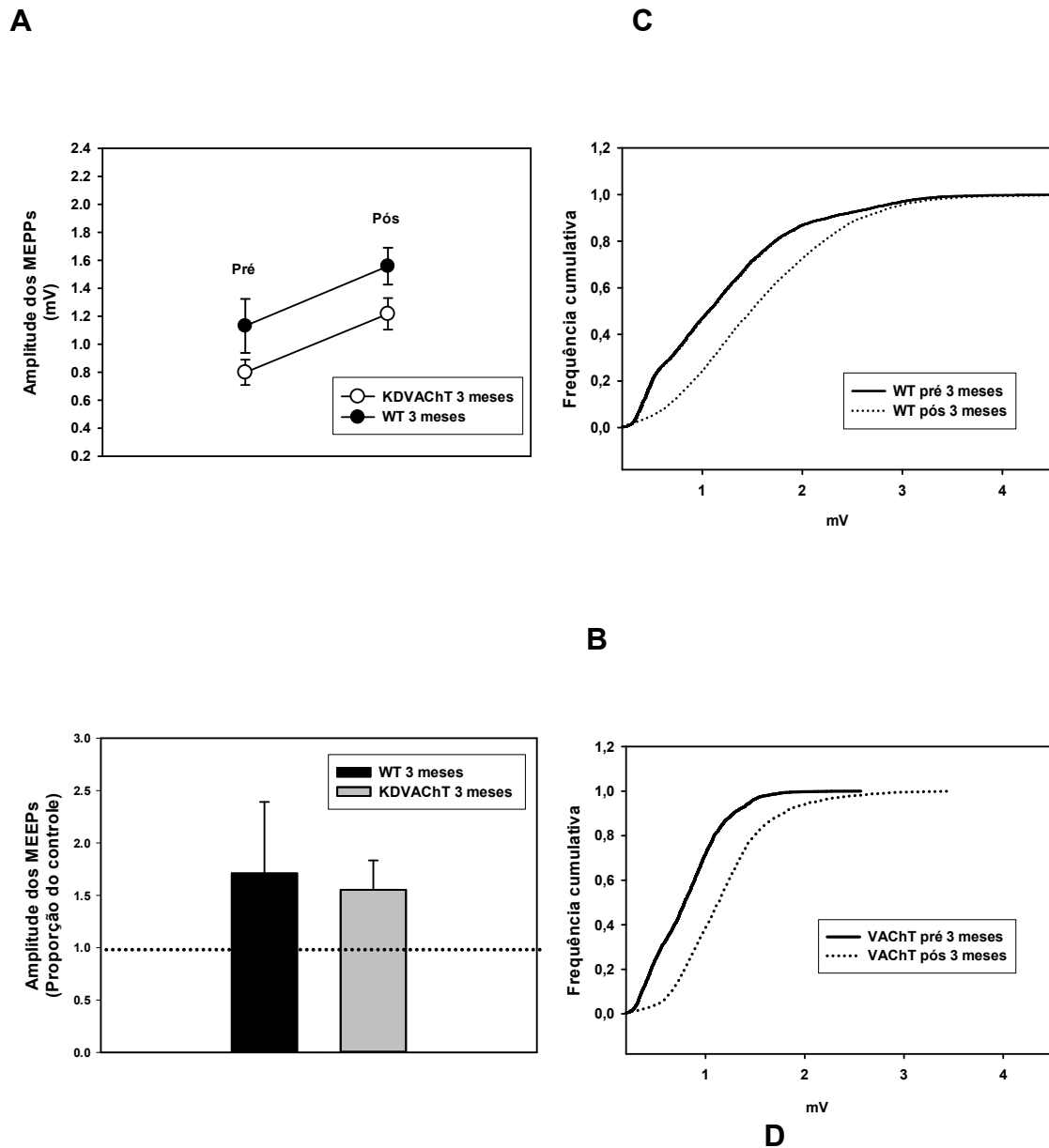
## 5.2 Alterações produzidas no tamanho dos quanta pela diminuição do VACHT, observadas aos 3 meses de idade.

Vários estudos mostram a importância do VACHT no preenchimento vesicular de ACh (NAVES AND VAN DER KLOOT, 2001; PRADO *et al*, 2006; VAN DER KLOOT, 1991; 1998; WILLIAMS, 1997; YU AND VAN DER KLOOT, 1991; VAN DER KLOOT, 1991). Estes trabalhos citados acima, mostraram que o vesamicol e outros bloqueadores do transportador vesicular de ACh alteram a

resposta do tratamento hipertônico, sugerindo um papel do VACHT neste processo. Nós testamos esta hipótese utilizando animais geneticamente modificados com aproximadamente 70% a menos de VACHT. A figura 6 mostra um histograma do tamanho dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) nos KDVAChT e WT de 3 meses de idade. Estas medições foram realizadas antes do tratamento hipertônico. Na figura 7A, após o tratamento hipertônico, o tamanho nos WT passou de  $1,13 \pm 0,19$  mV para  $1,55 \pm 0,13$  mV (n=9) e nos KDVAChT passou de  $0,79 \pm 0,09$  mV para  $1,21 \pm 0,11$  mV (n=5). Não foi observada diferença significativa no tamanho dos MEPPs entre os animais selvagens (WT) e KDVAChT de 3 meses de idade. Na figura 7B, foi feita a normalização destes dados, dividimos a média do tamanho dos MEPPs após o solução hipertônica pela média do tamanho dos MEPPs antes da solução hipertônica. Observamos que o tratamento hipertônico foi capaz de aumentar o tamanho dos MEPPs em  $71 \pm 68\%$ , nos animais WT e em  $55 \pm 28\%$  nos animais KDVAChT. Entretanto não houve diferença significativa no efeito da solução hipertônica no tamanho dos MEPPs entre os grupos WT e KDVAChT. A figura 7C mostra um gráfico de frequência cumulativa da amplitude dos MEPPs antes e após o tratamento com solução hipertônica nos animais WT de 3 meses de idade. Foi observada uma variação no tamanho dos MEPPs após o tratamento com solução hipertônica. Na figura 7D, verificamos o efeito no tamanho dos MEPPs após o tratamento com solução hipertônica em animais KDVAChT de 3 meses de idade, onde foi observada uma variação no tamanho dos MEPPs.



**Figura 6** – Histograma do tamanho dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) medidos em solução Tyroide, de animais selvagens (WT) ou geneticamente modificados (KDVACHT) de 3 meses de idade.

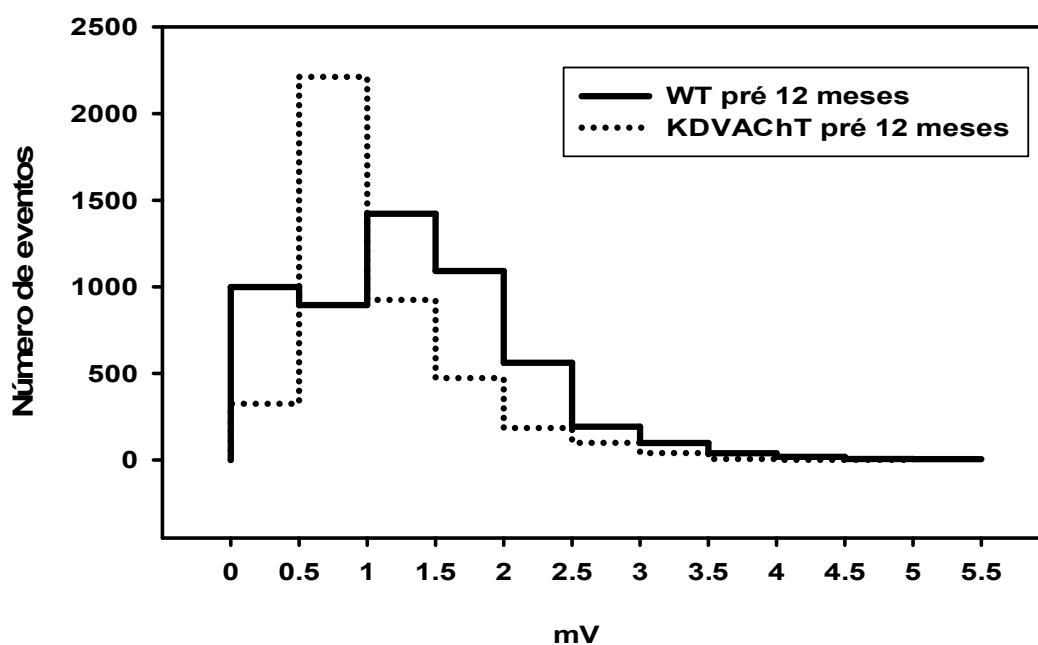


**Figura 7** – Tamanho dos MEPPs de animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade, medida em solução Tyroide, antes (pré) e após tratamento com solução hipertônica. A) Os pontos representam as médias  $\pm$  EPM. B) As barras representam as médias do tamanho normalizadas  $\pm$  IC95%. n=9 (WT) e n=5 (KDVACHT). C) Frequência cumulativa do tamanho dos MEPPs nos WT, antes (pré, n=4375) e após solução hipertônica (n=4226). (D) Frequência cumulativa do tamanho dos MEPPs nos animais KDVACHT antes (pré, n=1939) e após solução hipertônica (n=1899).

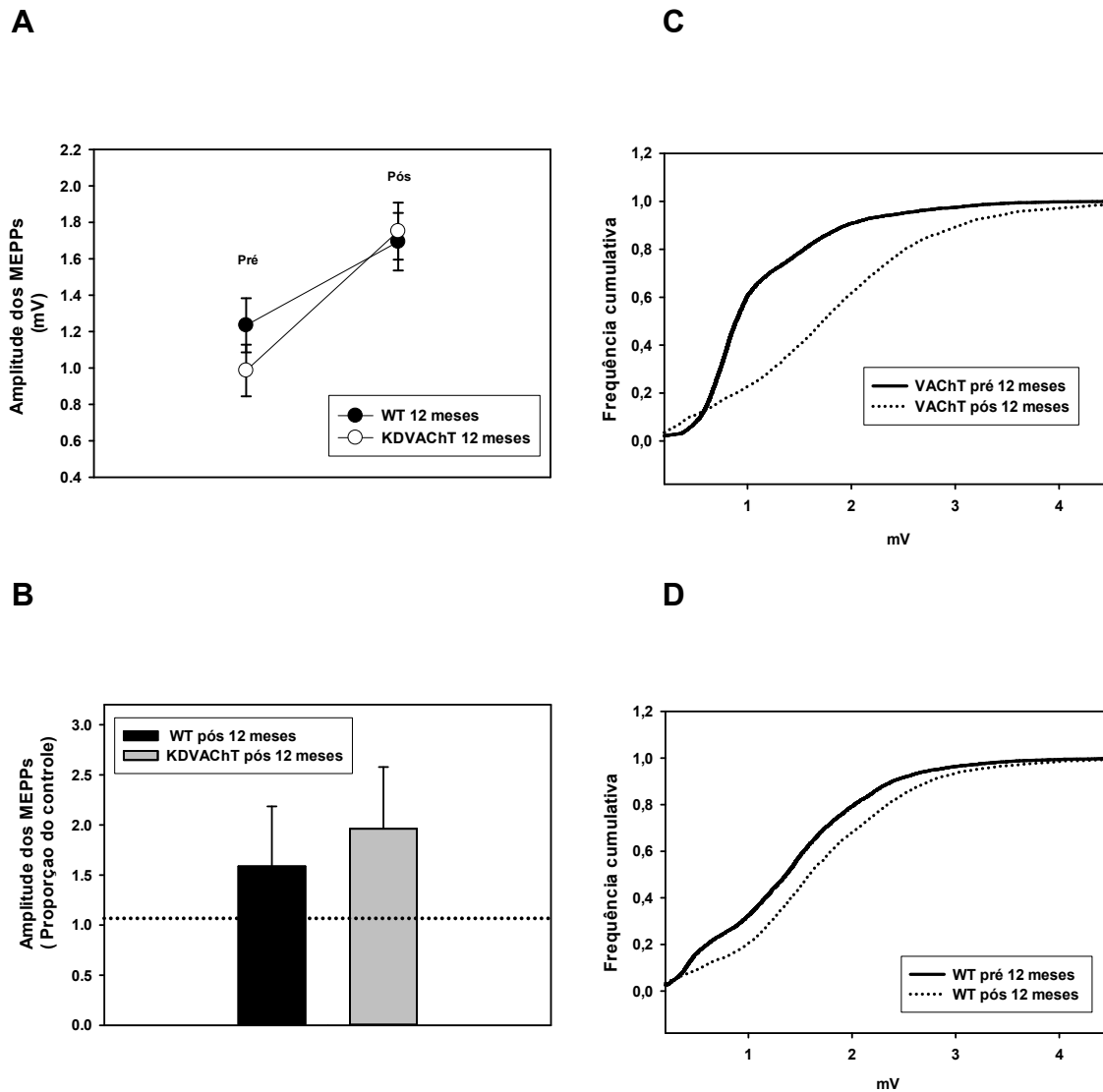
### **5.3 Alterações produzidas no tamanho dos quanta pela diminuição do VACHT, observadas aos 12 meses de idade.**

Foi estudado o efeito do tratamento após solução hipertônica, em animais de 12 meses de idade WT e KDVAChT, para verificar se há variações decorrentes ao envelhecimento. A figura 8 mostra os histogramas do tamanho dos potenciais de placa em miniatura (MEPPs) nos KDVAChT e WT de 12 meses de idade. Estas medições foram realizadas em solução Tyroide, antes do tratamento hipertônico. Na figura 9A, após o tratamento hipertônico, o tamanho nos WT passou de  $1,29 \pm 0,14$  mV para  $1,69 \pm 0,15$  mV (n=11) e nos KDVAChT passou de  $0,98 \pm 0,14$  mV para  $1,75 \pm 0,15$  mV (n=9). Não foi observada diferença significativa no tamanho dos MEPPs antes do tratamento com solução hipertônica, entre os animais selvagens (WT) e KDVAChT de 12 meses de idade. Na figura 9B, onde foi feita a normalização destes dados, dividimos a média do tamanho dos MEPPs após o solução hipertônica pela média do tamanho dos MEPPs antes da solução hipertônica. Observamos que o tratamento hipertônico foi capaz de modificar o tamanho dos MEPPs em  $58 \pm 0,59\%$ , nos animais WT e em  $96 \pm 61 \%$  nos animais KDVAChT. Entretanto não houve diferença significativa no efeito da solução hipertônica entre os grupos WT e KDVAChT. A figura 9C mostra um gráfico de frequência cumulativa do tamanho dos MEPPs antes e após o tratamento com solução hipertônica nos animais WT de 12 meses de idade. Foi observada uma variação no tamanho dos MEPPs após o tratamento com solução hipertônica. Na figura 9D, o gráfico de frequência cumulativa mostra o efeito no tamanho dos MEPPs após o tratamento com solução hipertônica em animais KDVAChT

de 12 meses de idade onde foi observada uma variação no tamanho dos MEPPs .



**Figura 8-** Histograma do tamanho dos MEPPs medidos em solução normal, de animais WT ou KDVACHT de 12 meses de idade.



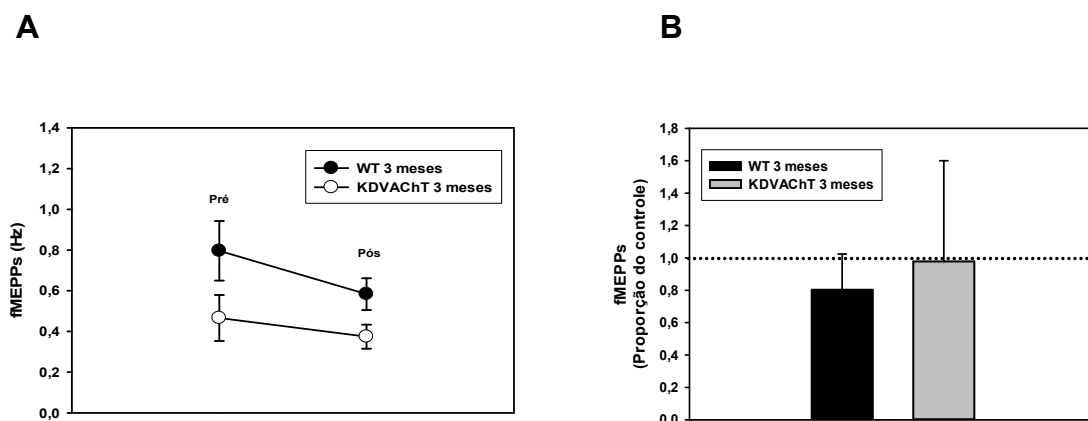
**Figura 9** – Tamanho dos MEPPs de animais WT ou KDVACHT de 12 meses de idade, medida em solução Tyroide, antes (pré) e após tratamento com solução hipertônica. A) As barras representam as médias  $\pm$  EPM. B) As barras representam as médias do tamanho normalizadas  $\pm$  1C95%.  $P > 0.05$ . (C) Frequência cumulativa do tamanho dos MEPPs nos animais WT ( $n=5327$  e  $5050$ ). (D) Frequência cumulativa do tamanho dos MEPPs nos animais KDVACHT ( $n=4267$  e  $3342$ ).

#### 5.4 Alterações produzidas na frequência dos MEPPs pela diminuição do VACHT, observadas aos 3 meses de idade.

Em um estudo anterior, foi observada uma diminuição na frequência de liberação quântica em animais geneticamente modificados (KDVACHT) durante a estimulação da liberação quântica, utilizando solução hipertônica contendo sacarose (RODRIGUES *et al*, 2013). Tal fenômeno poderia estar associado



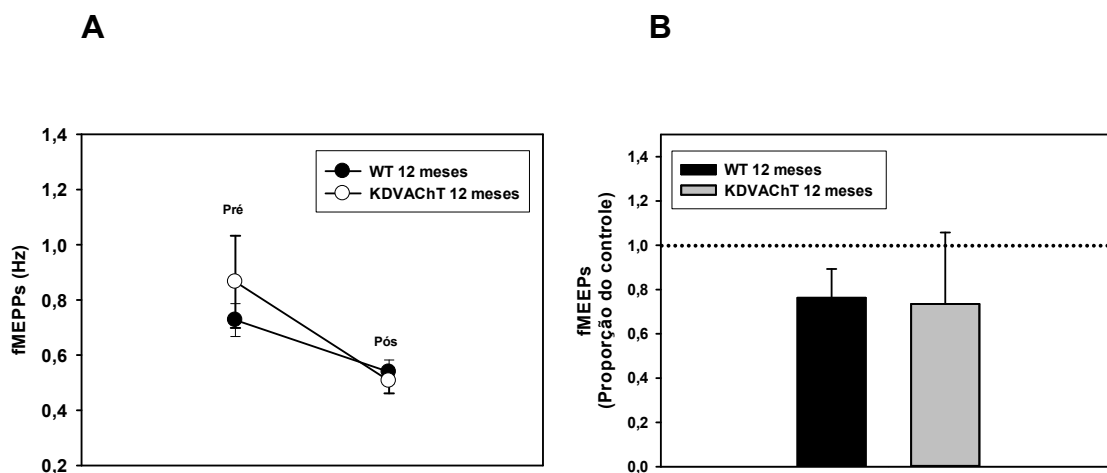
com vesículas que sofreram pouco ou nenhum preenchimento devido a diminuição do número de cópias da proteína responsável pelo transporte de ACh vesicular. Nós estudamos o efeito na frequência dos MEPPs após tratamento com solução hipertônica nestes animais. A figura 10A, mostra que não foi observada diferença significativa na frequência dos MEPPs antes e após o tratamento com solução hipertônica nos animais KDVACHT de 3 meses de idade quando comparados aos WT. A frequência nos WT passou de  $0,79 \pm 0,14$  Hz para  $0,58 \pm 0,07$  Hz após o tratamento com solução hipertônica e os KDVACHT passou de  $0,46 \pm 0,11$  Hz para  $0,37 \pm 0,05$  Hz após o tratamento com solução hipertônica. Na figura 10B, foi feita a normalização destes valores, dividimos a média da frequência dos MEPPs após o solução hipertônica pela média da frequência dos MEPPs antes da solução hipertônica. Não foi observada diferença significativa na frequência dos MEPPs após o tratamento hipertônico de cada grupo individual e entre os grupos WT e KDVACHT. A variação da frequência antes e após o tratamento hipertônico dos WT foi de  $80 \pm 22\%$  Hz enquanto que nos KDVACHT foi de  $97 \pm 62\%$  %.



**Figura 10** - Frequência dos MEPPs de animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade, antes (pré) e após tratamento com solução hipertônica. A) Os pontos representam as médias  $\pm$  EPM. B) As barras representam as médias  $\pm$  IC95%. N=9 (WT) ou 5 (KDVACHT).

### 5.5 Alterações produzidas na frequência dos MEPPs pela diminuição do VAcHt, observadas aos 12 meses de idade.

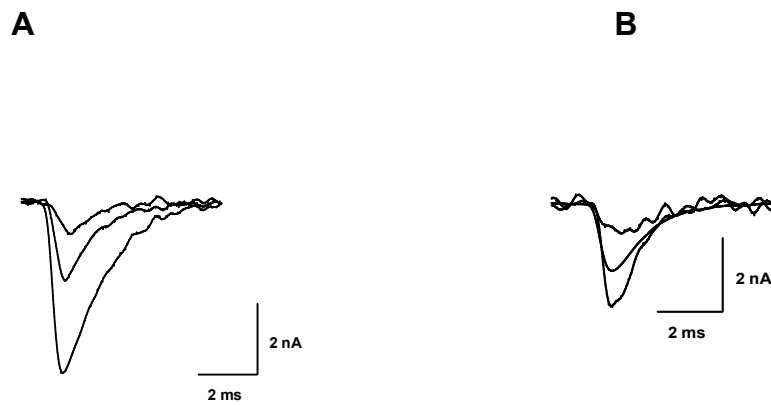
Foram realizado medidas na frequência, antes e após solução hipertônica, de animais KDVAcHt e WT de 12 meses de idade para verificar se há variações decorrentes da idade. Como mostrado na figura 11A, não foi observada diferença significativa na frequência dos MEPPs antes e após o tratamento com solução hipertônica nos animais geneticamente modificados (KDVAcHt) de 12 meses de idade, quando comparadas aos WT. A frequência nos animais selvagens (WT) foi de  $0,72 \pm 0,05$  Hz para  $0,52 \pm 0,04$  Hz após o tratamento com solução hipertônica e os KDVAcHt foi de  $0,86 \pm 0,16$  Hz para  $0,5 \pm 0,04$  Hz. Na figura 11B, foi feita a normalização destes valores, dividimos a media da frequência dos MEPPs após o solução hipertônica pela media da frequência dos MEPPs antes da solução hipertônica. onde foi observada diferença significativa na frequência dos MEPPs após o tratamento hipertônico nos animais WT. Tal diferença não foi observada nos animais KDVAcHt e entre os grupos WT e KD VAcHt. A variação na frequência dos WT foi de  $74 \pm 13$  % enquanto que nos KDVAcHt foi de  $73 \pm 32$  %.



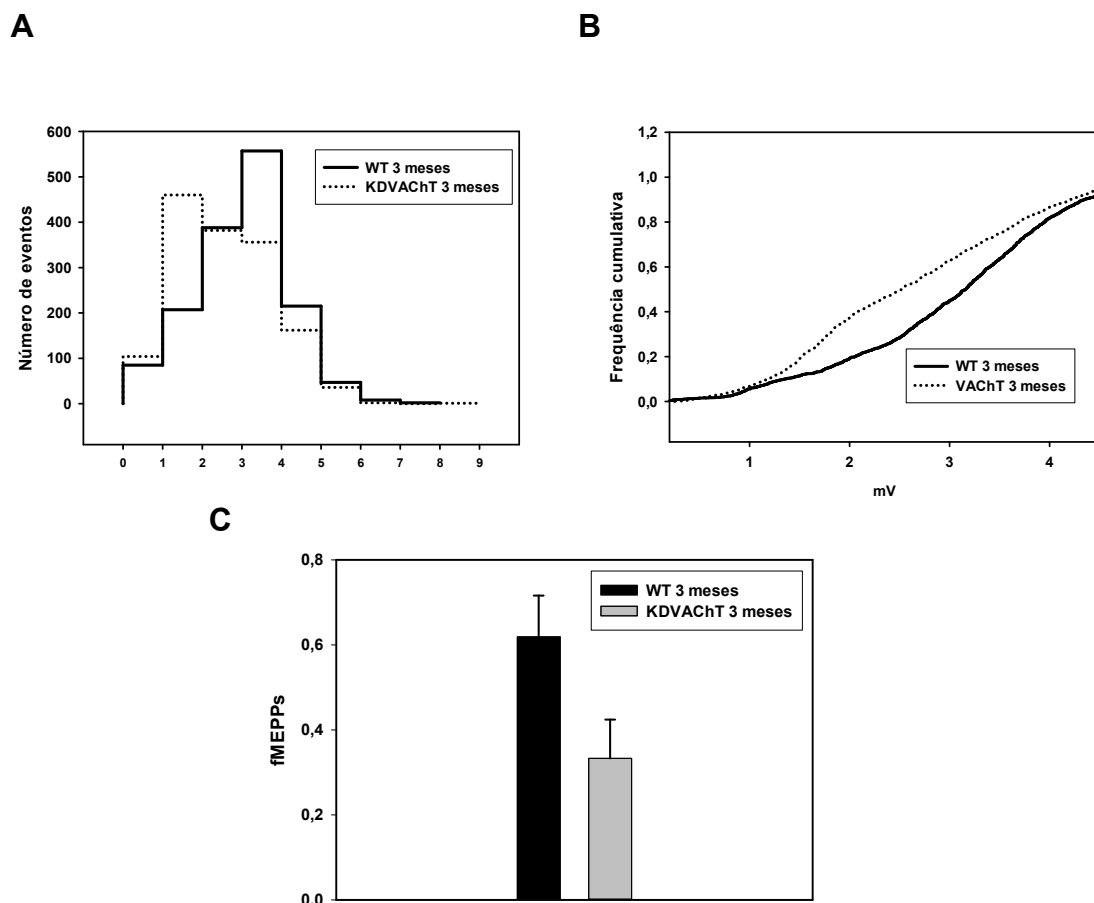
**Figura 11** - Frequência dos MEPPs de animais WT ou KDVAcHt de 12 meses de idade, medida em solução Tyroide, antes (pré) e após solução hipertônica. A) Os pontos representam as médias  $\pm$  EPM.  $P > 0.05$ . B) As barras representam as médias das amplitudes normalizadas  $\pm$  IC95%.  $P > 0.05$

## **5.6 Alterações produzidas nas MEPCs pela diminuição do VACHT, observadas aos 3 meses de idade.**

Trabalhos anteriores (PRADO *et al*, 2003, LIMA *et al*, 2010) mostraram que os MEPPs dos animais geneticamente modificados (KDVACHT) são menores que os animais selvagens (WT). Esta diferença pode ser devido a uma alteração nas propriedades passivas da membrana. Para verificar esta possibilidade, nós estudamos as correntes de placa em miniatura (MEPCs) utilizando a técnica de voltage clamp. Nestas condições, os tamanhos dos eventos em miniatura não dependem destes fatores. A figura 12A mostra os registros representativos das correntes de placa em miniatura (MEPCs) nos animais WT de 3 meses. A figura 12B mostra os registros representativos das MEPCs nos animais KDVACHT de 3 meses. Na Figura 13A mostramos o histograma do tamanho das MEPCs nos animais KDVACHT e WT de 3 meses de idade. Estes experimentos foram realizados utilizando solução normal. Na figura 13B, foi montado um gráfico de frequência cumulativa. Foi observada uma variação no tamanho dos MEPC nos animais KDVACHT. Na figura 13C são mostradas as médias da frequência de liberação dos MEPC nos animais KDVACHT e WT. Não foi observada diferença significativa na frequência dos MEPCs. A frequência dos animais WT foi de  $0,61 \pm 0,09$  Hz, nos animais KDVACHT foi de  $0,33 \pm 0,09$  Hz. Na tabela I mostramos as medidas do tamanho, frequência e área dos MEPCs de cada fibra dos animais WT e KDVACHT de 3 meses de idade.



**Figura 12** – A) Registros representativos mostrando as variações no tamanho das correntes de placa em miniatura (MEPCs) registradas nos animais WT de 3 meses. B) Registros representativos das MEPCs nos animais KDVACHT de 3 meses.



**Figura 13** – Tamanho das MEPCs de animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade, medida em solução Tyroide, (A) Histograma do tamanho das MEPCS. (B) Frequência cumulativa das MEPCS, n=2983 (WT) e 2977 (KDVACHT). (C) Frequência das MEPCS, n=3 (WT) e 4 (VACHT). As barras representam as médias  $\pm$  EPM.

**Tabela I** – Medidas do tamanho, frequência e área das MEPCs dos animais WT ou KDVACHT de 3 meses de idade.

Animais	Tamanho (nA)	fMEPCs (Hz)	Área MEPCs ( $\mu$ V.sec)
WT 150223	B 3.25	B 1.09	B 6.47
	C 2.93	C 0.56	C 5.67
	D 4.30	D 1.10	D 9.19
	E 3.60	E 0.50	E 9.55
WT 150224	A 1.0	A 0.28	A 1.75
	B 2.05	B 0.60	B 3.75
	C 2.56	C 0.51	C 4.47
	D 2.43	D 0.33	D 4.11
	E 3.04	E 0.41	E 5.19
WT 150303	A 3.86	A 0.60	A 5.70
	B 3.18	B 0.77	B 5.43
	C 3.34	C 0.81	C 5.78
	D 2.65	D 0.62	D 5.05
	E 3.05	E 0.70	E 5.03
Média WT	3.02	0.61	5.68
KDVACHT 150209	B 0.88	B 0.18	B 1.60
	C 2.94	C 0.20	C 4.15
	D 3.70	D 0.21	D 5.27
	E 3.96	E 0.11	E 5.31
KDVACHT 150223	A 2.36	A 0.08	A 3.53
	B 3.39	B 0.26	B 6.22
	C 1.46	C 0.15	C 2.58
	D 1.54	D 0.53	D 2.99
	E 1.00	E 0.05	E 0.57
KDVACHT 150224	A 1.84	A 0.17	A 3.02
	B 3.14	B 0.59	B 4.67
	C 1.63	C 0.40	C 3.68
	D 2.27	D 0.47	D 4.07
	E 2.32	E 0.20	E 5.44
KDVACHT 150303	A 2.05	A 1.04	A 2.88
	B 3.55	B 0.30	B 5.90
	C 4.23	C 0.37	C 6.12
	D 3.26	D 0.39	D 5.58
	E 3.00	E 0.79	E 4.27
Média KDVACHT	2.57	0.33	4.09

## 6 - Discussão

### 6.1 Papel do VACHT na neurotransmissão

Estudos anteriores testaram a relevância do VACHT na neurotransmissão e no desenvolvimento muscular. De CASTRO *et al* (2009) viu que camundongos homozigotos VACHT *knockout* morriam rapidamente após seu nascimento e mostraram severas alterações na junção neuromuscular, consistente com a diminuição da participação colinérgica durante o desenvolvimento.

Resultados mostrados por LIMA *et al* (2010), utilizando camundongos geneticamente modificados que possuíam 70% de redução do VACHT, observaram uma diminuição na frequência e no tamanho dos MEPPs quando comparados com camundongos selvagens. Em nossos resultados não observamos diferenças significativas na frequência e no tamanho dos MEPPs nos camundongos KDVAChT de 3 e 12 meses de idade comparados com camundongos selvagens. Prado *et al* (2006) mostraram cerca de 50% de variação no tamanho e frequência, enquanto que nós observamos cerca de 30%. Apesar de que estes autores não reportaram a idade dos animais utilizados, estas diferenças não devem ser devido à idade dos animais, porque observamos a mesma variação em animais com 3 e 12 meses de idade.

Para averiguar a importância do VACHT no segundo estágio de preenchimento vesicular, vimos que mesmo com a expressão desse transportador reduzida nos animais KDVAChT foi observado aumento no tamanho dos quantas após tratamento com solução hipertônica semelhante aos animais WT. Entretanto, estudos anteriores mostraram que o aumento no tamanho dos quanta observados após o tratamento com solução hipertônica

foram quase inteiramente abolidos na presença de vesamicol (VAN DER KLOOT, 2003). MARSHALL (1987) estudou os efeitos do vesamicol na transmissão neuromuscular em gatos, utilizando métodos clássicos de farmacologia, concluíram que o vesamicol diminuiu a transmissão sináptica pelo bloqueio do empacotamento de ACh para dentro das vesículas sinápticas. Entretanto, o vesamicol pode apresentar efeitos não específicos, bloqueando os receptores nicotínicos pós-sinápticos e alterando os adrenoreceptores do tipo alfa (BUCKINGHAM *et al*, 1993; WANNAN *et al*, 1991). Portanto, a diminuição no tamanho dos quanta observado nos estudos anteriores citados acima poderia ser devido ao bloqueio dos receptores de ACh presentes nos canais nicotínicos pós-sinápticos e não pelo bloqueio do VACHT, devido também ao fato que em nosso estudo vimos que os animais com deficiência na expressão do VACHT apresentaram aumento no preenchimento vesicular semelhante aos animais selvagens.

Estima-se que vesículas colinérgicas de animais normais apresentam em torno de quatro cópias do transportador vesicular VACHT. Nos animais KDVACHT que utilizamos, o nível de expressão de VACHT foi reduzido por 70%, e portanto era de se esperar que as vesículas pudessem apresentar, em média apenas uma cópia. Esse fato ocasionaria em uma deficiência no preenchimento vesicular basal e diminuição ou até abolição do segundo estágio de preenchimento vesicular, mas não observamos diferenças significativas nos parâmetros citados. No entanto, esses animais apresentam disfunções cardíacas, alterações cognitivas, deficiência na transmissão neuromuscular, diminuição da performance motora e uma grave deficiência na

força de contração muscular (PRADO *et al*, 2006; DE CASTRO *et al*, 2009; LARA *et al*, 2010).

## **6.2 Segundo estágio de preenchimento vesicular de acetilcolina**

A reciclagem das vesículas no terminal nervoso em repouso é lenta, mas quando estimulado, a reciclagem ocorre rapidamente (POTTER, 1970). O estudo realizado por POTTER (1970) observou que após estimular o terminal nervoso, a colina recaptada pelo terminal nervoso era sintetizada e a acetilcolina recentemente formada era imediatamente recrutada para o reabastecimento das vesículas situadas na zona ativa. Na presença de um inibidor de captação da colina (hemicolínio), os níveis de acetilcolina caem rapidamente durante a estimulação. Experimentos com acetilcolina marcada mostraram que o neurotransmissor recentemente sintetizado era preferencialmente liberado (POTTER, 1970).

O estímulo com tratamento hipertônico promove aumento na frequência e tamanho dos quantas. Depois de retirada a solução hipertônica, a frequência retorna aos valores basais, mas o tamanho dos quanta permanece aumentado por cerca de uma hora (YU AND VAN DER KLOOT, 1991). Este fenômeno não aparece na presença de vesamicol ou quando se bloqueia a captação de colina, sugerindo que o tamanho dos quanta foi alterado devido a uma maior quantidade de acetilcolina por quantum, surgindo diferentes populações de quanta (NAVES AND VAN DER KLOOT, 2001).

Os primeiros a mostrar evidências da existência do segundo estágio de preenchimento foram DOHENTY *et al* (1986), onde mostraram um aumento no coeficiente da variação do tamanho dos MEPPs após 50-450 estímulos



nervosos , sugerindo que as vesículas prontas para serem liberadas possuíam uma maior quantidade de acetilcolina que as vesículas utilizadas para sua reposição (SEARL AND MARSHALL, 1991). Outros estudos utilizando um número maior de estímulos e outros tipos de protocolos encontraram duas populações diferentes, sugerindo que a estimulação elétrica prolongada produz um aumento no tamanho dos quanta. Este fenômeno é devido a um mecanismo que provavelmente envolve a proteína kinase A (ELMQVIST AND QUASTEL, 1965; VAN DER KLOOT AND VAN DER KLOOT, 1986; ESTRELLA *et al*, 1988; SEARL AND MARSHALL, 1991).

Em nosso trabalho, foi observado que o tratamento com solução hipertônica causou um aumento no tamanho dos quanta de 59-71% nos animais selvagens e de 55-96% nos animais KDVAChT. Esse efeito é qualitativamente semelhante ao relatado por Yu e Van der Kloot (1991), porém de menor magnitude (Yu e Vander Kloot observaram 100% de aumento de tamanho quantal). A diferença pode ser relacionada ao uso de linhagens distintas de camundongos (Yu e Van der Kloot, 1991 utilizaram Swiss Webster), e por termos realizado os experimentos na temperatura ambiente (os experimentos de Yu e Van der Kloot, 1991 foram realizadas em 35° C). .

A nossa hipótese foi que o VAChT é o responsável pelo aumento no tamanho das quanta ocasionado por tratamento com solução hipertônico. Se a nossa hipótese for verdade, ao utilizarmos o modelo animal que apresenta em torno de 70 % de redução da proteína VAChT, espera-se observar um menor preenchimento vesicular após o tratamento hipertônico. Entretanto, isto não foi observado. O efeito do tratamento com solução hipertônica em animais geneticamente modificados não apresentou diferenças significativas quando

comparados com o efeito medido em animais selvagens. Uma possibilidade é que as poucas cópias de VAcHT restantes sejam suficiente para preencher as vesículas durante e após o tratamento hipertônico. Outra possibilidade é que a atividade do VAcHT não é necessária para o efeito de soluções hipertônicas. Nesse caso, os resultados observados por Yu e Van der Kloot (1991) poderiam ter sido causados por efeitos inespecíficos dos fármacos utilizados.

### **6.3 Papel do VAcHT em outros processos**

O VAcHT pode desempenhar importantes papéis em outros processos fisiológicos. A secreção não-quântica participa de diferentes funções na junção neuromuscular, estas funções incluem o controle dos receptores de ACh pós-sinápticos, modulações da secreção de neurotransmissores, controle do desenvolvimento e regeneração das sinapses, manutenção do potencial de repouso e propriedades contráteis do músculo (VIZI AND VYSKOCIL, 1979; SUN AND POO, 1985; MUKHTAROV *et al*, 2000; MALOMOUZH *et al*, 2003; PETROV *et al*, 2011). PETROV (2011), investigou o papel do transportador vesicular de ACh no mecanismo não-quântico na junção neuromuscular no músculo diafragma. A secreção não-quântica foi estimada eletrofisiologicamente pelo tamanho da hiperpolarização do potencial de repouso da placa motora após inibição da colinesterase e dos receptores nicotínicos (efeito H). Em estudo anterior, foi mostrado que 1 molar de metil- $\beta$ -cyclodextrina (MCD) reduziu a endocitose vesicular, levando a um aumento na secreção não-quântica de ACh. Em contraste, a secreção não-quântica de ACh não aumentou com o tratamento com MCD quando as preparações foram perfundidas com vesamicol, bloqueador do transportador vesicular de ACh.

Esses resultados sugerem que o VACHT desempenha um importante papel no processo de secreção não-quântica do neurotransmissor na placa motora, sendo uma possível via condutora para a ACh. Seria importante pesquisarmos a liberação não quântica nos animais KDVAChT.

Em outros trabalhos, foi mostrado que o VACHT desempenha importante função no sistema cardiovascular. A regulação cardíaca pelo sistema nervoso parassimpático é mediada primeiramente pela ligação de ACh nos receptores de ACh muscarínicos M2. Os neurônios parassimpáticos tem recebido recentemente maior atenção porque a ACh tem mostrado desempenhar um importante papel preventivo em doenças cardíacas (ROY *et al*, 2013). A sinalização mediada por ACh desempenha um importante papel em manutenção das conexões sinápticas durante o desenvolvimento (DE CASTRO, 2009; LARA *et al*, 2010; MISGELD *et al*, 2002), por isso, distúrbios no tônus colinérgicos, como observados em casos de disautomia, podem contribuir para alterar funções no miocárdio (LARA *et al*, 2010). Contudo, a inervação parassimpática é esparsa no coração, o que leva ao pressuposto de que a sinalização colinérgica regula os cardiomiócitos por outros mecanismos. O estudo feito por Roy (2013), hipotetizou que a secreção não-quântica ACh dos cardiomiócitos desempenha um importante papel na regulação colinérgica da atividade cardíaca. Para testar esta possibilidade, examinaram a secreção de ACh exclusivamente dos cardiomiócitos pela marcação do VACHT. Utilizando camundongos KDVAChT, viram que esses camundongos apresentaram parâmetros hemodinâmicos normais dentro de condições não estressantes, contudo, sob exercício, suas taxas de resposta cardíaca aumentaram. Entretanto, o coração dos animais mutantes apresentou aumentos no estresse

oxidativo, alterações na sinalização de cálcio, remodelamento e hipertrofia. Esses resultados sugerem que a ACh é necessária para manutenção da homeostasia e regulação da sinalização necessária para manter a atividade cardíaca normal, além da importância da fonte não-quantica de ACh parassimpática para contrabalancear a atividade regulatória em múltiplos aspectos da fisiologia cardíaca.

O estudo feito por LARA *et al* (2010), corroboram com os achados citados anteriormente, onde também utilizaram camundongos KDVAChT e investigaram as consequências da alteração do tônus colinérgico na função cardíaca. Foram realizados registros de ecocardiograma, experimentos hemodinâmicos, análise da perfusão isolada do coração e medidas da contração do cardiomiócito. Os camundongos mutantes KDVAChT apresentaram diminuição na função do ventrículo esquerdo associado com alterações no manuseio de  $Ca^{2+}$  e profundo remodelamento cardíaco. Esses resultados indicam que a diminuição na neurotransmissão colinérgica e o subjacente desbalanço autonômico devido a redução do VAChT causam alterações plásticas que contribuem para a disfunção cardíaca.

#### **6.4 Modificações na neurotransmissão decorrentes da idade**

Trabalhos anteriores pesquisaram as modificações na neurotransmissão decorrentes da idade e mostraram que animais idosos exibiram mudanças morfológicas e funcionais na musculatura e na transmissão sináptica. Ocorrem poucas mudanças na aparência geral com o envelhecimento, o peso varia de 289g para 227g em ratos idosos quando comparados com ratos jovens. A diminuição de peso é aparente não só no corpo aumentado dos ratos idosos,

mas também na acumulação de gordura entre as células do diafragma (SMITH, 1979).

Nós não observamos diferenças no tamanho ou frequência dos MEPPs entre camundongos de 3 e 12 meses de idade. Trabalhos anteriores utilizando ratos mostraram que o potencial de repouso de fibras musculares foi significativamente menos negativo que em animais de 12 meses (77 mV vs. 81 mV, SMITH, 1979).

Comparado com ratos de 12 meses, os ratos com 28 meses exibiram mudanças na estrutura do terminal nervoso, contendo um maior número de ramos nervosos por terminal, e um aumento no número de vesículas sinápticas por terminal (SMITH, 1979). Foi observado também um aumento na depressão pós-sináptica em ratos idosos proporcionando uma grande tendência à falhas na neurotransmissão. SMITH (1984) observou que ratos idosos de 28 meses, apresentaram uma diminuição na quantidade total de neurotransmissor ACh na junção neuromuscular, e isso foi associado a o aumento no vazamento espontâneo de ACh, que também foi avaliado no músculo sartório de rã (KATZ AND MILED, 1977) e no diafragma de camundongo (VYSKOCIL AND ULES, 1977), ambos resultados condizem com o trabalho de SMITH (1984) onde foi observada uma maior hiperpolarização do potencial de repouso no terminal nervoso na presença de D-Tubocurarina em ratos idosos, indicando maior vazamento espontâneo de ACh nos terminais. Evidências ultraestruturais indicaram que houve um aumento de 38% nas vesículas sinápticas por terminal nervoso em ratos idosos (SMITH AND ROSENHEIMER, 1982). Os ratos idosos (28 meses) também apresentaram uma maior frequência de liberação quântica (1,51 Hz) em relação aos ratos jovens (12 meses, 0,59 Hz). Essa diferença foi

significativa quando comparados com ratos jovens (12 meses), mas quando a média era dividida pela taxa observada, a diferença não foi estatisticamente diferente (SMITH, 1984).

A quantidade de ACh dentro de cada vesícula sináptica pode ser menor em animais idosos (SMITH, 1984). Isto é evidenciado pelo menor tamanho dos potenciais de placa em miniatura que foram observadas nos ratos idosos de 28 meses comparados com ratos jovens de 12 meses, a média do tamanho foi de 0.58 mV nos animais idosos e de 0,87 mV nos ratos jovens. Essa diferença foi estatisticamente significativa (SMITH, 1979). Nós não observamos diferenças nos tamanhos dos MEPPs nos camundongos de 3 meses quando comparados com os de 12 meses de idade. Aparentemente de 3 a 12 meses de idade as propriedades quantais da neurotransmissão em camundongos se mantêm estáveis. Os potenciais de placa evocados medidos para caracterizar a transmissão sináptica em resposta à despolarização do terminal nervoso por estimulação do nervo frênico foram avaliados nos ratos idosos. Não foram observadas diferenças significativas nos ratos idosos de 28 meses comparados com os ratos jovens de 12 meses. Não foram observadas diferenças em outras expressões da plasticidade sináptica como na facilitação e na potenciação pós-tetânica. Mas foram observadas diferenças na depressão sináptica, que foi maior em ratos idosos de 28 meses quando comparados com ratos jovens de 12 meses (SMITH, 1979). A depressão observada em ratos idosos pode ser reflexo de um menor estoque de neurotransmissor por terminal nervoso, disponíveis para liberação. Entretanto, aumentos na liberação total do conteúdo quântico em ratos idosos foram atribuídos a maior extensão da arborização do terminal nervoso (SMITH, 1984). Além disso, aumentos da depressão sináptica

em ratos idosos refletiram no aumento da fração de liberação de ACh por potencial de ação. Esses dois fenômenos podem ser casualmente relacionados se a fração do neurotransmissor disponível para liberação for proporcional à liberação total do conteúdo quântico do terminal. Para a depressão sináptica, tem sido mostrada a dependência do resultado da progressiva depleção da fração do neurotransmissor disponível para liberação (ELMQVIST AND QUASTEL, 1965; CHRISTENSEN AND MARTIN, 1970).

Trabalhos anteriores utilizaram camundongo com as idades de 7 meses (considerados maduros) e 29 meses (considerados idosos), porque quando comparados a ratos, que é um animal com longevidade similar ao camundongo, a função neuromuscular não encontra um platô até meados de 6 meses de idade (KELY, 1978). De acordo com GUTMANN & HANZLIKOVA (1972), mudanças decorrentes da idade em camundongos, incluíram aglutinação de vesículas pré-sinápticas e aumento dos ramos das dobras sinápticas. FUJISAWA (1976) observou que a mudança mais drástica foi a atenuação de múltiplos terminais nervosos com vesículas de variados tamanhos. O trabalho de FAHIM ANDROBBINS (1982) fez um estudo da ultraestrutura da junção neuromuscular do músculo sóleo e EDL em camundongos maduros de 7 meses de idade e idosos de 29 meses de idade para avaliar estatisticamente a magnitude das mudanças decorrentes da idade. Foi observado que os camundongos idosos apresentaram um aumento de 11% na ramificação das dobras juncionais, redução de 69% no número de vesículas sinápticas por terminal nervoso, redução de 77% de mitocôndrias por terminal e aumento no número de retículo endoplasmático liso. Os mesmos autores observaram poucas mudanças na ultraestrutura na junção neuromuscular no

músculo diafragma dos camundongos idosos deste estudo. Os achados fisiológicos de (KELLY AND ROBBINS, 1986) mostraram que os terminais nervosos do músculo EDL e sóleo em camundongos idosos liberaram tanto quanto ou mais neurotransmissor que camundongos jovens.

Nossos resultados corroboram em parte com os resultados achados por KELLY AND ROBBINS (1986), porque não observamos diferenças significativas na frequência e tamanho dos MEPPs em camundongos selvagens de 12 meses de idade quando comparados com camundongos selvagens de 3 meses de idade.

O aumento dos níveis de liberação vesicular, maior vazamento de ACh no terminal, maior depressão pós-sináptica apresentados por ratos e camundongos idosos em estudos anteriores, podem ser explicados devido a uma compensação produzida pela maquinaria sináptica, onde os animais idosos apresentam uma maior extensividade da arborização da placa motora, contendo maior quantidade de terminais nervosos, fazendo com que os níveis de ACh nos animais idosos se tornem iguais ou maiores que em animais jovens. Os mecanismos que subjazem tais fenômenos que prejudicam a transmissão sináptica relacionada ao avanço da idade não são bem definidos, mas as possíveis causas poderiam também estar relacionadas com alterações dos receptores de ACh devido a degenerações decorrentes da idade dos animais. (SMITH, 1982). Outra possibilidade seria uma disponibilidade reduzida do neurotransmissor devido a diminuição da ação da acetilcolinesterase ou a diminuição das cópias da proteína responsável pelo transporte de ACh para dentro das vesículas sinápticas. Mas não se sabe se de fatos todas essas possibilidades ocorrem de forma independente ou se estão correlacionadas.



Poucas vesículas podem garantir a manutenção dos terminais nervosos menores em animais idosos. Como resultado, mecanismos compensatórios podem desempenhar um papel fundamental para preservar a adequada liberação de neurotransmissores sinápticos (FAHIN, 1982).

### **6.5 Medida das MEPCs**

Outra abordagem para o estudo das propriedades do canal nicotínico e da liberação de ACh na junção neuromuscular é através da técnica de voltage clamp. Este método foi originalmente descrito por HODGKIN AND HUXLEY (1952). Na técnica de voltage clamp, pode-se registrar as correntes iônicas através dos canais nicotínicos e as correntes de placa em miniatura (MEPC) (TAKEUCHI AND TAKEUCHI, 1958).

Essa técnica vem sendo comumente usada porque alguns fatores que determinam o tamanho dos MEPPs através da técnica de current clamp, pode não ser a melhor medida para estimar a quantidade de ACh em um quanta por apresentar variações na voltagem transmembrana na junção neuromuscular (VAN DER KLOOT, 2003). A vantagem de se utilizar a técnica de voltage clamp é que se elimina o efeito capacitivo da membrana na resposta que possibilita a manutenção do potencial transmembrana constante e controlável, sendo uma técnica mais apropriada para o estudo das propriedades do canal nicotínico e da liberação de ACh. Nessa técnica, dois microeletrodos são inseridos na fibra muscular, um micro eletrodo monitora a voltagem da membrana e tem sua saída acoplada a um segundo eletrodo que responde as mudanças de voltagem registradas pelo primeiro micro eletrodo, passando corrente necessária para dentro da célula muscular estabilizando a voltagem

transmembrana num valor que pode ser determinado, chamado de “potencial de holding”. A corrente que passa é igual e em sentido contrario ao fluxo de íons através dos canais. A MEPC é gerada pela liberação instantânea de ACh, que após ser liberada para a fenda sináptica, rapidamente interage com o receptor nicotínico de ACh abrindo-o, permitindo o influxo de cargas positivas (em sua maioria o sódio na junção neuromuscular), causando uma despolarização rápida. Após a fase de despolarização há um declínio exponencial devido ao fechamento dos canais (DUNANT, 1986, VAN DER KLOOT, 1991).

O tamanho de um MEPC é dependente da quantidade de ACh liberada, da taxa que a ACh que difunde na fenda sináptica, a velocidade de reação do neurotransmissor com o receptor pós-sináptico, a duração de abertura dos canais e a velocidade com que os neurotransmissores são removidos dos canais pós-sinápticos (TAKEUCHI AND TAKEUCHI, 1958). Os MEPCs são a soma do fluxo das correntes que seguem através de um grande numero de canais individuais. O aumento do tamanho das MEPCs reflete na abertura dos canais, enquanto que a diminuição dos MEPCs depende do fechamento dos canais (MAGLEBY AND STEVENS, 1972a, b). Durante uma MEPC típica, em torno de 2.000 canais são abertos. Pelo fato de que cada canal requer a ação cooperativa de duas moléculas de ACh, isto significa que aproximadamente 4.000 moléculas de ACh combinam-se em pares com o receptor para ocorrer a abertura do canal (DUNANT, 1986; VAN DER KLOOT, 1991).

A medida do MEPC pode ser feita através da carga total que entra no terminal nervoso durante um MEPC, por isso o MEPC deveria ser diretamente proporcional ao numero de canais de ACh abertos. A carga total é o tempo

integral dos MEPCs (DUNANT, 1986). A desvantagem da técnica de voltage clamp nos nossos experimentos foi que essa técnica leva mais tempo de execução para os registros, o que se torna um obstáculo quando é preciso fazer varias medidas em varias junções em um determinado período de tempo, pois em nossa padronização, para assegurar que estávamos registrando durante efeito do segundo estagio de preenchimento vesicular, os registrados deveriam ser feitos em tempo médio de 30 minutos após o retorno para solução isotônica.

## **6.6 Análise estatística**

Em nosso estudo, utilizamos o número mínimo de animais necessários para nossas conclusões fundamentais. Como os efeitos no tamanho e frequência dos MEPPs já haviam sido objeto de estudos anteriores (PRADO *et al*, 2006, LIMA *et al*, 2010, RODRIGUES *et al*, 2013), nós utilizamos o número mínimo que mostrasse significativamente o efeito da solução hipertônica nos animais WT e KDVAChT. Entretanto, mesmo com um tamanho de amostragem reduzido, nossos resultados nos parâmetros de frequência e amplitude basal dos MEPPs mostram uma tendência no mesmo sentido dos resultados anteriormente publicados. Quanto ao estudo de frequência e amplitude basal utilizando voltage clamp, ou seja, as medidas das correntes em miniatura, nossa amostragem foi limitada pela disponibilidade de animais. Com estes experimentos, utilizando 3 animais WT e 4 animais KDVAChT, a diferença observada não foi estatisticamente significativa. Pretendemos aumentar o número de animais destes experimentos.

Para demonstrar a expectativa do número de animais necessários para obter um dado estatisticamente significativo, mostrarei os cálculos de determinação de tamanho da amostra. O número de animais por grupo foi estimado segundo SAMPAIO (2002), utilizando a definição da estatística t e dados dos parâmetros a serem avaliados. Baseado nos dados mostrados na Tabela I, o valor da média e desvio padrão de um dos parâmetros medidos (amplitude de MEPCs) foi de 2.99 e 0.68. Sendo assim, procuramos calcular o número de animais por grupo que irá garantir que, caso haja uma diferença da magnitude observada no valor das médias, a chance disto acontecer por acaso seria menor do que um determinado valor,  $\alpha$ . Nesse caso, deve ser satisfeita a seguinte condição:

$$t = \frac{\mu_2 - \mu_1}{EPM} = \frac{\mu_2 - \mu_1}{\frac{\sigma}{\sqrt{N}}} > t_\alpha \quad (Eq 1)$$

Onde  $\mu_2 - \mu_1$  é a diferença mínima nas médias entre grupo controle e grupo experimental para ser considerado significativa, EPM é o erro padrão da média, e  $t_\alpha$  é o valor crítico da estatística t para o nível de significância desejada,  $\alpha$ . Em nosso estudo, consideraremos como significativos os efeitos quando o valor da estatística t indica uma probabilidade menor do que 0,05 que tal efeito aconteceu por acaso (i.e.,  $\alpha=0,05$ ).

O problema de determinar o número de animais consiste em achar um valor de N que satisfaça Eq 1. Infelizmente, o valor crítico da estatística t, ( $t_\alpha$ ), é uma função complexa e não linear do valor N. Dessa forma, não há maneira simples de rearranjar a Eq 1 para isolar N. Por esse motivo, utilizamos um processo iterativo para achar o valor de N que satisfaça Eq 1. Nós começamos

com o valor de  $t_\alpha = 1.960$ , o que corresponde a N muito grande (quando  $\alpha=0.05$ , a medida que N tende ao infinito,  $t_\alpha$  aproxima o valor de 1,960). Substituindo esse valor na Eq 1 (após rearranjo algébrico) podemos calcular uma primeira estimativa do valor N, que chamamos de  $N_1$ . No segundo passo, o valor de  $t_\alpha$  que corresponde a essa primeira estimativa ( $N_1$ ) foi obtido por tabela e substituído na Eq. 1, o que permitiu calcular uma segunda estimativa do N, que chamamos de  $N_2$ . Esse processo foi repetido até que houve uma convergência do valores. Como exemplo, mostramos o resultado do primeiro cálculo:

$$N_1 = N_{t_\alpha=1,960} = \left( \frac{t_\alpha \sigma}{\mu_2 - \mu_1} \right)^2 = 10,3 \quad (Eq\ 2)$$

Observe que a Eq. 2 é a mesma do que Eq. 1 após rearranjo algébrico. Arredondando para baixo o valor obtido, temos como primeira aproximação o valor de  $N_1=10$ . Utilizando repetidas iterações o valor de N converge para 13, que é o número de repetições necessárias para que o resultado seja significativo.

## 7 - Conclusão

A análise dos resultados obtidos nos permitiu observar uma clara ação no aumento do tamanho dos MEPPs após o tratamento com solução hipertônica em ambos os grupos experimentais. Após o tratamento hipertônico, era esperado que o aumento no preenchimento vesicular fosse menor nos animais geneticamente modificados devido à diminuição dos VACHT. Isto estaria de acordo com estudos anteriores que utilizaram bloqueadores

farmacológicos do transporte vesicular de acetilcolina e observaram uma diminuição no preenchimento vesicular. Entretanto, em nosso estudo, não vimos diferença significativa no efeito no preenchimento vesicular após tratamento hipertônico. Esses resultados nos levam a pensar na existência de mecanismos capazes de compensar a redução no transportador vesicular apresentado por esses animais, fazendo com que consigam recrutar os neurotransmissores e preencher as vesículas sinápticas de forma eficaz sem apresentar diminuições no preenchimento e liberação do neurotransmissor na junção neuromuscular no músculo diafragma. Outra possibilidade, é que as ferramentas farmacológicas exerceram seu efeito em outros alvos que não o VACHT. Mais experimentos são necessários para complementar nossos resultados e desvendar os mecanismos compensatórios da neurotransmissão.

## 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.

ANDERSON D. C., KING S. C. AND PARSONS S. M. Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles. *Molec. Pharmac.* 24, 48-54. 1983a.

ANDERSON D. C., KING S. C. AND PARSONS S. M. Inhibition of [3H] acetylcholine active transport by tetraphenylborate and other anions. *Molec. Pharmac.* 24, 55-59. 1983b.

ALABI A.A. AND TSIEN R.W. Synaptic vesicle pools and dynamics *cold. Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a013680. 2012.

BAIN A. I. AND QUASTEL, D. M. J. Multiplicative and additive Ca<sup>2+</sup>-dependent components of facilitation at mouse endplates. *J Physiol*. 455: 383-405, 1992.

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.

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.

BLUSZTAJN J.K., LISCOVITCH M.AND RICHARDSON U.I. Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:5474-5477.1987.

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.

BUCKINGHAM S. P., LIMMIS S. C. R., BALK M. L., SCHOROEDER M., SATTELLE D. B. Actions of vesamicol on an bungarotoxina sensitive neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *J. exp. Biol*. 182: 255–264, 1993.



CHRISTENSEN B.N AND MARTIN A.R. Estimates of probability of transmitter release at the mammalian neuromuscular junction. *J. Physiol.* 210. 933-945. 1970.

COHEN I. S., VAN DER KLOOT W. AND BARTON S. B. Bursts of miniature end-plate potentials can be released from localized regions of the frog motor nerve terminal. *Brain Res.* 221: 382-386. 1981.

COLIER B AND KATZ H. S. Acetylcholine synthesis from recaptured choline by a sympathetic ganglion. *J. Physiol* 238:639-655. 1974

DALE, H. H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol Exp Ther.* 6 147-90, 1914.

DAVID G. AND BARRETT, E. F. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake prevents desynchronization of quantal release and minimizes depletion during repetitive stimulation of mouse motor nerve terminals. *J Physiol.*548: 425-38, 2003.

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

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

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

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

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

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

DOÈ RJE 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. 1991.

DOHERTY P., BARBARA J., HAWGOOD J. AND SMITH I.C.H. Changes in miniature end-plate potentials due to moderate hypertonicity at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.*, 376: 1-11. 1986.

DONGER C., KREJCI E., SERRADELL A.P., EYMARD B., BON S., NICOLE S., CHATEAU D., GARY F., FARDEAU M., MASSOULIE J. AND GUICHENEY P. Mutation in the human acetylcholinesterase-associated collagen gene, *colq*, is responsible for congenital myasthenic syndrome with end-plate acetylcholinesterase deficiency (Type Ic). *J. Hum. Genet.* 63:967–975, 1998.

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

ECCLES J.C The physiology of synapses. Springer-Verlag book. 1958

EDWARDS C., DOLE2ALO V., TUCEK S., ZEMKOVA H. AND VYSKOCIL F. Is an acetylcholine transport system responsible for non quantal release of acetylcholine at the rodent myoneural junction? *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.*82: 3514-3518. 1985

EGGERMANN E., BUCURENCIU I., GOSWAMI S.P, AND JONAS P. Nanodomain coupling between Ca<sup>2+</sup> channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 13: 7–21. 2013.

ENOKA R.M. Morphological Features and activation patterns of motor units. *Journal of clinical neurophysiology.* 12:538-559. 1995

ENOMOTO K.I. Post- and presynaptic effects of vesamicol (AH5183) on the frog neuromuscular junction. *Fur. d. Pharmae.* 147: 209-215. 1988.

ELMQVIST D. AND QUASTEL D.M.J. Presynaptic action of hemicholinium at the neuromuscular junction. *J. Physiol.* 177: 463-482. 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.

ESSER K..GUNNING P. AND HARDEMAN E. Nerve-dependent and independent patterns of mRNA expression in regenerating skeletal muscle. *Dev Biology.* 159:173-83, 1993.

ESTRELLA D, GREEN K.L., PRIOR C., DEMPSTER J., HALLIWELL F., JACOBS R.S., PARSONS S.M., PARSONS R.L. AND MARSHALL G.A further study of the neuromuscular effects of vesamicol (AH5183) and of its enantiomer specificity. *Br. J. Pharmacol.* 93: 759-768. 1988.

FAHIM.A AND N. ROBBINS. Ultrastructural studies of young neuromuscular junctions. *Journal of Neurocytology* 11: 641-656. 1982.

FATT P. AND KATZ B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. *J. Physiol.* 115: 320-370. 1951.

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

FUJISAWA K. Some observations on the skeletal musculature of aged rats--iii. Abnormalities of terminal axons found in motor end-plates. *Exp. Geront.* 11: 43-47. 1976.

FURSHPAN E.J. AND POTTER D.D. transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol*, 145:289-325. 1959

Gandevia S.C. Neural control in human muscle fatigue: changes in muscle afferents, motoneurons and motor cortical drive. *Acta Physiologica Scand*, 162: 275-283. 1998.

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

GUTMANN, E. AND HANZL[KOVA V. Basic mechanisms of aging in age changes in the neuromuscular system. *Scientifica Ltd.* 22-24 .1972.

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 Mg<sup>2+</sup>-ATPase and a proton pump in cholinergic synaptic vesicles from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Eur. J. Biochem.* 144, 441–446. 1984

HASSELMO, M. E. Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends CognSci*3:351–359, 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.

HODGKIN A.L AND HUXLEY A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol.* 117: 500–544. 1952.

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. 2004.

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.

KATZ B. Nerve, muscle, and synapse. *McGraw-Hill Company*. 1966.

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

KATZ, B. Nerve, muscle and synapse. University of London. *Ed. Mcgranw-hill book company*, 1966.

KATZ B. AND MILEDI R. The mensurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release the neuromuscular junctions. *Biological Sciences* 161: 483-495. 1965.

KATZ B. AND MILEDI, R. The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. *The Royal Society*. 167: 23-38. 1967a.

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. Physiol.* 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.; MILEDI, R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol.* 195: 481-92, 1968b.

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

KELLY S.S The effect of age on neuromuscular transmission. *J. Physiol.* 274: 51-62. 1978.

KELLY S.S. AND ROBBINS N. Statistics of neuromuscular transmitter release in young and old mouse muscle. *J. Physiol.* 385: 507-516. 1987.

KHARE P., MULAKALURI A. AND PARSONS S.M. Search for the acetylcholine and vesamicol binding sites in vesicular acetylcholine transporter: the region around the luminal end of the transport channel. *J Neurochem.*,115(4): 984–993. 2010.



KITA H. AND VAN DER KLOOT W. Time course and magnitude of effects of changes in tonicity on acetylcholine release at frog neuromuscular junction. *Journal of Neurophysiology*. 40: 212-224. 1976.

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.

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.

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.

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.

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.

LOCHER K.P., BASS R.B. AND REES D.C. Breaching the barrier. *Science* 301: 603–604. 2003.

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

MAGLEBY K. L. AND STEVENS C. F. The effect of voltage on the time course of end-plate currents. *J. Physiol*. 223: 1- 17. 1972a.

MAGLEBY K. L. AND STEVENS C. F. A quantitative description of end-plate currents. *J. Physiol*. 223: 173-197. 1972b.

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.

MALOMOUZH A.I., MUKHTAROV M.R., NIKOLSKY E.E., VYSKOCIL F., LIEBERMAN EM. AND URAZAEV A. Glutamate regulation of non-quantal release of acetylcholine in the rat neuromuscular junction. *J. Neurochem* 85:206–213. 2003.

MARSHALL I.G. AND PARSONS, S. M. The vesicular acetylcholine transport system. *Trends Neural. Sci.* 10, 174–177. 1987

MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ A.J. intra-golgi transport: roles for vesicles, tubules, and cisternae. *Hindawi Publishing Corporation*. Volume 2013, Article ID 126731, 15 pages. 2012

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

MAYER, A., WICKNER W. AND HAAS A. Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (a-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* 85, 83–94. 1996.

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., 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

MUKHTAROV M.R., URAZAEV A.K., NIKOLSKY E. AND VYSKOCIL F. Effect of nitric oxide and NO synthase inhibition on non quantal acetylcholine release in the rat diaphragm. *Eur J Neurosci* 12:980–986. 2000.

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.

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.

OTIS J. S., ROY R. R., EDGERTON V. R. AND TALMADGE R. Adaptations in metabolic capacity of rat soleus after paralysis. *J Appl Physiol.* 96: 584-96, 2004.

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.

PANENIC R., GISIGER V. AND GARDINER P. F. Fatigability of rat hindlimb muscles after acute irreversible acetylcholinesterase inhibition. *J Appl Physiol.* 87:1455-62, 1999.

PATON W.D.N. AND ZAIMIS E.J. The action of d-tubocurarine and of decamethonium on respiratory and other muscles in the cat. *J. Physiol.* 112, 311-331. 1951.

PEDERSEN S.E. AND COHEN J.B. d-Tubocurarine binding sites are located at  $\alpha$ - $\gamma$  and  $\epsilon$ -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

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- $\beta$ -cyclodextrin: the role of vesicular acetylcholine transporter. *Neuroscience* 186: 1–12. 2011.

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  $\alpha$ 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.

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

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.

RICHARDS M., MACAULAY V., HICKEY E., VEGA E., SYKES B., GUIDA V., RENGO C., SELITTO D., CRUCIANI F., KIVISILD T., VILLEMS R., THOMAS M., RYCHKOV S., RYCHKOV O., RYCHKOV Y., GO“LGE M., DIMITROV D., HILL E., BRADLEY D., ROMANO V., CALI F., VONA G., DEMAINE A., PAPIHA S., TRIANTAPHYLLIDIS C., STEFANESCU G., HATINA J., BELLEDI M., DI RIENZO A., NOVELLETTO A., OPPENHEIM A., NØRBY S., AL-ZAHERI N., BENERECETTI S.S., SCOZZARI R., TORRONI A. AND BANDELT A.J. tracing european founder lineages in the near eastern mtdna pool. *J. Hum. Genet.* 67:1251–1276. 2000.

RIZO J. AND SÜDHOF T.C. Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. *NEUROSCIENCE*. 3:641-653.2002.

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

RODRIGUES H.A., FONSECA M.D.E.C., CAMARGO W.L., LIMA P.M., MARTINEL.L.I., NAVES L.A., PRADO V.F., PRADO M.A., GUATIMOSIM C. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One.* .8;8 (11). 2013.

ROY A., FIELDS W.C., RESENDE C.R., RESENDE R.R., GUATIMOSIM S., PRADO V.F., GROS R. AND PRADO M.A.M. Cardiomyocyte-secreted acetylcholine is required for maintenance of homeostasis in the heart. *FASEB J.* 27, 5072–5082. 2013.

SAMPAIO I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. 2a. ed, Ed. FEP-MZV, *Belo Horizonte.* 2002.

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 A, hydrolysis and hepatic metabolism of the products. *The journal of biological 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.

SHON K.J., OLIVERA B.M., WATKINS M., JACOBSEN R.B., GRAY W.R., FLORESCA C.Z., CRUZ L.J., HILLYARD D.R., BRINK A., TERLAU A. AND YOSHIKAMI D. M-Conotoxin PIII A, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na Channel Subtypes. *The Journal of Neuroscience*. 18:4473–4481. 1998.

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

SMITH O. Reduced capabilities of synaptic transmission in aged rats. *Experimental neurology* 66: 650-666. 1979.

SMITH, O Restricted diffusion of extracellular potassium at the neuromuscular junction of aged rats. *Brain Research*, 239: 668—673. 1982.

SMITH O. Acetylcholine storage, release and leakage at the neuromuscular junction of mature adult and aged rats. *J. Physiol.* 347: 161-176. 1984.

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, AND ROSENHEIMER J.L. Decreased sprouting and degeneration of nerve terminals of active muscles in aged rats. *J. Neurophysiol.* 1982. 48:100-109. 1982.

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.

SORENSEN, J. B. SNARE complexes prepare for membrane fusion. *Trends in neurosciences.* 28: 453-5, 2005.

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

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

SUN Y..A. AND POO M.M. Non-quantal release of acetylcholine at a developing neuromuscular synapse in culture. *J. Neurosci.* 5:634–642. 1985.

TAKEUCHI A. AND TAKEUCHI N. Active phase of frog's end-plate potential. *Journal of Neurophysiology.* 22: 395-411. 1958..

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.

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.

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

VAN DER KLOOT W. Inhibition of packing of acetylcholine into quanta by ammonium. *FASEBJ* 1: 298-302; 1987.

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

VAN DER KLOOT W. Nicotinic agonists antagonize quantal size increases and evoked release at frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology.* 468: 567-589. 1993.

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., BENJAMIN, W. AND BALEZINA O. P. Calcitonin gene-related peptide acts presynaptic ally to increase quantal size and output at frog neuromuscular junctions. *J Physiol.*507: 689-695, 1998.

VAN DER KLOOT W. AND .Effects of activators and inhibitors of protein kinase A on increases in quantal size at the frog neuromuscular junction. 420:336-41. 1992.

VAN DER KLOOT W. AND MÓLGO, W. Quantal acetylcholine release at the vertebrate neuromuscular junction. *Physiological Reviews*. 74; 899-991. 1994.

VAN DER KLOOT, W. AND VAN DER KLOOT, T. E. Catecholamines, insulin and ACHT increase quantal size at the frog neuromuscular junction. *Brain Res*. 376: 378-381, 1986.

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.

VIZI E.S. In favour of the vesicular hypothesis: neurochemical evidence that vesamicol (AH5183) inhibits stimulation-evoked release of acetylcholine from neuromuscular junction. *J. Pharmacol*. 98: 898-902. 1989.

VIZI E.S. AND VYSKOCIL F. Changes in total and quantal release of acetylcholine in the mouse diaphragm during activation and inhibition of membrane ATPase. *J Physiol*. 286:1–14. 1979.

VYSKOCIL F. AND ILLES P. Non-quantal release of transmitter at mouse neuromuscular junction and its dependence on the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP-ase. *Pfligers Arch.* 370: 295-297 . 1977.

WANNAN G., PRIOR C., MARSHALL L. G.,  $\alpha$ -adrenoceptor blocking properties of vesamicol. *Eur J Pharmacol.* 201: 29-34, 1991.

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.

WILLIAMS, J. How does a vesicle know it is full?. *Neuro.* 18: 683-686, 1997.

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.

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. 1988.

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