

Luana Pereira Leite Schetino

Avaliação Comportamental e Morfofuncional de Junções Neuromusculares e Músculos Estriados Esqueléticos de Camundongos com Disfunção Colinérgica a Longo Prazo

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

Belo Horizonte, 2015.

APOIO INSTITUCIONAL

O presente trabalho foi realizado nos seguintes locais:

- Laboratório de Biologia da Neurotransmissão, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca;
- Laboratório de Eletrofisiologia Celular, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a colaboração da Profa. Dra. Lígia Araújo Naves Kushmerick e do discente Wallace Lúcio Camargo;
- Núcleo de Neurociências, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a colaboração da Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes e da discente Cristiane Perácio Bastos;
- Centro de Aquisição e Processamento de Imagens, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais; CAPI
- Centro de Microscopia da UFMG, sob a colaboração do Dr. Hermann Alecsandro Rodrigues e da discente Jéssica Andrade Neves.
- Laboratório Professora Conceição Machado do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais.
- Laboratório de Terapêutica Experimental I – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a colaboração da Professora Carla Máximo Prado.

O apoio financeiro foi obtido através das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao meu marido e filho, Marco Antônio e Matheus, à minha mãe, Inês, ao Edu e meu pai, Francisco, aos meus irmãos, Gabriela, Raoni e Milena e à minha sogra, Lilia, eu dedico esse trabalho com muito amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de iniciar no ICB/UFMG meu doutorado e nele concluir.

Agradeço também às pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho:

- Ao meu marido, Marco Antônio, por ter me acompanhado em todas as etapas, pela paciência, cumplicidade e companheirismo sempre. Ao meu filho, Matheus, que me acompanhou ainda em útero nos experimentos e por ser minha fonte de inspiração e de força.
- À minha mãe, Inês e ao Edu pelo apoio incondicional e sacrifício em prol do amor e da fé no meu trabalho.
- Aos meus irmãos, Gabriela, Raoni e Milena, por serem meu apoio e pelo companheirismo e amizade sempre.
- À minha sogra, Lilia, pela força nos momentos difíceis, especialmente nos processos finais para a realização deste.
- Aos tios Gilmar e tia Gilma, por me servirem de inspiração.
- À todos os familiares que torceram por mim.
- Às amigas, Patrícia e Onésia por se tornarem minha família em Belo Horizonte e pelo carinho sempre.
- À professora Débora d'Avila Reis por ter me direcionado para este trabalho e por todos os ensinamentos.
- À professora Cristina Guatimosim, pela confiança, pelo direcionamento e por todo aprendizado.
- À professora Janice por todo aprendizado, incentivo e amizade.
- Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia da Neurotransmissão: Bárbara, Fernanda, Jéssica, Hernamm, Marina, Matheus Fonseca, Matheus Proença, Priscila, Rayara, Rubens, por contribuírem de forma direta para meu aprendizado.
- Ao querido amigo, Matheus Proença, por toda colaboração e pela amizade.
- Aos colegas Diogo Guimarães, Cristiane Perácio e Wallace Camargo, Jéssica Neves e Matheus Fonseca por toda ajuda com animais e experimentos.

- Aos meus professores e amigos do curso de pós-graduação em Biologia Celular e do Departamento de Morfologia.
- A todos os outros colegas e amigos da UFMG.
- Às amigas e amigos do vôlei da AABB pelos bons momentos que passamos juntos.
- Aos professores presentes direta ou indiretamente no trabalho: Lígia Naves, Grace Schenatto, Patrícia Massara, Silvia Guatimosim, Carla Prado, Camila Leite, Paula Scalzo e José Carlos.
- À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.
- Ao corpo diretor do Centro de Microscopia da UFMG e do CAPI-ICB-UFMG.
- Às secretárias da pós-graduação pelo carinho e atenção.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 - INTRODUÇÃO.....	18
1.1. – A transmissão neuromuscular esquelética.....	18
1.1.1 – As junções neuromusculares (ou placas motoras).....	18
1.1.2 – Síntese, armazenamento e liberação de ACh.....	22
1.2 – Os Músculos Estriados Esqueléticos.....	26
1.2.1 – Estrutura e organização dos músculos esqueléticos.....	26
1.2.2 – Fisiologia da contração muscular esquelética.....	29
1.2.3 – Disfunções colinérgicas nas JNMs e músculos esqueléticos.....	31
2 – OBJETIVOS.....	35
2.1 – Objetivo geral.....	35
2.2 – Objetivos específicos.....	35
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 – Animais VChT.....	37
3.2 – Comitê de Ética.....	38
3.3 – Testes de função pulmonar.....	39
3.3.1 – Medida da função pulmonar <i>in vivo</i> - técnica não invasiva.....	39
3.3.2 – Medida da mecânica pulmonar em animais anestesiados – técnica invasiva.....	40

3.4 – Testes Comportamentais – Avaliação da Função Neuromuscular Geral.....	42
3.4.1 – Teste para Atividade Locomotora - Campo Aberto (<i>Open Field</i>).....	42
3.4.2 – Teste para força de Agarre (<i>Wire-hang</i>).....	43
3.4.3 – Teste para coordenação motora (<i>Rotarod</i>).....	43
3.5 – Preparação do músculo diafragma e nervo associado (nervo frênico).....	44
3.6 – Monitoramento da exocitose e endocitose com FM1–43 e FM1–43fx.....	44
3.7 – Imunofluorescência para detectar os elementos pré e pós-sinápticos das JNMs.....	47
3.8 – Histologia de rotina.....	47
3.9 – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	48
3.10 – Registros eletrofisiológicos de MEPPs.....	49
3.11 – Imunofluorescência para determinação das isoformas da cadeia pesada de miosina.....	50
3.12 – Análise estatística.....	51
4 – RESULTADOS.....	53
4.1 – A redução a longo prazo da expressão de VAcHT não provoca alterações na função pulmonar.....	53
4.2 – A redução a longo prazo da expressão de VAcHT não altera a morfologia das JNMs do músculo diafragma e mantém as alterações encontradas nas VSs já determinadas previamente aos 3 meses de idade no plano ultraestrutural.....	55
4.3 – A redução a longo prazo da expressão de VAcHT altera a atividade sináptica, mas mantém a morfologia das JNMs de maneira dependente da atividade da terminação nervosa no músculo diafragma.....	61
4.4 – A redução a longo prazo da expressão de VAcHT acarreta prejuízos na função neuromuscular geral.....	69
4.5 – A redução a longo prazo da expressão de VAcHT ocasiona alterações na morfologia e composição molecular dos músculos SOL e EDL.....	71

4.6 – Reversão parcial da função neuromotora e da morfologia dos músculos SOL e EDL em camundongos com redução a médio prazo (6 meses) da expressão de VAcHT após tratamento com piridostigmina.....78

5 – DISCUSSÃO.....83

5.1 – Função Pulmonar, Morfologia e Atividade Sináptica das JNMs do músculo diafragma de camundongos com redução a longo prazo da expressão de VAcHT.....83

5.2 – Função Neuromuscular e Morfologia dos músculos SOL e EDL de camundongos com redução a longo prazo da expressão de VAcHT.....90

6 – CONCLUSÃO.....97

7 – REFERÊNCIAS.....99

8 – ANEXOS.....122

8.1 – ARTIGO 1 (submetido): Mice with Long Term Cholinergic Deficit Present Motor Behavior Impairment and Alterations in the Slow-twitch Soleus Muscle

8.2 – ARTIGO 2 (publicado não relacionado): Increased levels of IL-17A in patients with fibromyalgia

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATP	Trifosfato de Adenosina
DNA	Acido desoxirribonucleico
CAPi	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT ₁	Transportador de colina de alta afinidade
CSA	Área de Secção Transversal
CO ₂	Dióxido de carbono
DHPR	Receptor de dihidropiridina
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDL	Músculo Extensor Longo dos Dedos
EPP	Potencial de placa motora
FM1-43	<i>N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(4(dibutylamino)-styryl)pyridinium dibromide</i>
FM1-43 fx	<i>N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(4(dibutylamino)-styryl)pyridinium dibromide fixable</i>
H ⁺	Íon hidrogênio
Hz	Hertz
JNM	Junção Neuromuscular
K ⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio

MEPPs	Potencial de placa motora em miniatura
Mg ²⁺	Íon magnésio
ms	Milisegundo
mV	Milivolt
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MLC	Cadeia leve da miosina (<i>myosin light chain</i>)
MRF	Fatores Miogênicos Reguladores
MuRF1	proteína ubiquitina ligase específica do músculo
MuSK	Kinase músculo-específica
MyoD	Fator de Diferenciação Miogênica 5
Myf5	Fator Miogênico 5
MyHC	Cadeia Pesada de Miosina (<i>Myosin heavy chain</i>)
μM	Micromolar
MΩ	Megaohm
Na ⁺	Íon sódio
nAChR	Receptores nicotínicos para ACh
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NFκB	Fator nuclear kappa B
NH ₄ ⁺	Íon amônio
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
PM	Placa Motora
RS	Retículo sarcoplasmático

RyR1	Receptores de rianodina
SEM	Erro padrão da média
SMC	Síndrome Miastênica Congênita
SOL	Músculo <i>Soleus</i>
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
TnC	Troponina C
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TnI	Troponina I
TnT	Troponina T
TTX	Tetrodotoxina
VAcHT	Transportador vesicular da acetilcolina
VAcHT KD ^{HOM}	<i>Knockdown</i> homozigoto para o gene VAcHT
VAcHT ^{del/del}	<i>Knockout</i> para o gene VAcHT
VH ⁺ -ATPase	Bomba vesicular de íons hidrogênio
VSs	Vesículas sinápticas
WT	<i>Wild-type</i> (animais do tipo selvagem)
μ M	Micromolar
μ m	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento da JNM no músculo tibial anterior em camundongos.....	20
Figura 2 - Estrutura da JNM em camundongos adultos (JNM madura).....	21
Figura 3 - Elétron-micrografia dos elementos sinápticos das junções neuromusculares do músculo diafragma.....	22
Figura 4 - Síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina.....	25
Figura 5 - Estrutura do músculo esquelético.....	28
Figura 6 - Processo de contração do músculo esquelético.....	31
Figura 7 - Esquema representativo da estratégia utilizada na geração de camundongos mutantes para o transportador vesicular de Acetilcolina (VChT).....	38
Figura 8 - Pletismografia de corpo inteiro para avaliação da função pulmonar em camundongos.....	40
Figura 9 - Ventilador mecânico para avaliação da mecânica pulmonar em camundongos.....	42
Figura 10 - A redução a longo prazo da expressão de VChT não acarreta alteração na função e mecânica pulmonar.....	54
Figura 11 - Morfologia das JNMs de camundongos WT e VChT KD ^{HOM} com 12 meses de idade.....	56
Figura 12 - A redução a longo prazo na expressão de VChT não ocasiona alterações na morfologia das JNMs - Quantificação dos elementos sinápticos.....	57
Figura 13 - A morfologia das VSs permanece alterada em camundongos com deficiência colinérgica a longo prazo (12 meses).....	58
Figura 14 - Degenerações mitocondriais presentes nos animais WT e VChT KD ^{HOM} aos 12 meses de idade.....	60
Figura 15 - A redução a longo prazo na expressão de VChT (12 meses) não ocasiona alterações na atividade sináptica das JNMs.....	62
Figura 16 - Quantificação das NMJs marcadas com FM1-43 fx e α -bungarotoxina em camundongos com redução da expressão do VChT a longo prazo.....	63
Figura 17 - Exocitose de VSs em camundongos WT e VChT KD ^{HOM} de 12 e 24 meses.....	65

Figura 18 - A redução a longo prazo da expressão de VACHT (12 meses) ocasiona aumento na liberação espontânea de vesículas - Quantificação da exocitose espontânea e evocada por solução contendo alta concentração de KCl.....	66
Figura 19 - Redução a longo prazo (12 meses) da expressão de VACHT altera a liberação quântica de ACh – MEPP.....	68
Figura 20 - Testes para função neuromuscular.....	70
Figura 21 - A redução a longo prazo da expressão de VACHT (12 e 24 meses de idade) acarreta déficits na função neuromuscular.....	70
Figura 22 - A redução a longo prazo da expressão VACHT acarreta aumento na CSA e Perímetro do músculo SOL (de contração lenta)	72
Figura 23 - A redução a longo prazo da expressão de VACHT acarreta redução na CSA e Perímetro do músculo EDL (de contração rápida).....	73
Figura 24 - A redução a longo prazo na expressão de VACHT favorece o acúmulo de grânulos de glicogênio intramiofibrilar e intermiofibrilar no músculo SOL.....	75
Figura 25 - A redução a longo prazo da expressão de VACHT altera a composição do tipo de fibra muscular do músculo SOL dos VACHT KD ^{HOM} , mas não no EDL.....	77
Figura 26 - Tratamento com piridostigmina reverte parcialmente os déficits neuromusculares nos camundongos VACHT KD ^{HOM}	79
Figura 27 - O tratamento com piridostigmina reverte parcialmente as alterações na CSA e Perímetro do músculo SOL encontrados nos camundongos VACHT KD ^{HOM}	80
Figura 28- O tratamento com piridostigmina reverte as alterações na CSA e Perímetro do músculo EDL encontrados nos camundongos VACHT KD ^{HOM}	81

RESUMO

A junção neuromuscular (JNM) é essencial para a comunicação entre a terminação nervosa e as fibras musculares esqueléticas levando à contração do músculo esquelético. Um dos pontos mais críticos do processo de neurotransmissão colinérgica envolve o evento de armazenamento da acetilcolina (ACh) nas vesículas sinápticas (VSs) via transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Para avaliar a participação e a importância funcional do VACHT na neurotransmissão colinérgica, Prado *et al.* (2006) geraram uma linhagem de camundongos que apresenta expressão reduzida (*knockdown*) do gene do VACHT. Esses animais apresentam uma diminuição (~70 %) na expressão da proteína VACHT, porém possuem déficits cognitivos e são miastênicos. Além disso, os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam outras alterações nas JNM como redução do tamanho e conteúdo quântico, redução da frequência potenciais de placa motora em miniatura e déficit na força muscular. No entanto, pouco se sabe sobre o que acontece com a morfologia e função do músculo esquelético e da JNM de camundongos que já possuem déficit colinérgico desde o nascimento até atingirem meia idade e a senescência, ou seja, um déficit colinérgico a longo prazo. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis alterações morfofuncionais dos elementos sinápticos de JNM do diafragma, bem como o de avaliar morfofuncionalmente os músculos *soleus* (SOL) e extensor longo dos dedos (EDL) de camundongos com disfunção colinérgica (*knockdown* para o gene do VACHT) a longo prazo. Através da realização de pletismografia e ventilação mecânica para avaliação pulmonar, percebemos que os camundongos VACHT KD^{HOM} não se diferiram dos selvagens (WT) nos parâmetros avaliados. Observamos também que os camundongos VACHT KD^{HOM} não apresentaram diferença quanto a avaliação dos elementos pré e pós-sinápticos da JNM do músculo diafragma, seja de maneira dependente ou não da atividade da terminação nervosa, assim como também não apresentaram alterações ultraestruturais adicionais. No entanto, percebemos que a redução a longo prazo de VACHT acarretou numa maior liberação espontânea de vesículas e provocou alteração na amplitude dos potenciais de placa motora em miniatura (MEPPs) comparado aos VACHT WT. Além disso, os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram pior desempenho em testes que avaliam a força muscular, o deslocamento e coordenação associado com alterações na área de secção transversal (CSA) e perímetro do músculo SOL e EDL, sendo o SOL apresentando hipertrofia e o EDL atrofia das suas fibras musculares. Além do mais, foram percebidas trocas na composição do tipo de fibra no músculo SOL dos VACHT KD^{HOM} associado a acúmulos de glicogênio intra e intermiofibrilar. Essas alterações nas CSA encontradas nos músculos SOL e EDL foram parcialmente revertidas com 28 dias de tratamento com o fármaco anticolinesterásico, piridostigmina. Todos esses dados sugerem que a liberação de ACh possui um distinto papel na manutenção da estrutura das fibras musculares sendo fundamental para a função muscular global ao longo da vida do animal e que a redução de VACHT pode provocar alterações na liberação espontânea, mas não na liberação evocada de VSs em camundongos com déficit colinérgico a longo prazo.

ABSTRACT

The Neuromuscular Junctions (NMJ) is essential for the neuronal communication between the nerve terminals and muscle fibers leading to muscle contraction. One of the most critical processes of cholinergic transmission involves the event of storage of acetylcholine (ACh) in synaptic vesicles (SVs) through the vesicular acetylcholine transporter (VACHT). To assess the functional importance of the VACHT in the cholinergic transmission, Prado *et al.* (2006) generated a strain of mice knockdown for the VACHT gene and these animals have a pronounced deficit of muscle strength and motor performance. The VACHT *knockdown* (VACHT KD^{HOM}) mouse model exhibited a ~ 70% decrease in VACHT expression reaches adulthood, but they are myasthenic and present cognitive deficits. In addition, VACHT KD^{HOM} mice present others alterations at the neuromuscular synaptic level such as a reduction in quantal content and size, reduced miniature end-plate potentials frequency, impairment of motor performance and severe deficit in muscle strength. Although some alterations seen in VACHT KD^{HOM} adult mice are already known, there is a lack of information when it comes to cholinergic dysfunction in middle aged and senescence mice. Could it induce further structural and functional changes on pre and postsynaptic components? Thereby, in this work our main goal was to investigate possible pre and postsynaptic alterations in NMJ of the diaphragm muscle and *soleus* (SOL) and *extensor digitorum longus* (EDL) muscles from mice with long-term cholinergic deficit. We show that diaphragm from mouse with reduced expression of VACHT does not present major changes in NMJ morphology or pulmonary function but presents alterations in the release of spontaneous synaptic vesicles, amplitude of the miniature end plate potential (MEPP). In addition, we observed that VACHT KD^{HOM} mice performed worse in behavioral motor tests compared to WT littermates with the same age. Accordingly, we found that the SOL muscle fibers from VACHT KD^{HOM} mice presented a significant increase in the cross sectional area (CSA) and expression of the type I Myosin Heavy Chain isoform (MyHC) and EDL presented a reduction in CSA in ours fibers. In addition, we also observed the presence of intramyofibrillar e intermyofibrillar glycogen in SOL muscles from VACHT KD^{HOM} mice that were not found in their WT counterparts. Noteworthy, VACHT KD^{HOM} mice treated with acetylcholinesterase inhibitor pyridostigmine performed similar to WT in motor tests and the CSA of SOL and EDL muscle fibers were partially rescued to control values, suggesting that an increase in ACh availability at the synaptic cleft helps reversing these motor deficits. These data suggest that ACh release plays a distinct role in maintaining the structure of muscular fibers and muscular function general, as well as being important in the regulation of spontaneous release of vesicles.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A transmissão neuromuscular esquelética

1.1.1. As junções neuromusculares (ou placas motoras)

A neurotransmissão nos músculos estriados esqueléticos ocorre entre a terminação nervosa do neurônio motor situado em regiões ventrais da medula espinhal com a membrana da célula muscular esquelética. Esse local onde ocorre a interação entre essas duas células é denominado de Junção Neuromuscular (JNM) ou Placa Motora (PM) e o comunicador central do processo é o neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Nicholls, 1994; Hammond, 2008). A sinapse periférica da JNM de mamíferos é descrita como sendo um dos modelos de sinapses mais estudados com relação ao seu desenvolvimento, manutenção e degeneração devido ao seu tamanho, sua simplicidade estrutural e acessibilidade (Sanes and Lichtman, 1999; Kummer *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da JNM ocorre ainda no período embrionário onde o axônio do neurônio motor alcança a região central da fibra muscular por volta do 12º dia embrionário em camundongos, porém ainda não existe a presença dos receptores nicotínicos para ACh (nAChR) na membrana da fibra muscular. Porém, já no período pós-natal as fibras musculares encontram-se poli-inervadas no qual sucede o fenômeno denominado eliminação sináptica (Lichtman and Sanes, 2003). Esse pode ser observado em camundongos, por volta do 14º dia de vida pós-natal, ocorrendo a eliminação das inervações múltiplas e ficando apenas uma terminação nervosa para cada receptor nicotínico (Balice-Gordon and Lichtman, 1993; revisado por Shi *et al.*, 2012).

O aparecimento dos nAChR na membrana da fibra muscular acontece por volta do 14º dia embrionário mas sem colocalização com a terminação nervosa (revisado por Sanes e Lichtman, 1999). Já no 18º dia embrionário, os aglomerados de nAChR se encontram em correta aposição, ou colocalização com a terminação nervosa do neurônio motor. Os nAChR são inicialmente formados por mecanismos intrínsecos musculares (proteína Musk – quinase específica do músculo), e a sua colocalização com a terminação nervosa é mantida por fatores liberados pela terminação nervosa, como por exemplo, a agrina, laminina (Lin *et al.*, 2001; Nishimune *et al.*, 2008) bem como a liberação de ACh que também tem sido demonstrada como um fator determinante na

distribuição dos receptores nicotínicos na membrana muscular (de Castro *et al.*, 2009) **(Figuras 1 e 2)**.

A morfologia pós-natal dos aglomerados de nAChR se apresenta, no início do período pós-natal, na forma de uma placa fechada e no decorrer do desenvolvimento, essas placas se tornam perfuradas até chegarem, por volta de três semanas, na estrutura típica com suas placas multiperfuradas e maiores devido ao crescimento das fibras musculares (Shi *et al.*, 2012). Juntamente com os nAChR em forma de placa nos primeiros dias de vida do camundongo, ocorre a formação de dobras juncionais na membrana das fibra muscular, logo abaixo da terminação axonal. Os nAChRs estão localizados nas cristas e nas laterais dessas dobras sendo que os canais de sódio (Na^+) localizam-se mais profundamente, culminando em um arranjo que facilita a eficácia da transmissão sináptica (Covault & Sanes 1986; Flucher & Daniels, 1989; Wood & Slater, 1997). Além dos nAChRs, existem outras proteínas fundamentais para a manutenção da estrutura da membrana pós-sináptica como as de ancoragem e as sinalizadoras que são amparadas pelo citoesqueleto (Slater, 1982; revisado em Salpeter & Loring, 1985; Moscoso *et al.*, 1995; Valenzuela *et al.*; 1995, Zhu *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1996). Com toda essa estrutura, a membrana pós-sináptica se torna especializada e madura **(Figura 2)**.

Os constituintes da matriz extracelular e lâmina basal também se tornam especializados nesse período de maturação da JNM com a presença de colágeno IV, laminina, entactina e proteoglicanas além de abrigar a enzima acetilcolinesterase, que degrada a molécula de ACh e moléculas sinalizadoras como a agrina e neuregulina (Krejci *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1988). A célula de Schwann terminal, inicialmente permanece na fenda e durante a maturação da JNM ela se retrai do interior da fenda e passa a envolver a terminação nervosa contribuindo para a manutenção da JNM e proporcionando isolamento entre o neurônio motor e o ambiente extracelular (Jahromi *et al.*, 1992; Todd *et al.*, 2007). **(Figuras 1 e 2)**.

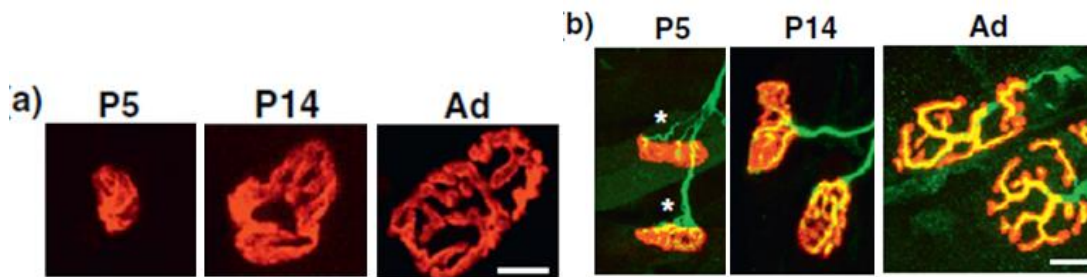


Figura 1: Desenvolvimento da JNM no músculo tibial anterior em camundongos: a) Morfologia dos aglomerados de AChR que inicialmente aparecem como placas ovais fechadas. Dentro de três semanas de vida pós-natal, os aglomerados de AChR se transformam em placas multiperfuradas. P, dia pós-natal; Ad, adulto. b) Durante as duas semanas de vida pós-natal, ocorre a eliminação sináptica nas placas motoras poli-inervadas (asteriscos), que passam a ser unicamente inervadas. Após, os terminais axonais se tornam perfeitamente alinhados com aglomerados de AChR. Os aglomerados de AChR são marcados com α -bungarotoxin (BTX; vermelho) os terminais nervosos são marcados com sinaptofisina-neurofilamento (verde) Barra de escala 10 μ m. Adaptado a partir de Shi *et al.* (2012).

A estrutura das JNMs maduras tem alta relação com sua atividade funcional. Dessa forma, a correta sobreposição das suas estruturas torna a neurotransmissão periférica altamente eficaz. Essa sobreposição da terminação nervosa com os receptores nicotínicos para ACh e as células de Schwann terminais podem ser facilmente visualizadas pela microscopia de confocal e (**Figura 2**) (Zuo and Bishop, 2008; Valdez *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2012) utilizando-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, é possível a observação das JNMs em maiores detalhes (**Figura 3**). Nesse caso, pode ser observada a terminação nervosa, com a presença de numerosas vesículas contendo o neurotransmissor ACh principalmente localizadas em regiões próximas a região da membrana pré-sináptica chamada de zona ativa, que é o local onde as vesículas sinápticas (VSs) se fundem com a membrana para que ocorra a liberação do seu conteúdo na fenda sináptica. Ainda no interior da terminação, são observadas várias mitocôndrias, que são organelas fundamentais para prover a energia para a síntese e liberação do neurotransmissor. No local logo abaixo da terminação nervosa é visualizada a fenda sináptica, que é onde a ACh será liberada e posteriormente degradada após se ligar nos receptores nicotínicos para ACh em locais especializados da membrana da fibra muscular. Esses locais especializados, por sua vez, ficam logo abaixo da fenda e se caracterizam pela presença das dobras juncionais. Esse arranjo estrutural das JNMs contribui para a eficiência do mecanismo de liberação da ACh, para que a mesma atue sobre a célula muscular (revisado por Katz, 1966, Yee *et al.*, 1988;

revisado por Sanes and Lichtman, 1999 e 2003; Robitaille *et al.*, 1993; Martin, 1994; Sugiura *et al.*, 1995; Day *et al.*, 1997; Zuo and Bishop, 2008; Valdez *et al.*, 2010 e 2012; revisado por Shi *et al.*, 2012).

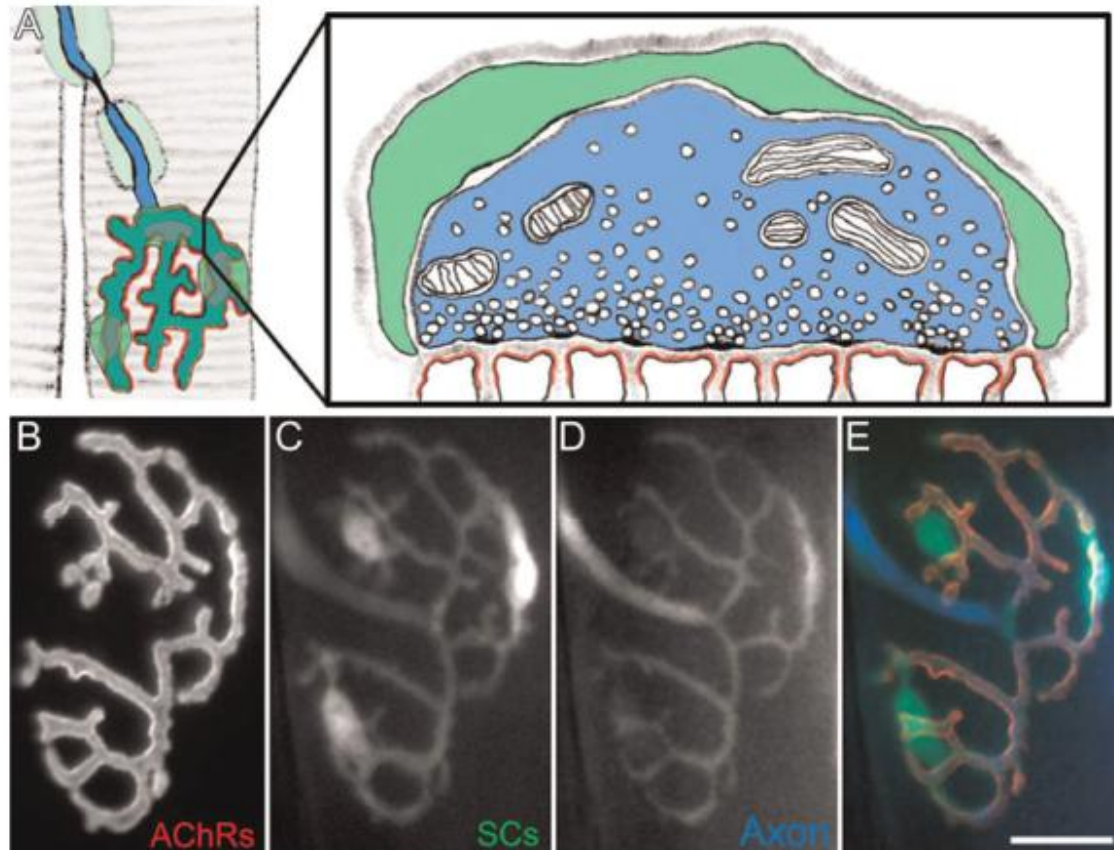


Figura 2. Estrutura da JNM em camundongos adultos (JNM madura): (A) Ilustração da relação entre o axônio (azul), células de Schwann (verde) e AChRs (vermelho). (B) Esquema de uma micrografia eletrônica mostra a disposição ultra-estrutural dos processos das células de Schwann (verde), o terminal do axônio (azul), AChRs (vermelho) e lâmina basal (cinza). Imagens de microscopia de fluorescência *in vivo* dos AChRs (B), das células de Schwann (C), do terminal axonal (D) e colocalização das estruturas (E). Escala de barra: 10 μ m. (Zuo and Bishop, 2008).

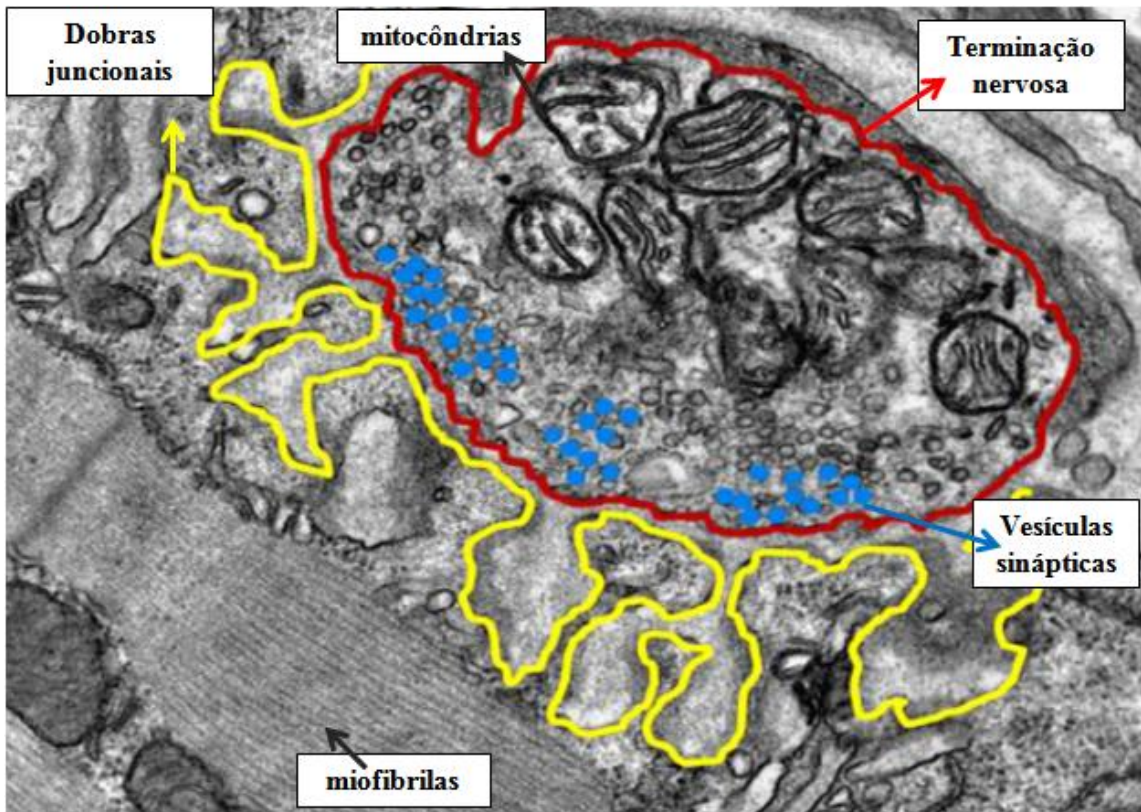


Figura 3. Elétron-micrografia dos elementos sinápticos das junções neuromusculares do músculo diafragma. Representações esquemáticas dos perfis das terminações nervosas (contorno vermelho), dos perfis de dobras juncionais pós-sinápticas (contorno amarelo) e de VSs (azul). Além disso, podem ser visualizadas as miofibrilas da célula muscular esquelética abaixo das dobras juncionais e presença de grande número de mitocôndrias no interior da terminação. Adaptado de Rodrigues *et al.* (2013).

1.1.2 Síntese, armazenamento e liberação de ACh

Além do arranjo estrutural dos componentes da JNM, a síntese, armazenamento e liberação da ACh são fatores que contribuem para a eficácia da interação entre a célula neuronal e a célula muscular (Nguyen *et al.*, 1998; revisado por Prado *et al.*, 2002 e Bravo & Parsons, 2002; Prado *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2013).

A síntese da ACh ocorre no interior da terminação nervosa e se inicia pela ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT) utilizando para tal os substratos colina, provido da própria reutilização dos metabólitos de moléculas de ACh degradadas na fenda sináptica bem como da dieta e do acetil-Coa, provido do metabolismo mitocondrial. Uma vez sintetizada, a ACh precisa ser armazenada no interior das VSs. Para que isso ocorra, é necessário a presença de um transportador na membrana vesicular, que no caso da neurotransmissão da JNM é o VAcHT, uma proteína com 12 domínios transmembrana, específico em carrear moléculas de ACh (Nguyen *et al.*,

1998; revisado por Prado *et al.*, 2002 e Bravo & Parsons, 2002; Prado *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2013). Para que a proteína VACHT exerça sua função, ela necessita de um gradiente eletroquímico para transportar os neurotransmissores contra um gradiente de concentração (Maycox *et al.*, 1990; Gasnier, 2000). Esse é gerado por uma bomba de prótons presente na membrana vesicular, denominada VH^+ -ATPase. A VH^+ -ATPase, por sua vez, transloca prótons H^+ para o interior das VSs pela a hidrólise do ATP e com isso, acidifica (gradiente químico) e promove o acúmulo de cargas positivas no interior das VSs (gradiente elétrico) (Nguyen *et al.*, 1998; revisado por Prado *et al.*, 2002 e Bravo & Parsons, 2002; Rodrigues *et al.*, 2013). Com isso, a proteína VACHT realiza a troca de dois íons H^+ por uma molécula de ACh, preenchendo o interior das VSs com o neurotransmissor (Parsons *et al.*, 1993; revisado por Prado *et al.*, 2002).

Uma vez sintetizada, a ACh vai para o interior das VSs transportada pela proteína VACHT, sendo então liberada na fenda sináptica numa região próxima aos seus receptores. Contudo, para que a fusão das vesículas contendo ACh com a membrana do terminal ocorra, inicialmente é necessária a passagem de um potencial de ação pelo axônio. O potencial de ação desencadeia a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) sensíveis à voltagem e o influxo desse íon para o citoplasma da terminação nervosa. Esse evento promove a fusão das VSs com a membrana da terminação nervosa (membrana pré-sináptica) culminando na liberação do conteúdo vesicular na fenda, a qual se encontra a ACh (Alabi and Tsien 2012).

Após a excitação e ativação dos receptores nicotínicos, a ACh é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, gerando colina e acetato. A colina é recaptada para o interior da terminação por meio de seu transportador de membrana de alta afinidade (CHT1) e será novamente utilizada para a síntese de nova ACh (revisado por Ribeiro *et al.*, 2006). Nesse processo de síntese e liberação de acetilcolina, a expressão de VACHT representa um ponto-chave na regulação da transmissão colinérgica (Prado *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2013). De fato, camundongos *knockout* para a proteína VACHT ($VACHT^{del/del}$) morrem logo após o nascimento o que indica que o armazenamento de ACh mediada por VACHT é essencial para a vida e contribui para o desenvolvimento normal da JNM (De Castro *et al.*, 2009) (**Figura 4**).

Além da síntese de ACh, a neurotransmissão colinérgica das JNMs depende de uma série de eventos envolvendo as VSs na terminação nervosa, como já mencionado

anteriormente. De uma forma resumida, as VSs passam por um ciclo na terminação nervosa e para que este fenômeno ocorra é necessário, inicialmente, que as VSs se agrupem próximas às zonas ativas, local onde posteriormente, irão se ancorar com auxílio de proteínas específicas e realizar a exocitose. Dessas proteínas, as essenciais são as do complexo SNARE, as quais promovem a formação de um poro de fusão com membrana pré-sináptica culminando com a liberação da ACh na fenda sináptica (revisado por Sudhof, 2013). Logo após exocitose, ocorrerá uma endocitose compensatória, reciclagem e reenchimento com ACh para possibilitar um novo ciclo de liberação de vesículas (Reuser e Reese, *et al.*, 1973; Pyle *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2000 e 2003; revisado por Sudhof and Rizo, 2011).

A contração muscular é desencadeada pelo potencial de ação que leva a um aumento no Ca^{2+} citosólico na terminação nervosa. No entanto, na ausência de estímulo, ocorre a liberação espontânea de vesículas, ou seja, as vesículas se fundem naturalmente e espontaneamente com a membrana pré-sináptica. Cada VS contém aproximadamente 5.000-10.000 moléculas de ACh. A exocitose de uma só vesícula sináptica é medida em unidades discretas denominadas quanta que por sua vez, podem ser medidas através de potenciais de placa motora em miniatura (MEPPs) (Fatt and Katz 1952a; Naguib *et al.*, 2002; revisado por Van der Kloot, 2003). Apesar do termo “quanta” sugerir que a transmissão seja uniforme e fixa, a distribuição dos quanta demonstra um grande coeficiente de variação (revisado por Van der Kloot, 2003). Essa distribuição pode refletir diferenças na quantidade de neurotransmissor presente em cada vesícula e mesmo diferenças na sensibilidade da membrana pós-sináptica uma vez que, em experimentos eletrofisiológicos, os MEPPs são medidos na membrana da fibra muscular (Bekkers *et al.*, 1990). Tem sido documentado que variações na atividade e expressão de transportadores vesiculares podem representar uma fonte de variação no conteúdo quantal, e conseqüentemente na transmissão sináptica (Prado *et al.*, 2006). Como ao contrário da liberação evocada, a fusão espontânea de VSs não é capaz de gerar a despolarização na membrana da fibra muscular, sua função tem sido descrita principalmente, como mantenedoras das estruturas das JNMs (Fatt and Katz, 1950, 1952b; Del Castillo and Katz, 1954; revisado por Ramirez and Kavalali, 2011; Andreae and Burrone, 2014; Kaeser and Regehr, 2014; Rizzoli, 2014).

Todos esses processos explicitados acima, ou seja, a organização estrutural dos componentes das JNMs, a síntese de ACh no interior da terminação nervosa bem como

seu armazenamento em vesículas, fazem com que a neurotransmissão nesse local seja além de eficaz, um processo altamente coordenado. Essa coordenação, a qual tem grande importância a liberação do neurotransmissor por meio de VSs depende da vontade consciente de realizar movimentos musculares ou através dos atos reflexos sendo seu comando exercido por neurônios eferentes do córtex cerebral. Esses neurônios, ao fazerem sinapses com neurônios motores do corno ventral da medula, são capazes de gerenciar os impulsos nervosos que desencadearão o processo de contração muscular necessária para as mais diversas funções do sistema muscular realizadas pelos organismos (Fries, 2005; Isa *et al.*, 2013; Nas *et al.*, 2015).

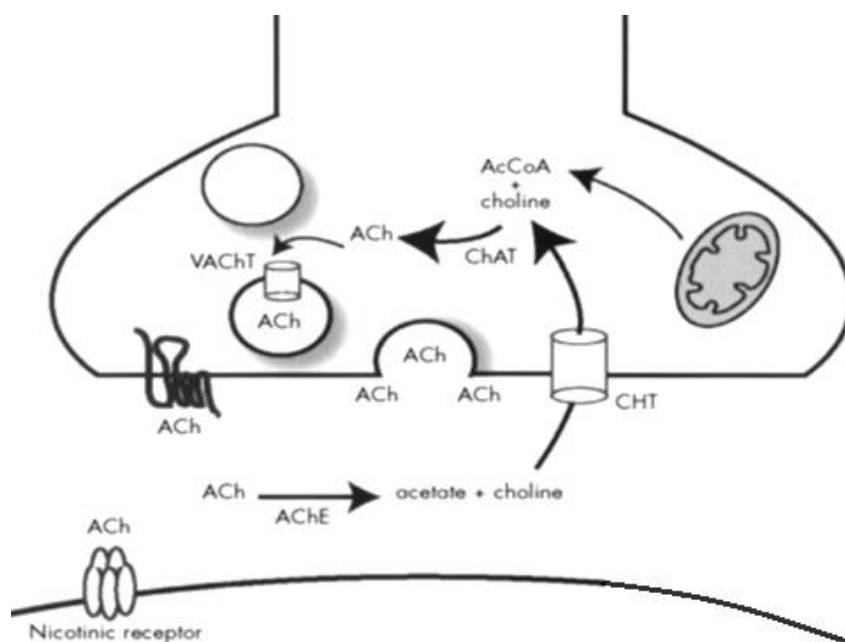


Figura 4: Síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina. A acetilcolina (ACh) é sintetizada na terminação nervosa pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir da colina e do acetil-CoA advindo da respiração mitocondrial. Após sua síntese, a ACh é armazenada no interior das vesículas sinápticas através do seu transportador vesicular, o VAcHT. Após a exocitose e ativação dos receptores pós-sinápticos, a acetilcolina é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, gerando colina e acetato. A colina é recaptada para o interior da terminação nervosa por meio de seu transportador de membrana de alta afinidade (CHT), podendo ser novamente utilizada para a síntese de nova ACh (Adaptado de *The American Psychiatric Publishing – Textbook of Psychopharmacology, fourth edition. Edited by Alan F. Schatzberg and Charles B. Nemeroff, 2009*).

1. 2. Os Músculos Estriados Esqueléticos

1.2.1. Estrutura e organização dos músculos esqueléticos

Os músculos estriados esqueléticos de mamíferos são heterogêneos e complexos em sua natureza, sendo um dos tecidos mais ativos metabolicamente. Eles se originam a partir de células mesodermas e sua diferenciação, maturação e desenvolvimento são controlados por um grupo de fatores de transcrição chamados de Fatores Miogênicos Reguladores (MRF), incluindo MyoD (Fator de Diferenciação Miogênica), Myf5 (Fator Miogênico 5), myogenin, dentre outros. Uma vez que esses fatores de transcrição são ativados, eles se ligam a regiões específicas do DNA (ácido desoxirribonucléico), estimulando a transcrição de genes. Esse mecanismo é importante para expressar o fenótipo da fibra muscular, pois controlam a expressão das proteínas miofibrilares, entre elas a Cadeia Pesada de Miosina (MyHC – Myosin heavy chain) e dessa forma regulam a diversidade, plasticidade e especialização do músculo esquelético (Olson and Klein, 1994, Calvo *et al.*, 1999; Hawke and Garry, 2001; Willoughby and Nelson, 2002; Raue *et al.*, 2006).

Inicialmente, os fatores de transcrição MyoD e Myf5 fazem com que as células mesodermas se transformem em mioblastos, que por sua vez se transformam em miócitos, uma célula mononucleada, pela ação de Myogenin e MRF-4. Em seguida, vários miócitos se unem formando a fibra muscular multinucleada e quando maduras seus núcleos encontram-se localizados na região periférica da fibra. Uma porção de mioblastos não diferenciados permanece na periferia das células musculares formando as células satélites. Essas células são importantes para crescimento e regeneração muscular e quando ativadas por estímulos específicos se fixam às fibras musculares já existentes (Seale and Rudnicki, 2000; Hawke and Garry, 2001; Kadi *et al.*, 2004; Rando, 2006).

Macroscopicamente, é possível verificar que a maioria dos músculos estriados esqueléticos se prende aos ossos por meio de tendões localizados em ambas as extremidades e podem cruzar uma ou várias articulações (Kernell, 2006). Já no plano morfológico, observa-se que cada fibra muscular esquelética é envolta por um tecido conjuntivo fibroso denominado endomísio. O agrupamento de até 150 fibras, as quais são envolvidas também por camada de tecido conjuntivo fibroso, o perimísio, delimitam

os feixes ou fascículos musculares. Por fim, o agrupamento de vários feixes ou fascículos pelo tecido conjuntivo mais externo, o epimísio, caracteriza o músculo em toda sua unidade (Flück and Hoppeler, 2003).

Cada fibra muscular possui uma membrana plasmática, denominada sarcolema e acima dela nota-se a presença da membrana basal, formada por proteínas e filamentos de colágeno. Entre o sarcolema e a membrana basal são encontradas as células satélites. No interior do sarcolema localiza-se o sarcoplasma, onde se encontram organelas especializadas, dentre elas o retículo sarcoplasmático, constituído por uma rede de canais tubulares que permitem a propagação da onda de despolarização por toda a fibra, regulando o fluxo de cálcio (Flück and Hoppeler, 2003) (**Figura 5A e B**).

No interior do sarcoplasma se localizam as miofibrilas. Elas são compostas por filamentos proteicos finos e espessos que ficam ligados ao sarcolema através de uma proteína chamada distrofina. Esses filamentos constituem os sarcômeros, unidades iguais e repetidas, delimitadas pelas linhas Z que, além de permitir a contração muscular, está relacionado com a organização e coesão da fibra muscular (Huxley, 1969) (**Figura 5B**). Os filamentos finos são formados por actina, tropomiosina, troponina e tropomodulina. A actina é formada por um polímero longo, a actina F, e por duas cadeias de monômeros globulares, a actina G, torcidas uma sobre a outra. A tropomiosina é uma molécula longa e fina, formada por duas cadeias polipeptídicas com arranjo em dupla hélice, em orientação paralela, localizada ao longo do sulco entre os filamentos de actina F. A troponina é um complexo protéico formado por três subunidades no músculo esquelético (TnC, TnI e TnT), com funções específicas, sendo que a troponina C (TnC), é a subunidade em que o cálcio se liga, sendo essencial para a ligação com a miosina. A troponina I (TnI) inibe a ação da actina e a atividade da ATPase e a troponina T (TnT) faz a ligação com a tropomiosina. A tropomodulina é a proteína que mantém os filamentos de actina em seu comprimento (Schiaffino and Reggiani, 1996).

Os filamentos espessos são representados pela miosina e pelas proteínas C, H, M e miomesina (Schiaffino and Reggiani, 1996). A miosina é constituída por duas cadeias pesadas (myosin heavy chain, MyHC) enroladas em α -hélice e quatro cadeias leves (myosin light chain, MLC) (Lowey *et al.*, 1969; Weeds & Lowey, 1971; Elliott & Offer, 1978). A MyHC é ainda separada em duas porções: meromiosina leve (light meromyosin, LMM), em forma de bastão, e meromiosina pesada (heavymyosin,

HMM), em forma globular. Essa última contém um sítio de ligação para a actina e uma região de ligação para a molécula de Trifosfato de Adenosina (ATP) com atividade ATPase sendo que após hidrólise de ATP ocorre a interação da actina com miosina produzindo a contração muscular (Huxley, 1969; Lowey *et al.*, 1969; Schiaffino and Reggiani, 2011).

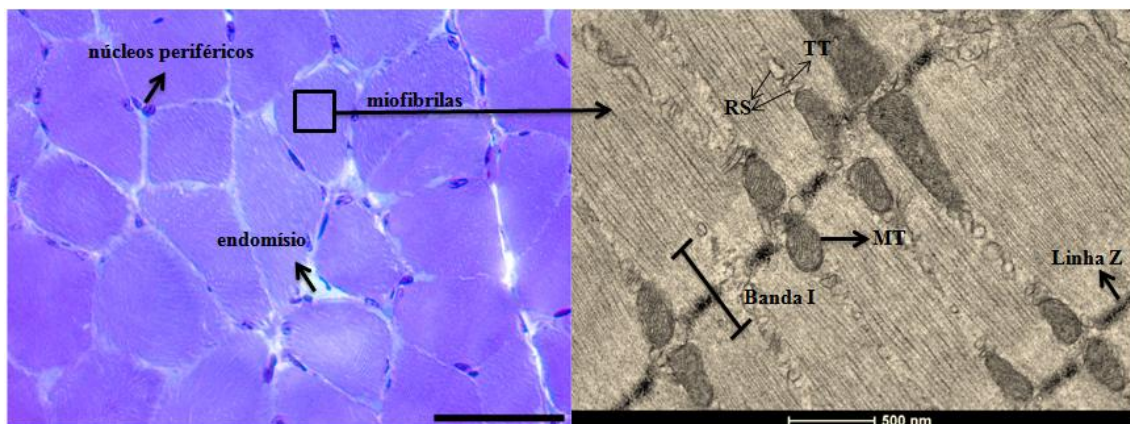


Figura 5: Estrutura do músculo esquelético: A) Corte transversal de músculo esquelético *Soleus* corado com azul de toluidina. São demonstradas as fibras musculares com os núcleos localizados periféricamente e envoltas pelo endomísio, o quadrado delimita as miofibrilas no interior da célula e na direita a representação das mesmas vistas em maiores detalhes por microscopia eletrônica de transmissão. Barra de escala 50 µm. B) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a ultraestrutura da célula muscular esquelética. Podem ser visualizadas a Linha Z, os Túbulos T (TT), o Retículo Sarcoplasmático (RS), Mitocôndrias (MT) e Banda I. Barra de escala 500nm.

A miosina apresenta isoformas da cadeia pesada de sua molécula (MyHC), que por sua vez, determinam a velocidade de contração do músculo esquelético (Barany, 1967; Talmadge & Roy, 1993; Pette & Staron, 2000). Isso ocorre uma vez que a velocidade de contração está relacionada com a atividade ATPase da porção globular da cadeia pesada da miosina e além disso, existe uma correlação positiva entre a atividade ATPase e tipo de fibra muscular. Por exemplo, as fibras rápidas, possuem maior atividade ATPase da cabeça globular da miosina (Talmadge & Roy, 1993).

De acordo com a classificação baseada na velocidade de contração e expressão da MyHC são identificados dois grupos de fibras musculares: as de contração rápida e lenta. As fibras de contração rápida apresentam as isoformas IIA, IIX e IIB da MyHC enquanto que as fibras lentas apresentam a isoforma I. A fibra IIX é a que apresenta a maior velocidade de contração e a fibra tipo I menor velocidade. (Chai *et al.*, 2011;

Schiaffino and Reggiani, 2011; Valdez *et al.*, 2012). Os autores classificam essas fibras como puras, uma vez que expressam uma única isoforma de MyHC. Além das fibras puras, existem as fibras “híbridas”, que expressam duas ou mais isoformas de MyHC (Pette & Staron, 2000).

As fibras musculares de contração lenta são inervadas por JNMs pequenas e as fibras de contração rápida por JNMs maiores. Além disso, as JNMs de fibras tipo II, como o músculo extensor longo dos dedos (EDL), possuem maior amplitude de potencial de placa motora (EPP) quando comparado a fibras tipo I, porém, essa amplitude decresce durante estimulações repetidas. Já em fibras lentas, como as existentes em grandes quantidades no músculo *Soleus* (SOL), apresentam amplitude de EPP menores que as encontradas nas do tipo II, porém elas conseguem manter por mais tempo a quantidade de ACh liberada (Reid *et al.*, 1999; Schiaffino and Reggiani, 2011).

Essa diversidade funcional dos diferentes tipos de fibras, sua estrutura, composição molecular e funcionalidade, confere ao músculo esquelético uma alta capacidade para realizar uma variedade de demandas funcionais (Campos *et al.*, 2002).

1.2.1 Fisiologia da contração muscular esquelética

De maneira geral, o processo de contração do músculo esquelético ocorre pela despolarização da membrana das fibras musculares em consequência da despolarização da terminação nervosa do neurônio motor (Lamb, 2000; Grefte *et al.*, 2007; Kernell, 2006).

A partir do momento em que as VSs se fundem com a membrana pré-sináptica, as moléculas de ACh liberadas na fenda sináptica das JNMs se ligam nos nAChR na membrana pós-sináptica. Isso desencadeia a despolarização e consequente propagação de um potencial de ação pela membrana muscular esquelética (sarcolema). O potencial de ação gerado é propagado ao longo das fibras, passando por estruturas tubulares denominadas Túbulos T. Os Túbulos T estão intimamente próximos ao retículo sarcoplasmático (RS), que são responsáveis por armazenar o cálcio intracelular (**Figura 5B e 6**). Na região dos túbulos T na membrana sarcoplasmática são encontrados os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (chamados receptores de dihidropiridinas - DHPR) e na membrana do RS são encontrados os receptores de rianodina (RyR1), também canais de Ca^{2+} , e responsáveis pela liberação do Ca^{2+} do interior do RS. A passagem do potencial de ação pela região dos túbulos T atinge os canais sensíveis a voltagem, os

DHPR, que por sua vez controlam a abertura dos receptores RyR1 no RS (Lamb, 2000; Grefte *et al.*, 2007; Kernell, 2006; Amador *et al.*, 2013).

Com a abertura dos RyR1, ocorre a saída do Ca^{2+} do interior do RS para que eles se liguem de forma reversível às moléculas de troponina C dos miofilamentos de actina. A ligação dos íons Ca^{2+} às moléculas de troponina C induz uma mudança conformacional na tropomiosina, necessária para a liberação dos sítios ativos da actina o que permite a interação entre os filamentos finos (actina) e espessos (miosina). Essa interação entre os filamentos de actina e miosina recebe o nome de pontes cruzadas. As pontes cruzadas de miosina sofrem uma mudança em sua conformação, de forma que os filamentos de actina ligados são tracionados para o centro do sarcômero. Seguindo esse movimento, actina e miosina finalizam a interação por um processo que requer a hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP), etapa essa mediada por uma enzima localizada na porção globular da miosina, a ATPase. Contudo, a contração só cessa quando os estoques intracelulares de Ca^{2+} forem insuficientes para permitirem sua ligação com a troponina C. Isso de fato ocorre com o fim do potencial de ação gerado na célula muscular em que a concentração do cálcio sarcoplasmático diminui pelo transporte ativo dos íons cálcio do sarcoplasma para RS, processo esse promovido por uma bomba RS- Ca^{2+} . Consequente à diminuição dos íons Ca^{2+} e não ligação desses íons às moléculas de troponina C, a tropomiosina retorna à sua conformação original, escondendo novamente os sítios ativos de ligação da miosina e finalmente interrompendo a contração muscular (**Figura 6**) (Lamb, 2000; Grefte *et al.*, 2007; Kernell, 2006; Amador *et al.*, 2013).

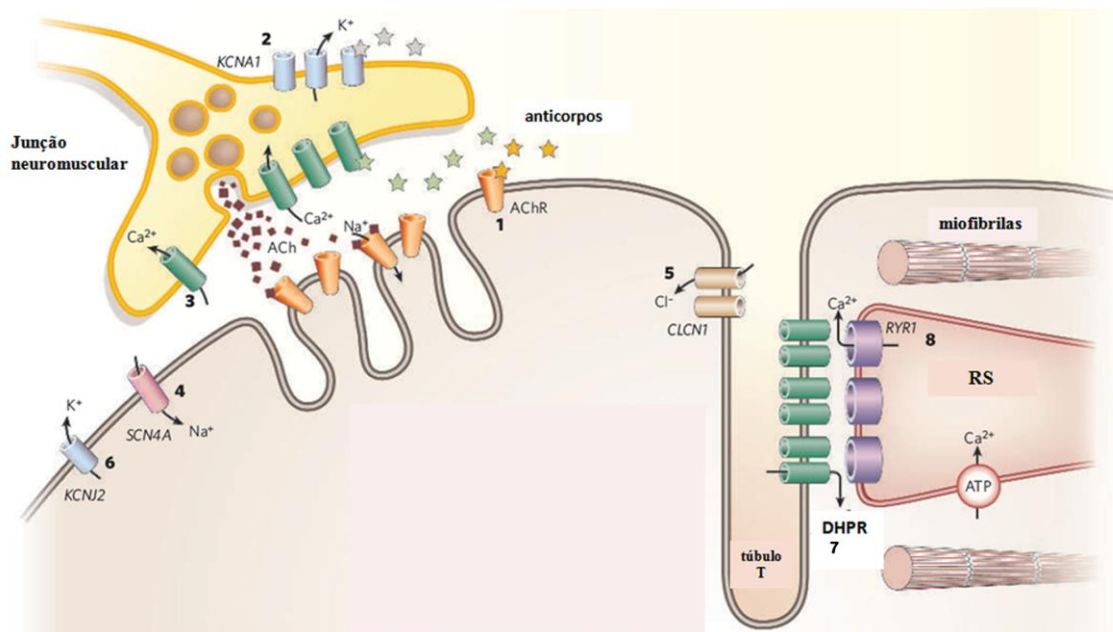


Figura 6: Processo de contração do músculo esquelético. O potencial de ação na membrana da célula muscular é desencadeado pela ligação da ACh (quadrados vermelhos) nos nAChR (canais laranjas) nas cristas das dobras juncionais da membrana pós sináptica da JNM. Propagando-se pela membrana da fibra muscular, o potencial de ação desencadeia a abertura dos canais sensíveis a voltagem nos túbulos T - DHPR (canais verdes) que por sua vez estimula a abertura dos receptores de rianodina-RyR1 (canais roxos) por onde saem os íons Ca^{2+} do RS para o meio intracelular. Os íons cálcio se ligam a toponina C e favorecem a ligação da actina com a cabeça da miosina. Cessado o potencial de ação, os íons Ca^{2+} retornam para o RS por uma bomba que usa ATP para seu funcionamento. É possível observar que em alguns casos, podem ocorrer alterações genéticas em vários canais transportadores apontados pelos números de 1 a 8, os quais geram as denominadas miastenias congênitas. Uma das mais estudadas é a *miastenia gravis*, que ocorre com a produção de auto-anticorpos (estrelas amarelas) contra os nAChR. (Adaptado a partir de Ashcroft, 2006).

1.3. Disfunções colinérgicas nas JNMs e músculos estriados esqueléticos

O neurotransmissor ACh é liberado na fenda sináptica das JNMs em quantidade maior que a necessária para iniciar um potencial de ação. Contudo, apesar da existência dessa margem de segurança, podem ocorrer disfunções nas JNMs em uma variedade de desordens neuromusculares (Mcconville *et al.*, 2002). Essas disfunções, por sua vez, podem ser geradas por fatores que afetam o número de moléculas de ACh por vesícula sináptica, que afetam os mecanismos de liberação e a eficácia do quanta, variações no número e localização de receptores nicotínicos na membrana pós-sináptica, na distribuição e quantidade da enzima AChE, na estrutura da JNM, no tamanho do pool

de vesículas e na probabilidade de liberação de vesículas contendo neurotransmissor (Wood and Slater, 2001).

Uma das enfermidades mais comuns que afetam a JNM é a *Miastenia Gravis*. A doença é caracterizada por ser de origem autoimune e direcionada na maioria dos casos, contra os receptores nicotínicos na JNM ou contra a proteína quinase músculo específica (Musk) numa pequena parcela dos pacientes que possuem a doença (Hoch *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2005; Ashcroft, 2006). Os principais sintomas são fraqueza muscular e fadiga e o tratamento ainda é sintomático, sendo um dos fármacos utilizados a piridostigmina, um inibidor da AChE (Richman and Agius, 2003) (**Figura 6**). Outro exemplo de doença nas JNMs seriam as chamadas Síndromes Miastênicas Congênitas. Elas estão relacionadas com mutações que afetam as proteínas cruciais nos componentes das JNMs, ou seja, alterações em proteínas pré e pós-sinápticas (Engel *et al.*, 2003) (**Figura 6**).

Pesquisadores do nosso grupo de pesquisa geraram uma linhagem de camundongos com déficit na liberação de ACh, através da redução da expressão do gene VACHT e concomitante redução da expressão da proteína transportadora vesicular de ACh. O estabelecimento de um modelo com redução da liberação de ACh é uma abordagem interessante para o entendimento dessas doenças supracitadas, uma vez que, em última instância a consequência de disfunções em miastenias congênitas pré-sinápticas são alterações na dinâmica de liberação desse neurotransmissor. Além do mais, como o tratamento dessas doenças ainda é apenas sintomático, não ocorrendo resolução dos processos causais, um entendimento detalhado de tais mecanismos fornece dados para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes (Richman and Agius, 2003; Prado *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2013).

Os camundongos *knockdown* para a proteína VACHT (VACHT KD^{HOM}) apresentam uma diminuição de aproximadamente 70% na expressão VACHT, possuem déficits cognitivos e são miastênicos (Prado *et al.*, 2006). Além disso, os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam outras alterações nas JNM como redução do tamanho e conteúdo quântico, redução da frequência potenciais de placa motora em miniatura (MEPP) e déficit na força muscular. O déficit na força muscular foi revertido após tratamento com o fármaco piridostigmina, inibidor da enzima AChE, que não atravessa a barreira hematoencefálica, indicando que essa deficiência é devida principalmente a alteração periférica e não central (Prado *et al.*, 2006).

Uma vez que os camundongos VAcHt KD^{HOM} apresentaram alterações neuromusculares periféricas, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado em caracterizar as possíveis alterações em JNMs e músculos estriados esqueléticos nesses animais na idade de 3 meses, ou seja, em animais adultos. Foram encontrados, até o momento, que os animais VAcHt KD^{HOM} apresentaram alterações na forma e na distribuição de VSs nas terminações nervosas das JNMs do músculo diafragma (Rodrigues *et al.*, 2013). No entanto, não se sabe o efeito de uma redução colinérgica a longo prazo nas estruturas das JNMs e músculos estriados esqueléticos.

Nós hipotetizamos que camundongos com redução a longo prazo na expressão de VAcHt, ou seja, camundongos VAcHt KD^{HOM} que possuem déficit colinérgico desde o nascimento até completarem a meia idade (12 meses) e a senescência (24 meses) (Balice Gordon, 1997; Valdez *et al.*, 2010) podem apresentar alterações na morfologia e na função das JNMs e dos músculos da pata posterior dos camundongos, SOL (de contração lenta) e EDL (de contração rápida), bem como uma piora mais acentuada da função neuromuscular que os animais WT.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar morfológica e funcionalmente as junções neuromusculares (JNMs) do músculo diafragma e um músculo de contração rápida (EDL) e outro de contração lenta (SOL) de camundongos que possuem déficit colinérgico a longo prazo (VAcHT KD^{HOM} de 12 e 24 meses de idade) e compará-los aos camundongos selvagens (WT).

2.2. Objetivos Específicos

1. Realizar análise da função respiratória nos camundongos VAcHT KD^{HOM} e WT (12 meses).
2. Realizar, nos planos confocal e ultraestrutural, análise qualitativa e/ou quantitativa das possíveis alterações morfológicas dos elementos pré e pós-sinápticos de JNMs do músculo diafragma em camundongos VAcHT KD^{HOM} e WT (12 meses).
3. Comparar a atividade sináptica, pela quantificação da endo/exocitose, em músculo diafragma de camundongos VAcHT KD^{HOM} e WT (12 e 24 meses).
4. Avaliar os potenciais em miniatura de placa motora (MEPPs) em músculo diafragma camundongos VAcHT KD^{HOM} e WT (12 meses).
5. Realizar análise da função neuromuscular através de testes de comportamento que avaliam força, deslocamento, equilíbrio dos camundongos VAcHT KD^{HOM} e WT (12 e 24 meses).
6. Realizar, no plano histológico e ultraestrutural, análise qualitativa e/ou quantitativa das possíveis alterações morfológicas das fibras musculares de contração rápida e lenta dos em camundongos VAcHT KD^{HOM} e WT (12 e 24 meses).
7. Avaliar o padrão de expressão da cadeia pesada de miosina (MyHC) em músculos de contração rápida (extensor longo dos dedos - EDL) e lenta (soleus - SOL) em camundongos VAcHT KD^{HOM} e WT (12 meses).
8. Avaliar o efeito do fármaco inibidor da acetilcolinesterase (piridostigmina) nos testes comportamentais para avaliação da função neuromotora e nas análises histológicas das fibras musculares de contração rápida e lenta de animais VAcHT KD^{HOM} e WT com idade de 6 meses.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais VACHT

Neste estudo foram utilizadas linhagens de camundongos C57BL/6J selvagens (WT) e com alteração na expressão da proteína VACHT (*knockdown* homozigotos) nas idades de 6 meses (adultos), 12 meses (meia idade) e 24 meses (idosos) (Balice, 1997; Valdez *et al.*, 2010). A linhagem transgênica foi gerada pela equipe do professor Marco Antônio Prado, utilizando técnicas de recombinação homóloga baseadas no sistema Cre-LoxP. Nessa técnica os animais com loco gênico recombinado possuem um cassete de 3.8Kb com os genes para resistência ao antibiótico neomicina (neo) e para a enzima timidina cinase (tk) inserido na região 5' não traduzida do gene do VACHT desencadeando uma disfunção colinérgica com uma redução de ~ 70 % na expressão VACHT (**Figura 7**) (Prado *et al.*, 2006).

As linhagens foram mantidas no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG sob a responsabilidade da Profa. Silvia Guatimosim Fonseca e do discente Diogo Guimarães, colaboradores deste projeto. Os animais foram mantidos em grupos de 3 a 5 por gaiola em temperatura ambiente controlada com ciclo claro/escuro de 12:12 e comida e água fornecidos *ad libitum*.

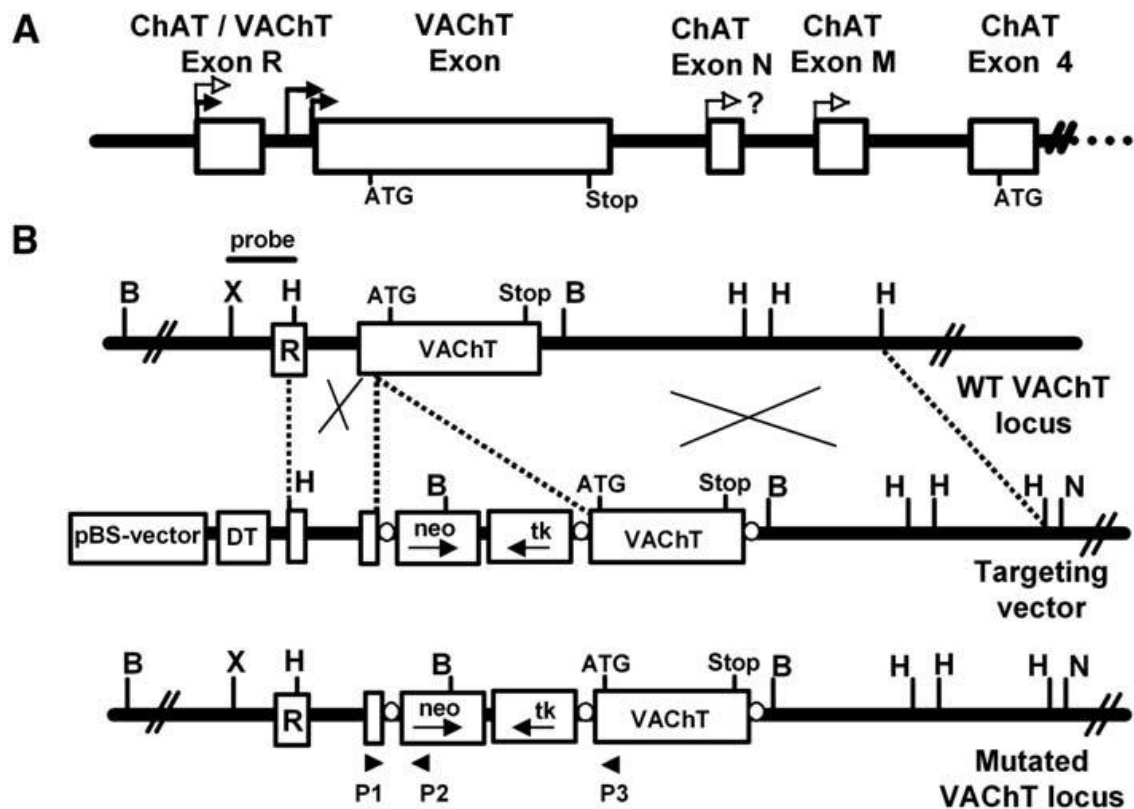


Figura 7: Esquema representativo da estratégia utilizada na geração de camundongos mutantes para o transportador vesicular de Acetilcolina (VACHT). A) Organização gênica do VACHT com a janela aberta de leitura do transportador “downstream” ao exon R da ChAT. B) Representação esquemática do loco do VACHT nos animais selvagens (WT), o vetor construído para a recombinação homóloga e o loco do VACHT após recombinação. A região 5’ não traduzida do VACHT foi interrompida por uma sequencia de 3.8Kb. Este cassete contém o gene da enzima timidina cinase (tk) e o gene de resistência ao antibiótico neomicina (neo). Modificado de Prado *et al.*, 2006.

3.2. Comitê de Ética

Os experimentos foram conduzidos de acordo com protocolo aprovado pelo comitê de ética animal (CETEA-UFMG – protocolo 40/2009) e seguido o guia NIH para o Cuidado e Uso de Animais em Pesquisa e Ensino.

3.3. Testes de função pulmonar

A função pulmonar nos animais WT e VACHT KD^{HOM} foi realizada por meio de duas técnicas, uma não invasiva, a pletismografia de corpo inteiro e outra invasiva, com o animal anestesiado e acoplado a um ventilador mecânico.

3.3.1. Medida da função pulmonar *in vivo* - técnica não invasiva.

A função pulmonar dos animais WT e VACHT KD^{HOM} de 12 meses foi realizada por meio de um sistema de pletismografia de corpo inteiro específico para camundongos (Buxco, Winchester, UK) que permitiu a respiração espontânea para a coleta dos valores de fluxo. Esse aparelho consiste de uma câmara contendo dois orifícios que conectam o interior da câmara com o meio externo para permitir o equilíbrio entre as pressões. O sistema também conta com uma saída de ar, ligada a uma bomba de sucção (fluxo de 1 L/min) para realizar a troca do ar no interior da câmara e evitar a hipóxia/hipercapnia do animal.

Ligado ao pletismógrafo havia um transdutor de pressão calibrado com injeção de 1 mL de ar na câmara, para realizar a medição dos volumes e fluxos deslocados no interior da câmara pela respiração do animal. Foram utilizados os seguintes parâmetros de aceitação: fluxo inspiratório mínimo de 0.1 mL.s⁻¹, frequência respiratória de 40-400 (respirações por minuto) RPM, filtro de 20 ms, tempo de relaxamento de 36% do volume corrente, volume corrente típico de 0.1 mL. Os parâmetros de rejeição foram: tempo expiratório máximo 2.0s, mínimo volume corrente 0.04 mL, mínimo tempo inspiratório 0.04s.

Foram calculados os tempos de expiração (TE), de inspiração (TI) e relaxamento (TR - definido como o tempo de queda de até 36% do volume total expirado), os picos de fluxos expiratórios (PFE) e inspiratórios (PFI). Os valores de Pehn (do inglês “enhanced pause”) foram calculados a partir dos picos de pressões, utilizando-se a fórmula:

$$\text{Pehn} = [(\text{TE}/0,3\text{TR}) - 1] \times (2\text{PEF}/3\text{PIF})$$

O Pehn é considerado um parâmetro empírico que reflete alterações no formato da onda medida no sinal gerado pela câmara de pressão tanto da inspiração quanto da expiração e combina isso com o tempo de comparação da expiração recente e tardia

(Pausa). Não é uma função da amplitude pressórica absoluta da câmara ou frequência respiratória, mas sim a união da razão do sinal pressórico gerado pela inspiração e expiração e o tempo da expiração. Com esse sistema, as mudanças na pressão da câmara durante o ciclo respiratório do camundongo (inspiração e expiração) são medidas como um indicador de obstrução do fluxo de ar, denominado como índice de broncoconstrição (Arantes Costa *et al.*, 2008; Hamelmann *et al.* 1997).

As medidas basais foram adquiridas durante quatro minutos, após a ambientação dos animais. Os valores de Penh foram obtidos durante cinco minutos e medidos. Esses valores foram calculados como média de 25 ciclos respiratórios.

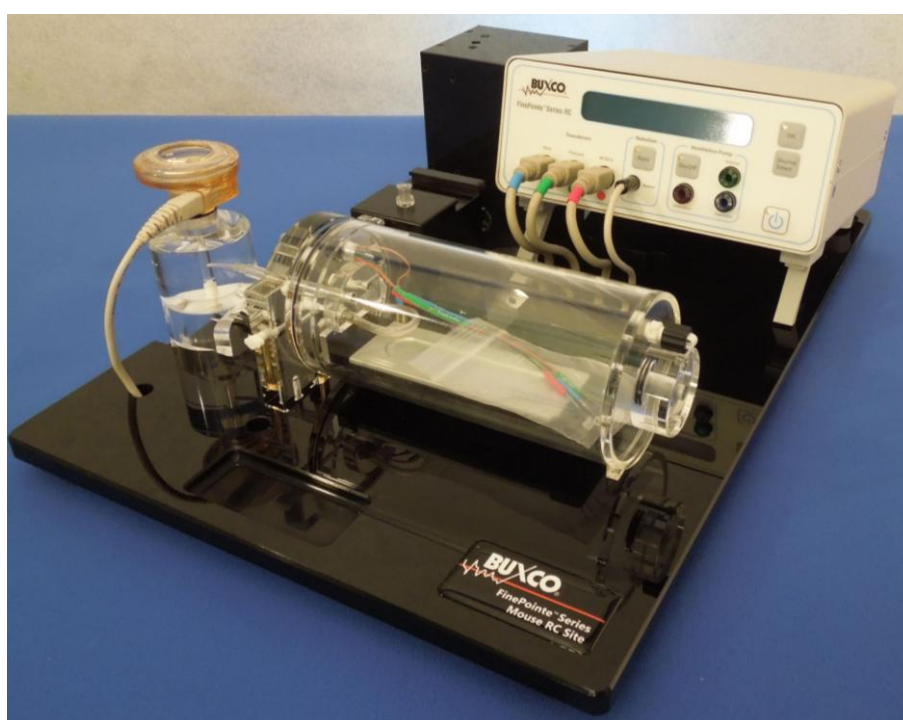


Figura 8. Pletismografia de corpo inteiro para avaliação da função pulmonar. Aparelho Buxco, utilizado para avaliação do índice de broncoconstrição- Penh, em camundongos.

3.3.2. Medida da mecânica pulmonar em animais anestesiados – técnica invasiva

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com tiopental sódico (70 mg.kg) e em seguida traqueostomizados com uma cânula de aço calibre 40 x 12mm (BD Plastipak) a qual também estava conectada a um respirador mecânico para pequenos animais (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Canadá) com volume corrente de 10ml/kg e frequência respiratória de 150 ipm (incursões por minuto) (**Figura 9**).

Prontamente após a conexão dos animais traqueostomizados ao ventilador, foi

calculada a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) dos animais de cada grupo utilizado um volume de perturbação de 16 segundos. A coleta dos dados foram medidas após 2 minutos após a administração de 0,02 mL de pancurônio intramuscular, descartando a possibilidade de haver interferência do animal.

Para o cálculo da elastância (E_{rs}) e da resistência total do sistema respiratório (R_{rs}) foi utilizada a equação do movimento do sistema respiratório:

$P_{tr}(t) = E_{rs} \cdot V(t) + R_{rs} \cdot V'(t)$, onde: P_{tr} é a pressão traqueal, V é o volume, V' é o fluxo e t corresponde ao tempo.

Para o cálculo dos dados de oscilação forçada foram feitas correções, considerando as perdas devido à compressibilidade dos gases (Bates *et al.*, 1992). V_{cyl} foi corrigido a fim de obter o volume que efetivamente chegou ao animal (V) e P_{cyl} foi corrigido, nos dando o valor de P_{ao} , pressão de abertura das vias aéreas. Através da derivação no tempo de V , obteremos o fluxo (V'). Para análise das impedâncias obtidas, foi utilizado o modelo de fase constante, descrito por Hantos (Hantos *et al.*, 1992)

$$Z(f) = R_{aw} + i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + \frac{G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

Onde R_{aw} é a resistência de vias aéreas, I_{aw} é a inertância, G caracteriza a dissipação de energia nos tecidos pulmonares, H caracteriza a energia acumulada no tecido pulmonar, i é a unidade imaginária, f é a frequência e $\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan\left(\frac{H}{G}\right)$.

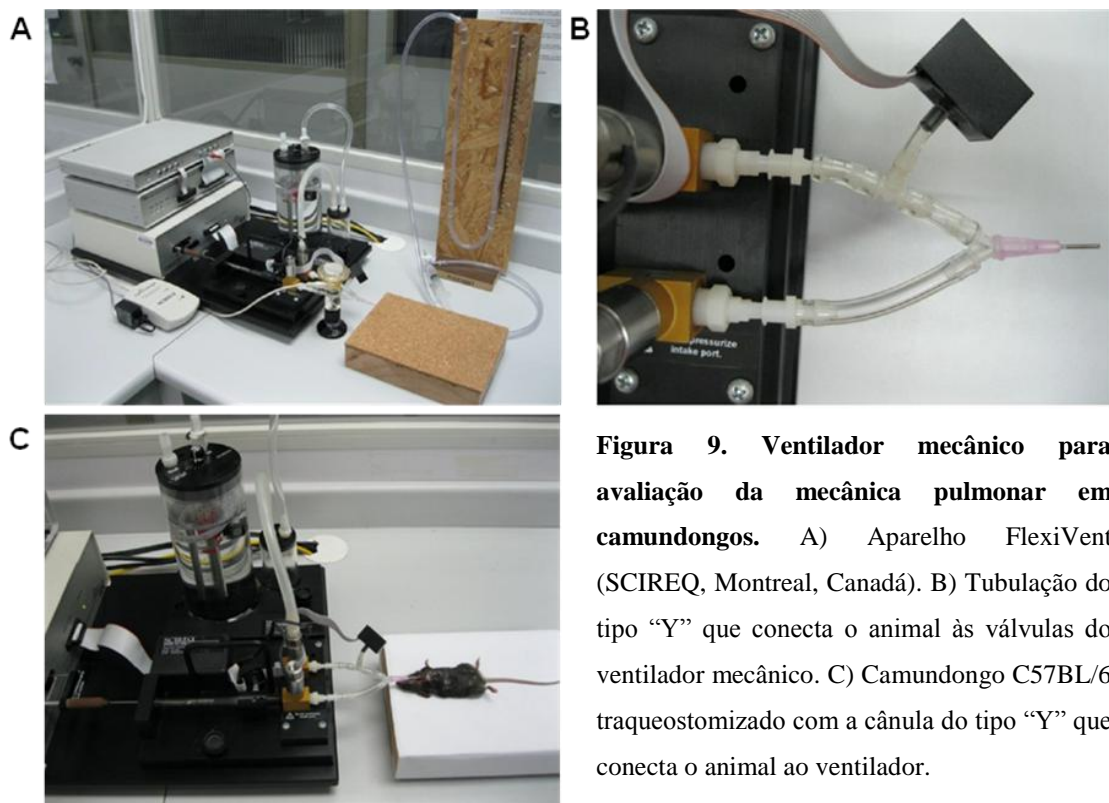


Figura 9. Ventilador mecânico para avaliação da mecânica pulmonar em camundongos. A) Aparelho FlexiVent (SCIREQ, Montreal, Canadá). B) Tubulação do tipo “Y” que conecta o animal às válvulas do ventilador mecânico. C) Camundongo C57BL/6 traqueostomizado com a cânula do tipo “Y” que conecta o animal ao ventilador.

3.4. Testes Comportamentais – Avaliação da Função Neuromuscular Geral

3.4.1. Teste para Atividade Locomotora - Campo Aberto (*Open Field*)

A atividade locomotora espontânea foi analisada por meio do teste de campo aberto – *open field* (Sousa *et al.*, 2006; Ferreira-Vieira, 2014). O teste foi realizado num campo aberto com dimensões de 50 x 50 cm, delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura cada e o piso do ambiente dividido em 16 quadrantes iguais. O animal foi individualmente colocado no quadrado do canto posterior esquerdo do campo aberto e a partir deste ponto foi permitida a livre exploração do ambiente por um período de 5 minutos (300s). Após esse período, os animais foram retirados do teste e recolocados em suas gaiolas. Ao final do teste obtivemos as medidas da atividade locomotora espontânea através da contagem do número de quadrantes percorridos pelo animal durante o teste pelo o período de 300 segundos que corresponde aos deslocamentos horizontais (*crossing*), que é quando os animais exploram o campo aberto cruzando os quadrantes em qualquer sentido de deslocamento (Vianna *et al.*, 2000).

3.4.2. Teste para Força de Agarre (*Wire-hang*)

O teste da força de agarre – *wire-hang* é uma medida de avaliação da força muscular em roedores e os experimentos foram conduzidos segundo protocolo descrito por Sango *et al.* (1996) e Lazaroni *et al.* (2002). Os animais foram habituados à sala de experimentação e manipulados pelo experimentador pelos menos duas horas antes do experimento. O aparato utilizado consistia em uma grade metálica com espaçamento de 1 cm entre as barras de 0,8 mm de diâmetro. O teste foi conduzido em única sessão, na qual o animal foi individualmente colocado sobre a grade até realizar o movimento de preensão. A grade foi então invertida e mantida a 20 cm acima de um acolchoado de espuma. Esta altura é suficiente para que o animal se mantenha preso à grade, no entanto é incapaz de feri-lo no caso de uma queda. Foi mensurada a latência, ou tempo até que o animal se desprendesse e caísse da grade invertida durante 60s de observação.

3.4.3. Teste para Coordenação Motora – (*Rotarod*)

A coordenação motora dos animais foi avaliada por meio do aparelho *Rotarod*. O aparato consiste em uma barra rotacional que gira com velocidade a ser estipulada pelo experimentador sendo dividida em quatro compartimentos possibilitando com isso, a avaliação de até quatro animais por teste. No teste foi mensurado o tempo em que o animal se manteve na barra rotacional até a queda.

O teste foi realizado em três etapas constituídas de habituação, treino e teste segundo protocolo adaptado de Prado *et al.*, 2006. As etapas foram realizadas em dois dias consecutivos. A habituação foi realizada no primeiro dia e foi permitido ao animal manter-se ao aparelho desligado até atingir 5 min. (300s). O animal foi recolocado ao aparelho após cada queda.

A etapa de treino ocorreu 4 horas após a habituação no qual foi permitido ao animal 3 tentativas para se manter na barra rotacional por um período de 5 min. (300s). A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino e foi permitido ao animal 3 tentativas de se manter na barra rotacional durante 5 min. (300s) de observação. Neste caso, a latência para a queda foi registrada e a medida da latência total foi obtida pelo valor da média dos 3 registros. A velocidade da barra rotacional foi mantida a 7rpm durante as sessões de treino e teste.

Em todos os experimentos de avaliação comportamental, foram utilizados camundongos nas idades de 12 e 24 meses. Outro grupo de animais, de 6 meses de

idade, foram tratados com o fármaco inibidor da colinesterase, piridostigmina (i.p., 1 mg/kg) por um período de 28 dias com duas doses por dia. Passados dois dias após o término do tratamento, eles foram submetidos novamente à avaliação através dos testes comportamentais de acordo com a metodologia citada acima. O período de 2 dias do término é suficiente para que o fármaco seja eliminado do organismo do animal e permite avaliar o efeito em médio prazo e não agudo, do tratamento farmacológico sobre função motora.

3.5. Preparação do músculo diafragma e nervo associado (nervo frênico)

O músculo diafragma associado ao fragmento de nervo frênico foi dissecado dos camundongos WT e VAcHT KD^{HOM}, seccionado em dois hemidiafragmas e os conjuntos músculo-nervo resultantes foram montados em placas contendo o fundo coberto por gel de silicone Sylgard®, fixados com alfinetes entomológicos e banhados em solução Ringer contendo 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4, e aerada com uma mistura de 5% CO₂/ 95% O₂. Para a microscopia eletrônica de transmissão, o músculo diafragma foi fixado em Karnovsky, solução fixativa (paraformaldeído-4.0% e glutaraldeído-2.5% em tampão cacodilato de sódio-0.1 M).

3.6. Monitoramento da exocitose e endocitose com FM1-43 e FM1-43fx

O músculo diafragma associado ao fragmento de nervo frênico foi dissecado dos camundongos WT e VAcHT KD^{HOM} e montados em placas contendo o fundo coberto por gel de silicone Sylgard® em solução Ringer. Para marcar o pool de reciclagem de vesículas foi usada a sonda fluorescente FM1-43 (4µM) (Betz *et al.*, 1992) ou seu análogo, FM1-43 para tecidos fixados (FM1-43fx).

Os marcadores FM foram usados nesses experimentos devido às características estruturais fundamentais da sua molécula. A cauda da molécula é lipofílica e faz com que o marcador ligue-se a lipídios e outros domínios hidrofóbicos, a sua região central contém dois anéis aromáticos que criam o fluoróforo sendo o número de ligações duplas contidas entre os dois anéis que determina o espectro de fluorescência do marcador, a cabeça é positivamente carregada e dessa forma, evita que o marcador atravesse completamente a membrana. Esses marcadores são 300 vezes mais fluorescentes quando ligados à bicamada lipídica se compararmos quando ele se encontra em solução

e é essa característica que nos permite visualizar endocitose (ganho de fluorescência) e exocitose (perda de fluorescência) em preparações extra-vivo (Gaffield and Betz, 2006).

De acordo com as propriedades dessa sonda, os experimentos normalmente são conduzidos da seguinte maneira: a preparação neuromuscular é colocada em solução contendo o marcador e após aplica-se estímulo que evoca a exocitose das vesículas sinápticas. Com isso, as vesículas liberam seu conteúdo no meio extracelular favorecendo a exposição da face luminal da membrana para o meio durante a exocitose. O corante então, se liga ao folheto interno da membrana das vesículas e é internalizado durante endocitose compensatória. Em seguida, o meio externo é lavado, favorecendo a retirada do excesso de marcador que não foi endocitado e permaneceu ligado externamente à membrana da terminação nervosa. Posteriormente, a preparação é examinada por microscopia de fluorescência permitindo a visualização das estruturas endocitadas marcadas sob a forma de aglomerados vesiculares (Gaffield and Betz, 2006).

Com isso, em nosso estudo, dois tipos de experimentos foram realizados com a sonda FM1-43. Em um tipo de experimento, o terminal nervoso foi marcado com o FM1-43 para tecidos não fixados, o qual oferece uma avaliação da exocitose das vesículas sinápticas. No outro experimento, foi usado o FM1-43fx, usado em tecidos fixados, para avaliar a morfologia da JNMs dependente da atividade da terminação e endocitose.

No primeiro caso, para a avaliação da exocitose, os músculos foram incubados com D-tubocurarine (16 μ M) para evitar contrações durante o protocolo de estimulação. As preparações foram estimuladas por 10 min. com solução de Ringer modificada a qual continha alta concentração de KCl (80 mM NaCl, 60 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glicose) na presença de FM1-43 (4 μ M). Após, a preparação foi mantida em solução Ringer por 10 min. para garantir a captação máxima do FM1-43. O excesso do marcador aderido à membrana muscular foi removido por uma solução de lavagem contendo solução de Ringer durante 20 min. Após a marcação das vesículas sinápticas, a preparação foi exposta durante 7 min. em solução de Ringer modificada contendo alta concentração de KCl para avaliar seu efeito na exocitose evocada por estímulo. A desmarcação na ausência de estímulo devido ao photobleaching do FM1-43 (cerca de 10% de diminuição na fluorescência) foi usada como controle. As imagens foram adquiridas durante o tempo de 7 min. com intervalos

de 2 min. entre cada uma. Todas as imagens foram adquiridas usando um microscópio de fluorescência (Leica DM2500) acoplado a uma câmera CCD (Micromax) e visualizada em um computador e equipado com uma objetiva de imersão em água (63X, 0.95NA). A luz de excitação veio de uma lâmpada de 100W Hg, passou através de filtros para selecionar o espectro de fluoresceína para os experimentos de FM1-43. Todas as variáveis de imagem como o tempo de exposição e *binning* foram mantidos os mesmos para os pares de hemidiafragmas.

Nos experimentos para avaliar a morfologia da JNM dependente da atividade do terminal nervoso e endocitose, a preparação foi incubada com α -bungarotoxin-Alexa 594 (12 mM) durante 20 minutos para marcar os agrupamentos de receptores nicotínicos para ACh (nAChR) e logo após, foram lavadas. FM1-43fx (8 μ M) foi usado para marcar as vesículas sinápticas durante estímulo com solução Ringer modificada contendo alta concentração de KCl (60 mM KCl) por 10 min.

Após a estimulação a preparação foi mantida em repouso por 10 minutos para garantir a captação máxima de FM1-43fx durante endocitose compensatória. O excesso de FM1-43fx aderido à membrana do terminal sináptico e à membrana da célula muscular foi removido durante um período de lavagem da preparação em Ringer contendo Advasep-7 (1 mM, um composto utilizado para remover background indesejado) e isento de marcador por no mínimo 15 minutos. As preparações foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1 M por 60 minutos. Após a fixação os músculos foram lavados com glicina em tampão fosfato (0.1 M) para redução do sinal fluorescente do fixador. Finalmente, os músculos foram seccionados em dois hemidiafragmas e montados em lâmina de vidro usando o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories).

As imagens de JNMs marcadas com FM1-43fx e α -bungarotoxina foram adquiridas através de um microscópio de confocal de escaneamento a laser (Zeiss META 510), localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG. Utilizamos a objetiva de imersão em óleo de 40x (abertura numérica 1.30). A luz de excitação partia de um laser de argônio (488 nm) e de hélio-neônio (543 nm). O espectro de emissão foi fixado em 510-580 nm para FM1-43fx e 610-680 para α -bungarotoxina. Secções ópticas na modalidade de série Z foram coletadas em intervalos de 2,0 μ m. Durante a aquisição das imagens, os hemidiafragmas foram inteiramente digitalizados e as imagens foram obtidas a partir de áreas do músculo que

apresentaram JNMs marcadas. As análises quantitativas dos elementos pré e pós-sinápticos foram realizadas com o software Image J, onde as áreas da terminação nervosa e dos receptores nicotínicos para ACh foram circulares e contados. Nesses experimentos de exocitose foram usados os animais de 12 e 24 meses e nos de endocitose, os animais de 12 meses.

3.7. Imunofluorescência para detectar os elementos pré e pós-sinápticos das JNMs

O músculo diafragma dos camundongos WT e VACHT KD^{HOM} foram rapidamente dissecados e fixados em 4% PFA/PBS (pH 7.4) por aproximadamente 60 min. Os músculos foram lavados 3 vezes em PBS por 5 minutos cada e bloqueados em solução de bloqueio (3% de albumina de soro bovino, 5% soro de cabra e 0,5 de Triton X-100) por 1 hora a 4°C. Os tecidos foram marcados com anticorpo anti-sinaptofisina (1:500 - rabbit polyclonal; Chemicon - Millipore) e incubados overnight com solução de bloqueio a 4°C. Após 3 lavagens de 5 min. com PBS1x, os músculos foram incubados por 1 hora a 4°C com anticorpo secundário goat anti-rabbit conjugado com Alexa Fluor – 488 (1:1000 - Molecular Probes) e α -bungarotoxina conjugada com Alexa Fluor – 594 (1:500 Molecular Probes) em solução de bloqueio e em seguida lavados 3 vezes de 5 min. com PBS1x. Os diafragmas foram montados em lâminas de vidro com o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories). As análises quantitativas dos elementos pré e pós-sinápticos foram realizadas com o software Image J, onde as áreas da terminação nervosa e dos receptores nicotínicos para ACh foram também circulares e contados. Nesses experimentos foram usados os animais de 12 meses.

3.8. Histologia de Rotina

Os camundongos WT e VACHT KD^{HOM} foram sacrificados e tiveram os músculos SOL e EDL retirados cirurgicamente e fixados em glutaraldeído a 4% por 24 horas. Após, foram desidratados em uma série ascendente de álcool (70%, 80%, 90%, 95% 2X) por 30 minutos cada. Em seguida, os músculos foram imersos em solução 1:1 de álcool 95% e resina glicol metacrilato (Leica HistoResin) por 24 horas a 5°C e após, as amostras foram infiltradas em resina pura (Leica HistoResin). A inclusão foi feita utilizando-se a resina pura adicionando-se a solução polimerizante na proporção: 15mL de resina glicolmetacrilato para 1 mL da solução polimerizante. Os músculos foram orientados em moldes específicos de modo a permitir a secção transversal dos mesmos e

em seguida embebidos na solução de inclusão. Para completa polimerização, os blocos permaneceram por, no mínimo, 24 horas em temperatura ambiente ou em estufa a 42°C. Após inclusão, os blocos contendo os músculos foram montados em suportes para micrótomo e cortados utilizando-se navalhas de vidro (Leica). Com isso, foram obtidos cortes transversais dos músculos com 3 µm de espessura utilizando um micrótomo (Leica Reichert-Jung®) localizado no laboratório de Neurobiologia (Professora Conceição Machado), no Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Os cortes foram distendidos em água destilada, na temperatura ambiente, e logo em seguida transferidos para lâminas de vidro. As lâminas contendo as secções eram colocadas em chapa quente a 70°C por 15 minutos para secagem e adesão e distensão máxima dos cortes. Após essa etapa, os cortes foram corados com solução de Azul de toluidina-O (EMS) em água destilada 1:10 por 15 minutos para determinar a área de secção transversal (CSA) das miofibras individuais. Os cortes foram então imersos 5x em álcool 95% para obtenção da intensidade de coloração desejada. Em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando meio de montagem Entellan Mounting Medium (Merck®). Em cada lâmina foram colocados até 6 cortes, e para análise escolhíamos de 2 a 3 cortes por animal, considerando um mínimo de 3 animais por grupo experimental, gerando um total de no mínimo 6 a 9 cortes por grupo experimental. As imagens foram adquiridas usando um microscópio (Leica DM2500) acoplado a uma câmera CCD (Micromax), visualizados em um computador e analisadas usando o programa Axiovision (Zeiss). A média dos valores para CSA foram calculados de pelo menos 500 fibras individuais por animal (3 animais por grupo). Nesse experimento foram utilizados camundongos WT e VACHT KD^{HOM} nas idades de 12 meses e de 24 meses de idade.

Outro grupo de animais, de 6 meses de idade, foram tratados com o fármaco inibidor da colinesterase, piridostigmina (i.p., 1 mg/kg) por um período de 28 dias com duas doses por dia. Com pelo menos dois dias do término do tratamento, eles foram sacrificados e os músculos SOL e EDL retirados para a análise histológica de acordo com a metodologia citada acima.

3.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise ultraestrutural, nós usamos o protocolo descrito por Rodrigues *et al.* (2013). Resumidamente, o músculo diafragma e SOL dos camundongos WT e VACHT KD^{HOM} foram fixados em solução fixadora de Karnovsky modificada resfriada

e mantidos nessa solução por pelo menos 24 horas a 4°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão cocadilato (0.1 M), cortado em várias peças e pós-fixadas em ósmio reduzido (1% tetróxido de ósmio contendo 1,6% ferrocianeto de potássio), contrastado em acetato de uranila (2% acetato de uranila em água deionizada), desidratada em uma série ascendente de soluções de etanol e embebidas em EPON. Os blocos foram seccionados (50 nm) e coletados em grades de cobre de 200 ou 300 *mesh* e contrastados com citrato de chumbo. A aquisição das fotografias digitais dos cortes ultrafinos foi realizada através do microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta, com voltagem de aceleração de 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG ou do microscópio eletrônico de transmissão EM 10 Zeiss, com voltagem de aceleração de 80 Kv localizado no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do ICB-UFMG. Nesses experimentos foram usados camundongos WT e VChT KD^{HOM} na idade de 12 meses.

3.10. Registros eletrofisiológicos de MEPPs

A técnica current clamp de registro intracelular foi usada para registrar os potenciais de placa em miniatura (MEPPs). Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (22-24°C), onde o músculo diafragma foi fixado com alfinetes entomológicos em uma placa acrílica contendo o fundo coberto por gel de silicone Sylgard®, banhado em solução Ringer normal e aerada com uma mistura de 5% CO₂/95% O₂. Os músculos foram incubados na presença Tetrodotoxina (100 nM), um bloqueador seletivo de canais para sódio voltagem dependentes, presentes na membrana muscular, adicionada à solução de banho para evitar potenciais de ação e contração muscular. O potencial de placa motora, que reflete a liberação de ACh, foi avaliado pela técnica de micropunção, onde são medidas as variações de voltagens intracelulares. Os microeletrodos utilizados foram fabricados com capilares de borosilicato e apresentavam resistências entre 8 e 15 megaohm (MΩ) quando preenchidos com solução de KCl (3M). Os registros foram avaliados pela diferença do eletrodo de referência (denominado zero ou aterramento) em relação ao eletrodo de registro. O sinal era enviado ao amplificador I (Axopatch-200 – Molecular Devices), os registros eram filtrados a 5 KHz (passa-baixa) e amplificados 50x antes de serem digitalizados. Os sinais digitalizados foram registrados pelo programa WinEDR (John Dempster, University of Strathclyde). Nós avaliamos a amplitude e a frequência dos MEPPs na

mesma fibra muscular. A amplitude dos MEPPs foi corrigida por um potencial padrão de repouso da membrana de -80 mV. Foram registrados cerca de 100 MEPPs, em 5 sinapses diferentes em cada músculo, de todos os animais utilizados. O n foi igual ao numero de músculos. Nesse experimento foi utilizado animais de 12 meses de idade.

3.11. Imunofluorescência para determinação das isoformas da cadeia pesada de miosina

As isoformas da cadeia pesada de miosina foram determinadas de acordo com protocolo descrito por Valdez *et al.*, (2012). Com isso, os camundongos foram sacrificados e os músculos SOL e EDL retirados cirurgicamente e orientados em formas contendo meio OCT (Easy Path). Após foram congelados e armazenados a -80°C. A região do ventre muscular foi cortada em um criostato (Leica CM3050S) e as secções transversais (10µm) foram coletadas em lâminas revestidas com gelatina. As lâminas contendo as secções musculares foram bloqueadas por 30 min a temperatura ambiente em solução contendo 3% de BSA, 5% de soro de cabra e 0,1% de Triton X-100 e após, incubado a 4°C, overnight, com os seguintes anticorpos primários: tipo I (NCL-Novocastra, Leica 1:250); tipo IIA (SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB 1:100), tipo IIX (BF-35 DSHB 1:100, o qual reconhece todos os tipos de fibras musculares exceto as IIX) e tipo IIB (BF-F3, DSHB 1:100) todas diluídas em solução de bloqueio contendo 3% de BSA e 5% de soro de cabra. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários: Alexa 488 *goat anti-mouse* IgG1 (reconhece os anticorpos dos tipos I, IIA e IIX) e Alexa 488 *goat anti-mouse* IgM (reconhece os anticorpos do tipo IIB). Novamente as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e montadas usando o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories). As imagens foram adquiridas usando uma objetiva de ar (10x, 0,25NA) acoplada a um microscópio de fluorescência (Leica DM2500) e visualizadas em computador. A luz de excitação veio de uma lâmpada de 100W Hg e um filtro para FITC foi usado para coletar a luz emitida. Nós capturamos de 3 a 4 imagens por secção transversal. Cada tipo de fibra foi apresentada como porcentagem do total do número de fibras contadas. Esses experimentos foram realizados nos camundongos de 12 meses de idade.

3.12. Análise Estatística

A análise das imagens foi realizada utilizando-se o programa Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) ou AxioVision 4.8 (Carl Zeiss). Os dados foram plotados no microsoft Excel e analisados através do programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). A média \pm erro padrão da média (SEM) foram calculados para cada grupo e comparados. A significância estatística foi avaliada utilizando-se o teste *t Student* não pareado ou two-way ANOVA seguido do post hoc Bonferroni quando apropriados. Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. A redução a longo prazo da expressão de VChT não provoca alterações na função pulmonar

Considerando que o diafragma é o principal músculo inspiratório em mamíferos (Mantilla and Sieck, 2008), realizamos o monitoramento de sua função nos camundongos com redução a longo prazo de VChT. Assim sendo, nós avaliamos a função respiratória por meio dos aparelhos Bruxco e Flexivent, os quais fornecem medidas da função e mecânica pulmonar, que podem ser alteradas também devido às alterações na contratilidade do diafragma.

Com relação à análise realizada pela pletismografia de corpo inteiro (Bruxco), onde foi medido o Penh, ou índice de broncocontração, não percebemos diferença significativa quando comparamos os animais VChT KD^{HOM} com os WT (valores descritos como média \pm erro padrão, o *n* e os valores de *p* - Pehn dos VChT KD^{HOM}: 1.03 ± 0.12 n=6; e Penh dos WT: 1.08 ± 0.10 n=8; *p*=0.75; **Figura 10A**).

O Bruxco avalia o animal sem anestesia e respirando naturalmente, ou seja, utilizando normalmente o músculo diafragma. No entanto, recebe diversas críticas na literatura, pois as alterações na função pulmonar vistas através dele poderiam também ser devidas ao acometimento de vias aéreas superiores (Verheijden *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015). Desta forma, para confirmar a resposta obtida no Bruxco realizamos também medidas com o animal anestesiado e traqueostomizado, no ventilador mecânico (Flexivent) o que exclui alterações de vias aéreas superiores, e mede elastância (inverso da complacência) (Ers) e resistência (Rrs) do sistema respiratório, a resistência de vias aéreas sem interferência de tecido pulmonar (Raw) e as medidas de tecido pulmonar, sendo elastância de tecido (H) e resistência de tecido (G). Com isso, na avaliação da mecânica pulmonar pelo Flexivent, verificamos que os animais VChT KD^{HOM} de 12 meses não apresentaram diferenças com relação a todas as variáveis analisadas com relação aos animais WT da mesma idade (valores descritos como média \pm erro padrão, o *n* e os valores de *p*) para: Rrs (VChT KD^{HOM} 0.52 ± 0.02 n=6; WT 0.49 ± 0.09 n=8; *p*=0,72; **Figura 10B**); Ers (VChT KD^{HOM} 27.57 ± 7.01 n=6; WT 23.18 ± 1.99 n=8; *p*=0.56; **Figura 10C**); Raw (VChT KD^{HOM} 0.12 ± 0.01 n=6; WT 0.15 ± 0.01 n=8; *p*=0.22; **Figura 10D**); G (VChT KD^{HOM} 4.26 ± 0.02 n=6; WT 4.71 ± 0.08 n=8;

p=0.75; **Figura 10E**); H (VAcHT KD^{HOM} 21.10 ± 2.20 n=6; WT 24.6 ± 6.57 n=8; p=0.75; **Figura 10F**).

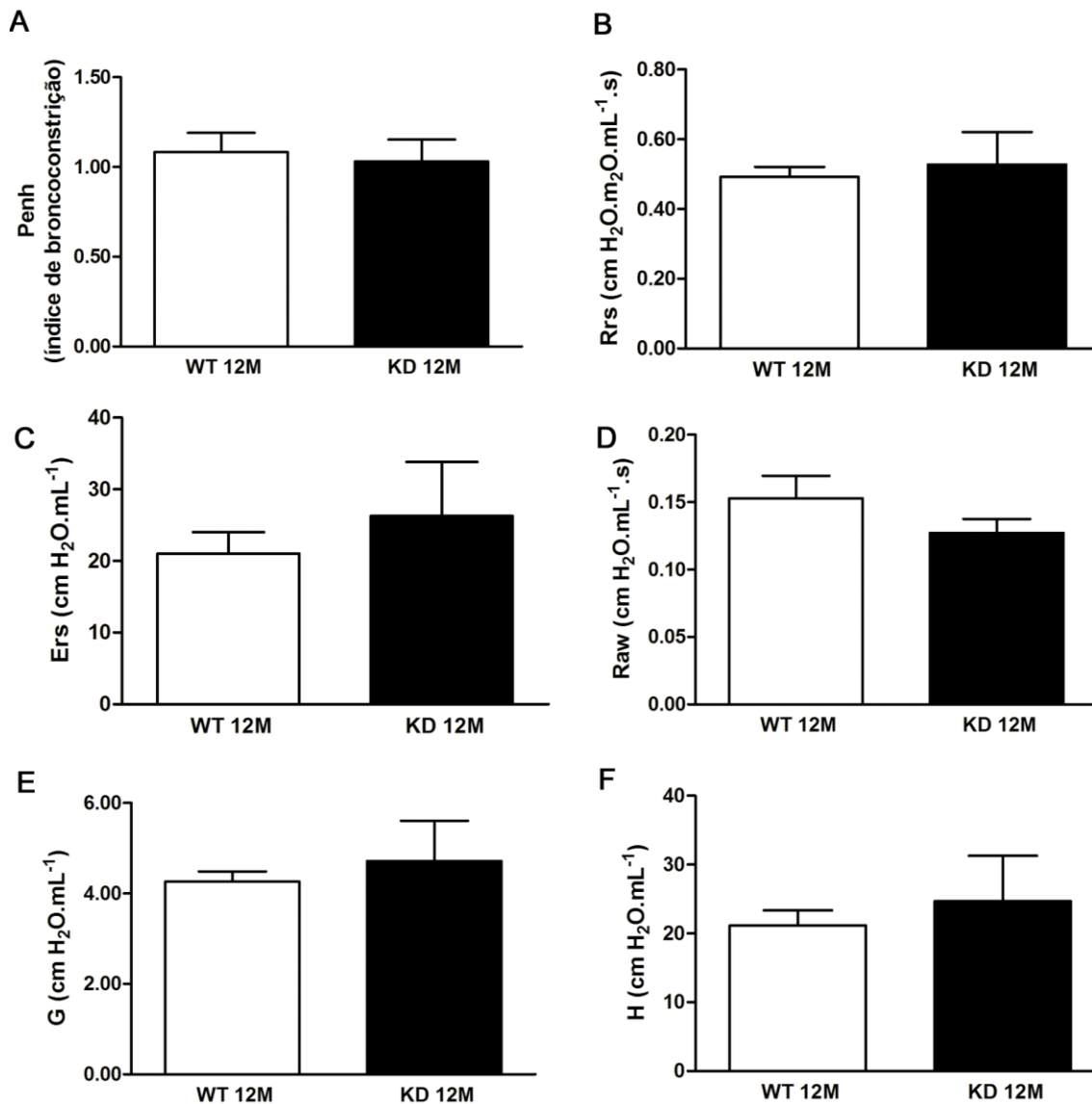


Figura 10. A redução a longo prazo da expressão de VAcHT não acarreta alteração na função e mecânica pulmonar. A) Representação gráfica das medidas de Pehh – índice de broncoconstrição B) Resistência do sistema respiratório - Rrs, C) Elastância do sistema respiratório - Ers, D) Resistência das vias aéreas - Raw, E) Resistência do tecido pulmonar - G e F) Elastância do tecido pulmonar - H. (teste *t Student* não pareado: p>0.05, n= WT, e n=6 VAcHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade).

4.2. A redução a longo prazo da expressão de VAcHT não altera a morfologia das JNMs do músculo diafragma e mantém as alterações encontradas nas VSs já determinadas previamente aos 3 meses de idade no plano ultraestrutural

O sistema colinérgico é essencial para a formação e manutenção das sinapses neuromusculares (Brandon *et al.*, 2003; Misgeld *et al.*, 2002; De Castro *et al.*, 2009). Trabalhos prévios demonstraram que alguns fatores alteram a estrutura da JNM tais como aumento ou diminuição da atividade (Deschenes *et al.*, 1993; Deschenes *et al.*, 2010; Deschenes *et al.*, 2011), envelhecimento (Balice Gordon, 1997; Deschenes *et al.*, 2012; Valdez *et al.*, 2010) e algumas condições patológicas como diabetes, osteoporose e câncer (Lesniewski *et al.*, 2003; Shigemoto *et al.*, 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos da diminuição da liberação de ACh na estrutura e função da JNMs de animais que nasceram com déficit colinérgico e mantiveram esse déficit ao longo de 12 e 24 meses de idade. Com o objetivo de investigar se uma redução na liberação de ACh por um longo período induziria alterações no aparato pré e pós-sináptico, as JNMs do músculo diafragma foram marcadas com anticorpo anti-sinaptofisina e α -bungarotoxina (α -BTX) respectivamente e avaliadas por microscopia de confocal. Após a obtenção das imagens, as estruturas pré e pós-sinápticas foram quantificadas quanto ao número de elementos bem como a densidade dos mesmos. A **Figura 11A** mostra imagens representativas de terminações nervosas do músculo diafragma marcadas com anticorpo anti-sinaptofisina – Alexa 488 (**A1 e A2**) e receptores nicotínicos marcados com α -BTX – Alexa 594 (**A3 e A4**) de animais WT e VAcHT KD^{HOM} de 12 meses de idade (painel superior e inferior respectivamente). As **Figuras 11A5 e A6** mostram a colocalização dos elementos pré e pós-sinápticos dos animais de ambos os genótipos estudados. Foram realizadas análises quantitativas em relação ao número, mensuração das áreas e densidade dos elementos sinápticos. Os dados mostraram que não houve diferença estatística entre os dois grupos em todas as análises realizadas (**Figura 12A, B e C**). A área total analisada foi a mesma para ambos os grupos (**Figura 12D**).

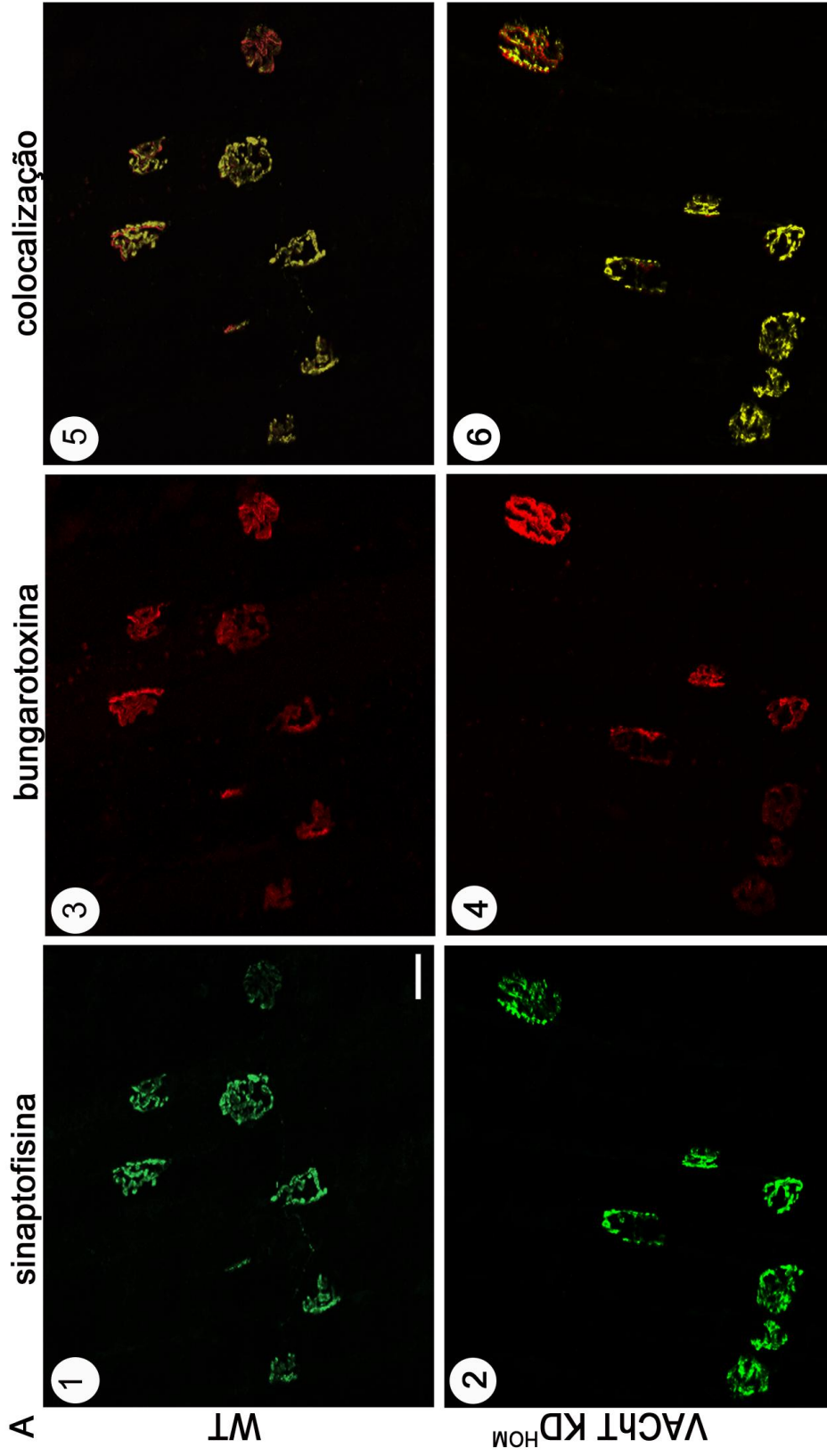


Figura 11. Morfologia das JNMs de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} com 12 meses de idade. A) Imagens representativas de microscopia confocal de JNMs do músculo diafragma de animais WT (A1, 3 e 5) e VACHT KD^{HOM} (A2, 4 e 6): A1 e A2 – terminais pré-sinápticos marcados com anticorpo anti-sinaptofisina – Alexa 488; A3 e A4 – *clusters* pós-sinápticos de nAChR marcados com α -bungarotoxina-Alexa 594; A5 e A6 – colocalização dos elementos sinápticos. Escala de barra = 10 μ m.

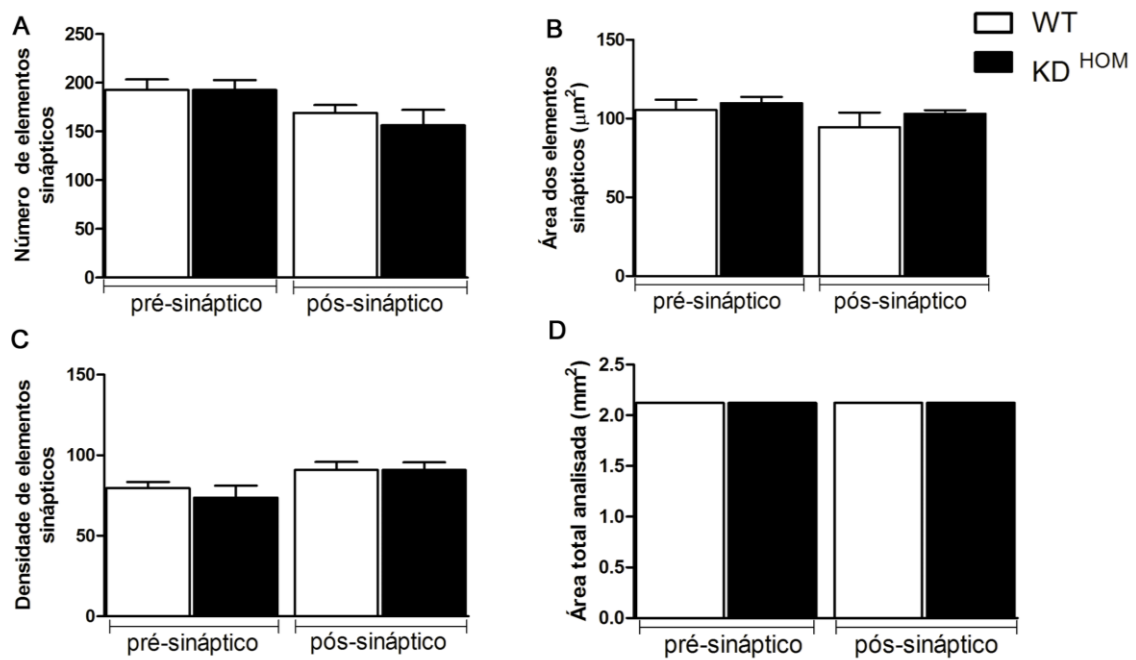


Figura 12. A redução a longo prazo na expressão de VAcHt não ocasiona alterações na morfologia das JNMs - **Quantificação dos elementos sinápticos.** Os camundongos VAcHt KD^{HOM} não apresentaram diferenças no número A), área B) e densidade C) dos elementos pré pós-sináptico quando comparados aos WT. D) Gráfico demonstrando que área total analisada foi a mesma para ambos os genótipos. (teste *t Student* não pareado: $p > 0.05$. Foram analisadas 578 JNM nos animais WT e VAcHt KD^{HOM}, $n=3$ WT, e $n=3$ VAcHt KD^{HOM} aos 12 meses de idade).

Nosso próximo passo foi então analisar as JNMs no plano ultraestrutural, uma vez que poderiam ocorrer alterações nesse plano que seriam imperceptíveis no nível óptico. Observamos que as JNMs do músculo diafragma dos camundongos WT e KD^{HOM} de 12 meses de idade apresentaram morfologia muito similar acerca da área do terminal, comprimento pós-sináptico e número total de VSs (**Figura 13**). Entretanto, consistente com trabalho anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (Rodrigues *et al.*, 2013), nós observamos que as JNMs de camundongos VAcHt KD^{HOM} de 12 meses possuíam diversas vesículas com morfologia irregular, se apresentando achatadas e elípticas quando comparadas as dos animais WT. Contudo, não foram observadas outras alterações adicionais entre os grupos avaliados (**Figura 13**).

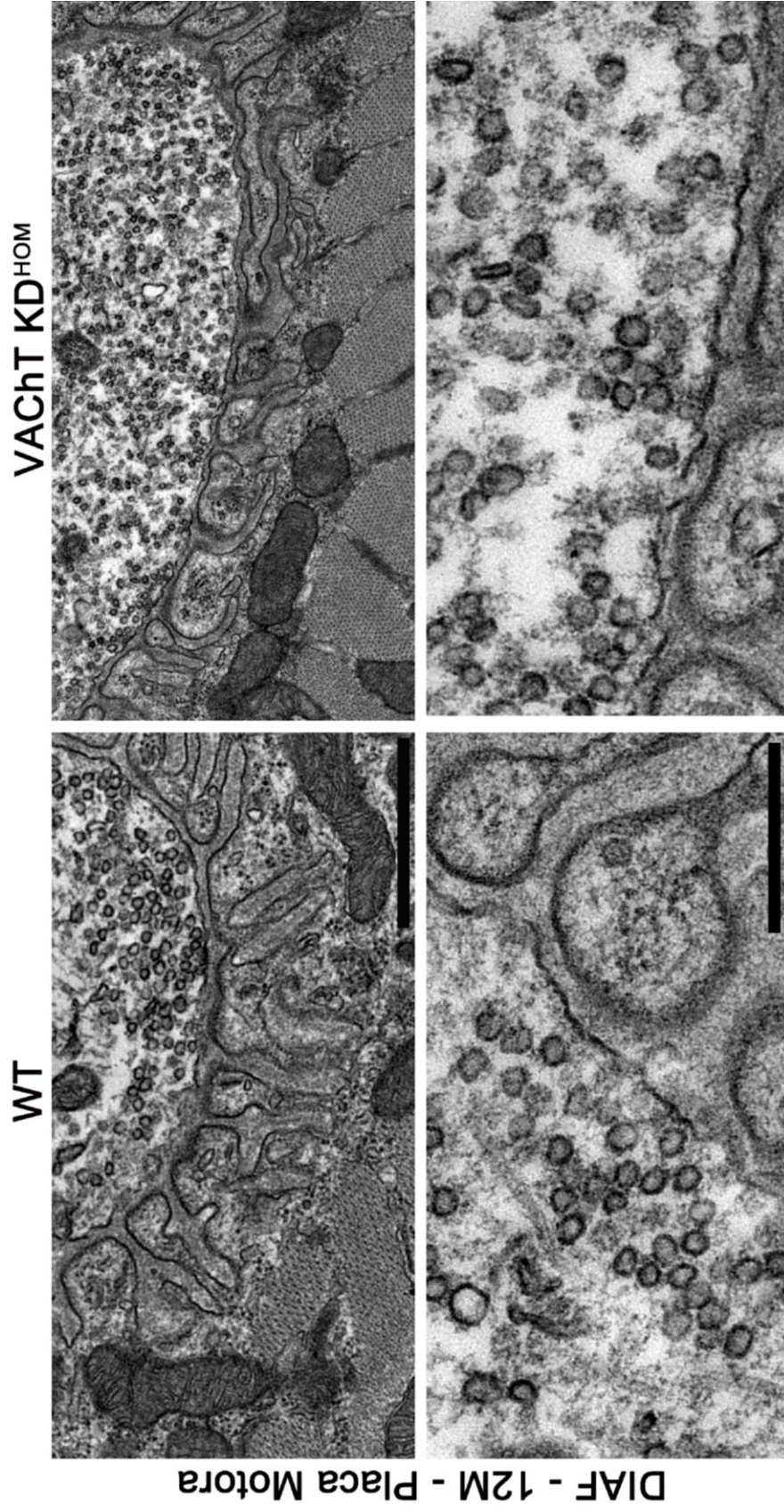


Figura 13. A morfologia das vesículas sinápticas permanece alterada em camundongos com deficiência colinérgica a longo prazo (12 meses). Imagens representativas da ultraestrutura das JNMs do músculo diafragma (DIAF) de camundongos WT (painéis da esquerda) e VACht KD^{HOM} (painéis da direita) aos 12 meses de idade mostrando alterações na forma das VSs nos camundongos VACht KD^{HOM}, as quais são mais achatadas que as do WT. Escala de barra = 1 μ m (painéis superiores), Aumento 50.000 (painéis inferiores).

Uma vez que não foram observadas alterações nas JNM, partimos para uma avaliação do músculo diafragma como um todo. A análise qualitativa não demonstrou existir diferenças entre os genótipos, sendo que ambos apresentaram estruturas sarcoméricas preservadas, assim como túbulos-T e retículo sarcoplasmático (RS). No entanto, ambos demonstraram degenerações mitocondriais relativas ao envelhecimento (**Figura 14**).

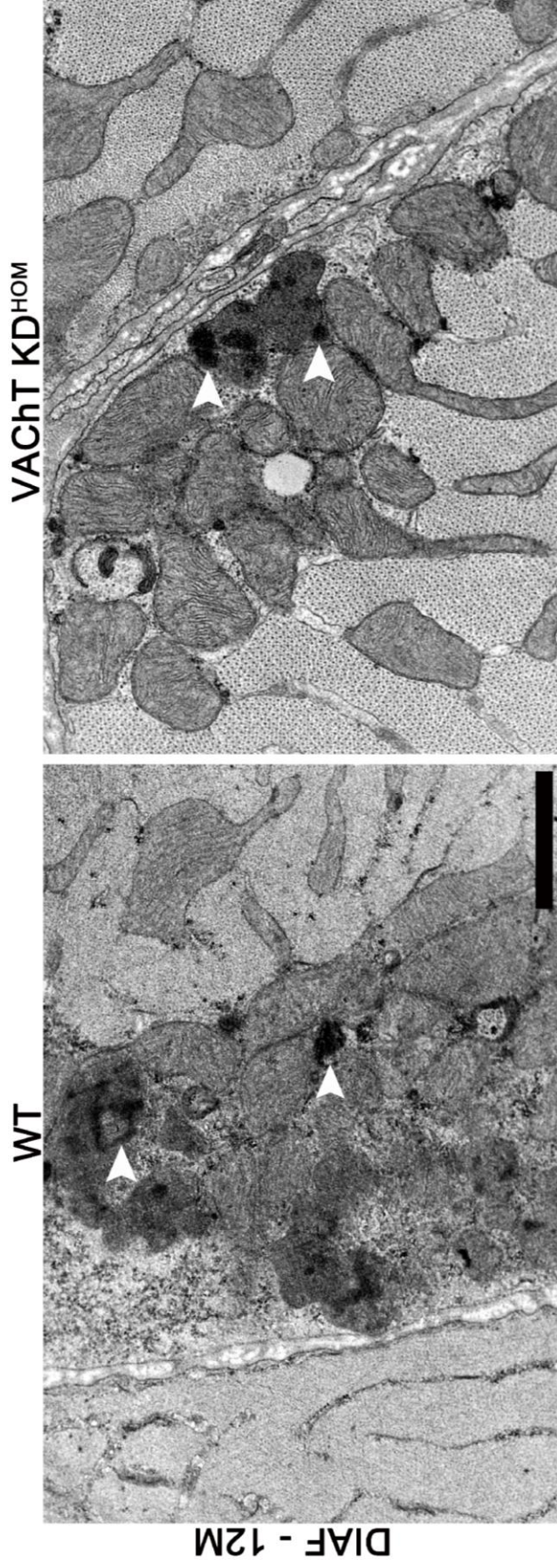


Figura 14. Sinais de degenerações mitocondriais presentes no músculo diafragma de animais WT e VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade. Imagens representativas de elétron micrografias de músculo diafragma (DIAF) de camundongo WT (esquerda) e VACHT KD^{HOM} (direita) aos 12 meses de idade, mostrando degeneração mitocondrial em ambos os genótipos (cabeças de seta) Escala de barra = 1 μ m.

4.3. A redução a longo prazo da expressão de VAcHt altera a atividade sináptica, mas mantém a morfologia das JNMs de maneira dependente da atividade da terminação nervosa no músculo diafragma

Nosso próximo passo foi analisar as possíveis alterações funcionais nas terminações nervosas motoras de camundongos VAcHt KD^{HOM} através de experimentos que investigam a reciclagem de VSs. As **Figuras 15A1 e A2** mostram imagens representativas de terminações nervosas do músculo diafragma marcadas com a sonda FM1-43fx (dependente da atividade do terminal nervoso) de camundongos WT e VAcHt KD^{HOM} de 12 meses de idade, respectivamente. Com relação à intensidade média de fluorescência, nós observamos que o terminal pré-sináptico dos camundongos VAcHt KD^{HOM} demonstraram intensidade do sinal fluorescente similar ao encontrado nos animais WT (WT = 63.0 ± 4.0 A.U.; KD^{HOM} = 63.7 ± 4.6 A.U.; $p \geq 0.05$; teste *t* Student não pareado) (**Figura 16A**). Esses dados sugerem que a endocitose foi similar em ambos os genótipos aos 12 meses de idade. As **Figuras 15A3 e A4** mostram imagens representativas dos aglomerados de nAChR marcados com α -bungarotoxina-Alexa 594, e as **Figuras 15A5 e A6** mostram a colocalização das estruturas pré e pós-sinápticas no músculo diafragma de camundongos WT e VAcHt KD^{HOM} , respectivamente. Nós avaliamos o número total, a área e a densidade dos elementos sinápticos (**Figuras 16B-D**). Entretanto, não encontramos diferenças em nenhuma dessas variáveis entre os camundongos WT e KD^{HOM} aos 12 meses de idade ($p > 0.05$). A área total analisada foi a mesma para ambos os genótipos (**Figura 16E**).

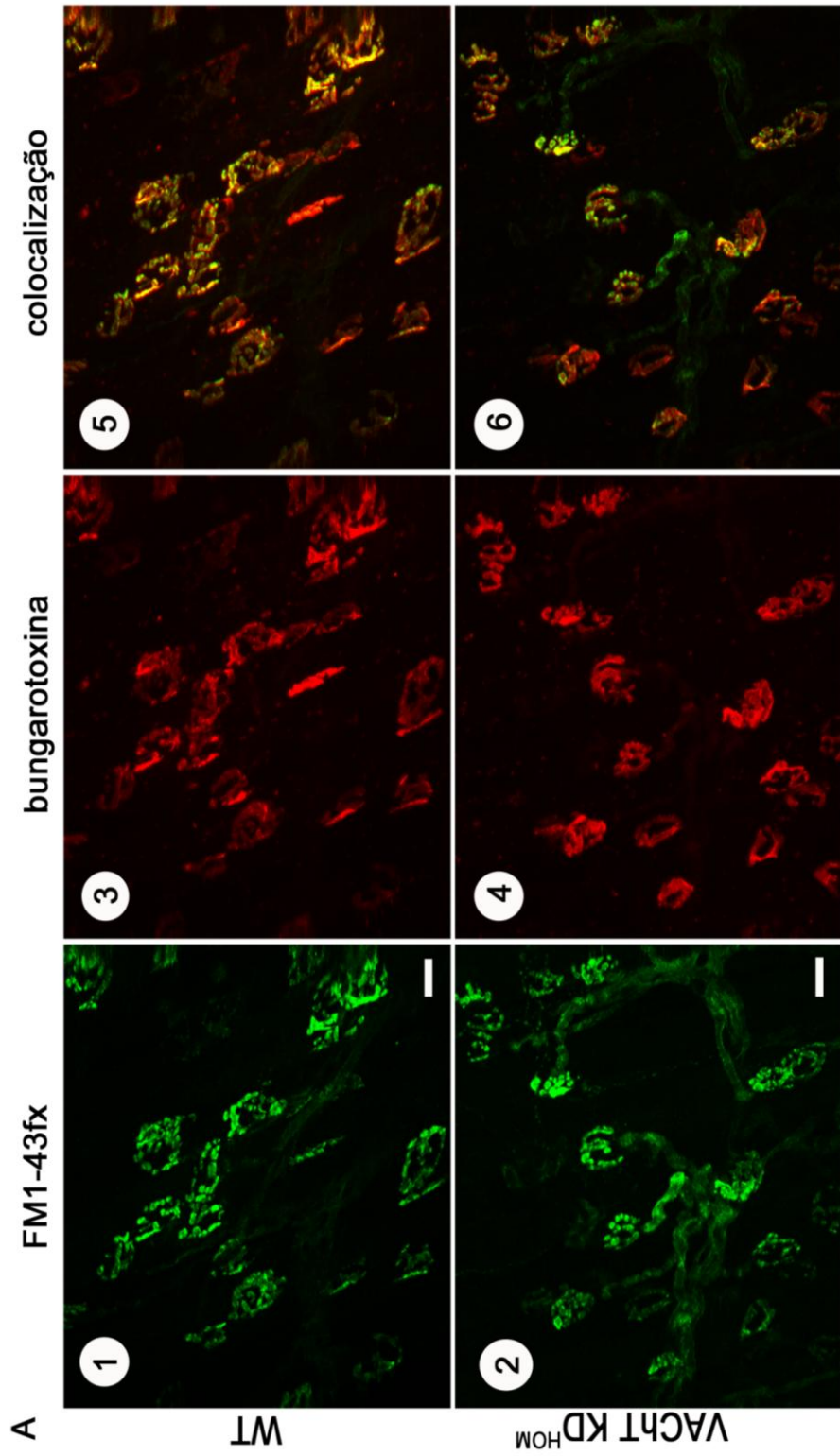


Figura 15. A redução a longo prazo na expressão de VACHT (12 meses) não ocasiona alterações na atividade sináptica das JNMs
 A) Imagens representativas de microscopia confocal de JNMs do músculo diafragma de animais WT (A1, 3 e 5) e VACHT KD^{HOM} (A2, 4 e 6): A1 e A2 – terminais pré-sinápticos marcados com FM1-43fx – Alexa 488; A3 e A4 – *clusters* pós-sinápticos de nAChR marcados com α -bungarotoxina-Alexa 594; A5 e A6 – colocalização dos elementos sinápticos. Escala de barra = 10 μ m.

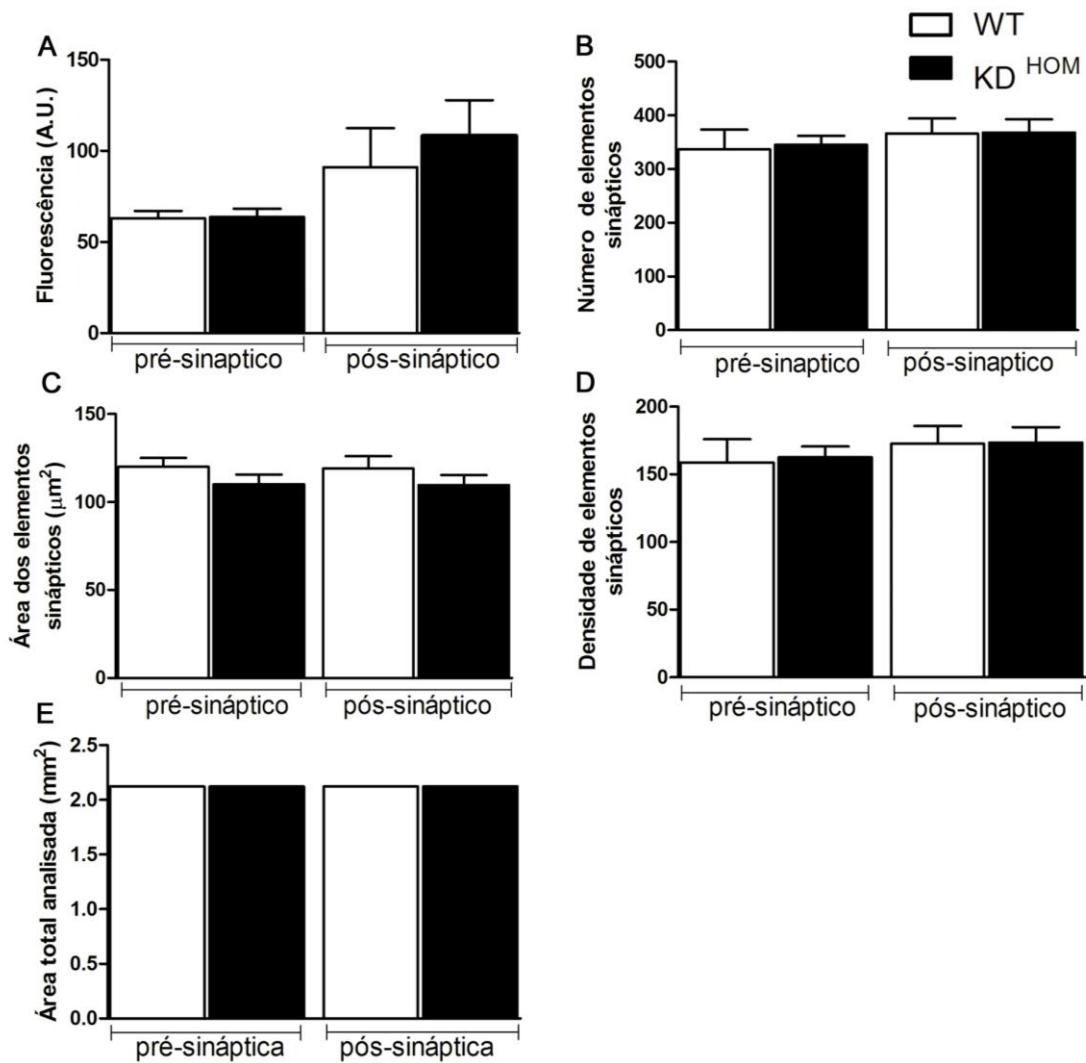


Figura 16. Quantificação das JNMs marcadas com FM1-43 fx e α -bungarotoxina em camundongos com redução da expressão do VACHT a longo prazo. Os camundongos VACHT KD^{HOM} não apresentaram diferenças na intensidade média de fluorescência A), número B), área C) e densidade D) dos elementos pré e pós-sinápticos quando comparados aos WT. E) Gráfico demonstrado que área total analisada foi a mesma para ambos os genótipos. (teste *t* Student não pareado: $p > 0.05$, $n = 3$ WT, e $n = 3$ VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade (Foram analisadas 1101 JNMs nos animais WT e 1035 nos animais VACHT KD^{HOM}))

Já que não foram observadas diferenças na internalização da sonda FM1-43fx (endocitose) pelo terminal nervoso de camundongos WT e KD^{HOM} aos 12 meses de idade, nós nos perguntamos se a liberação da sonda via exocitose de vesículas sinápticas também exibiria padrão similar entre os genótipos. A **Figura 17A** mostra imagens representativas da redução do sinal fluorescente (photobleaching) antes (0 min) e após a exposição à luz polarizada por 7 minutos (7 min). A **Figura 17B** mostra imagens representativas do sinal fluorescente antes (0 min) e após a perfusão de agente despolarizante (KCl 60mM) por um período de 7 minutos (7 min). A quantificação de vários experimentos mostrou que as terminações nervosas dos camundongos VACHT KD^{HOM} de 12 e 24 meses de idade desmarcaram mais na ausência de estímulo quando comparados aos WT (**Figuras 17 e 18 A, B e C**). Nós observamos uma redução de aproximadamente 10% na intensidade média de fluorescência nos animais WT e uma redução de aproximadamente 22% nos VACHT KD^{HOM} ($p \leq 0.05$) aos 12 meses (**Figuras 18A e C**). Resultado similar foi encontrado para os animais de 24 meses de idade, entretanto os dados não demonstraram significância estatística (**Figuras 18A e C**). Na exocitose evocada por alta concentração de KCl, a perda do sinal fluorescente foi similar em ambos os genótipos e idades testadas (12 e 24 meses) com diminuição do sinal fluorescente de aproximadamente 70% e 56% nos camundongos WT e KD^{HOM} aos 12 meses de idade ($p > 0.05$), respectivamente e 66% e 55% nos camundongos WT e KD^{HOM} aos 24 meses de idade, respectivamente ($p > 0.05$) (**Figuras 18A, B e C**).

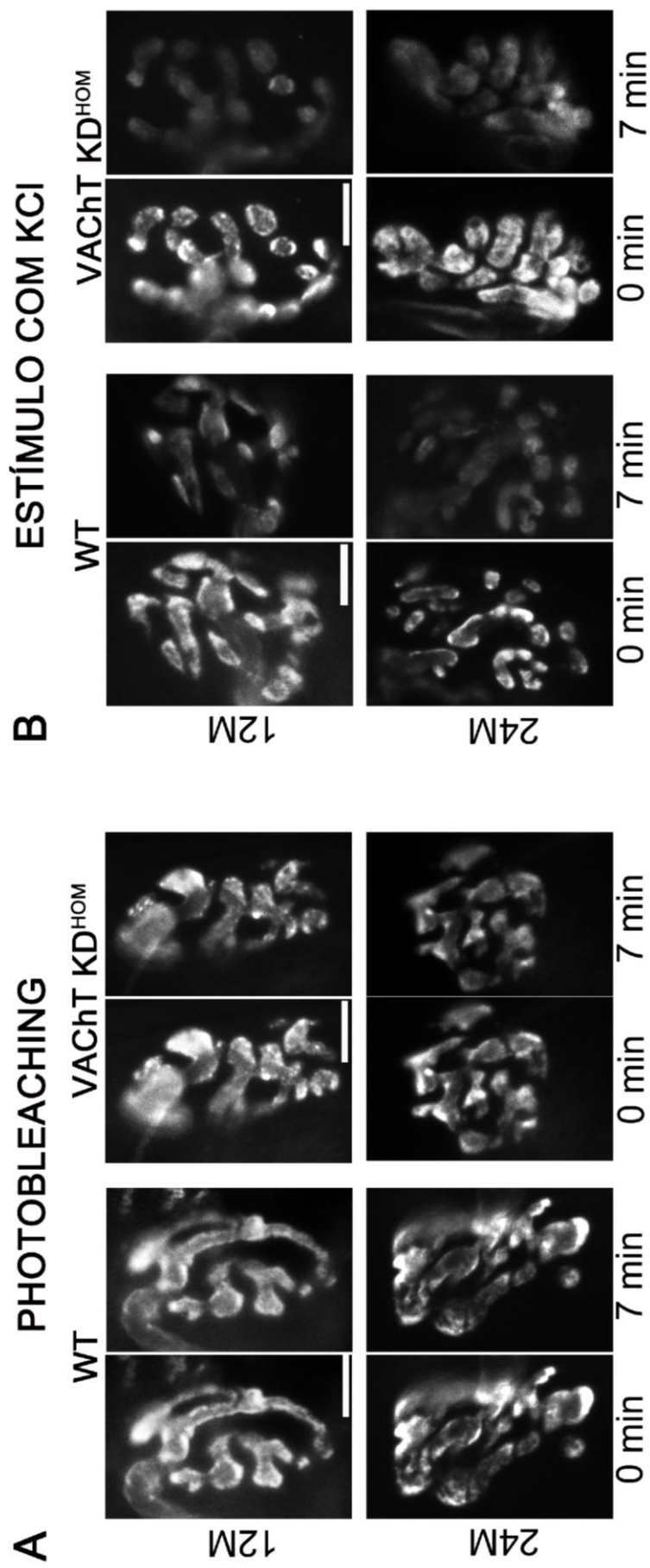


Figura 17. Excitose de VSS em camundongos WT e KD^{HOM} de 12 e 24 meses. A) Imagem representativa da perda do sinal fluorescente devido à exposição por luz polarizada (photobleaching) por período de 7 min. B) Imagens representativas da terminação nervosa antes (0 min) e após 7 min de incubação com solução contendo alta concentração de KCl (60 mM) nos camundongos de 12 (Painéis superiores) e 24 meses (Painéis inferiores) WT (painéis da esquerda) e VACht KD^{HOM} (painéis da direita). Escala de barra = 10 μ m.

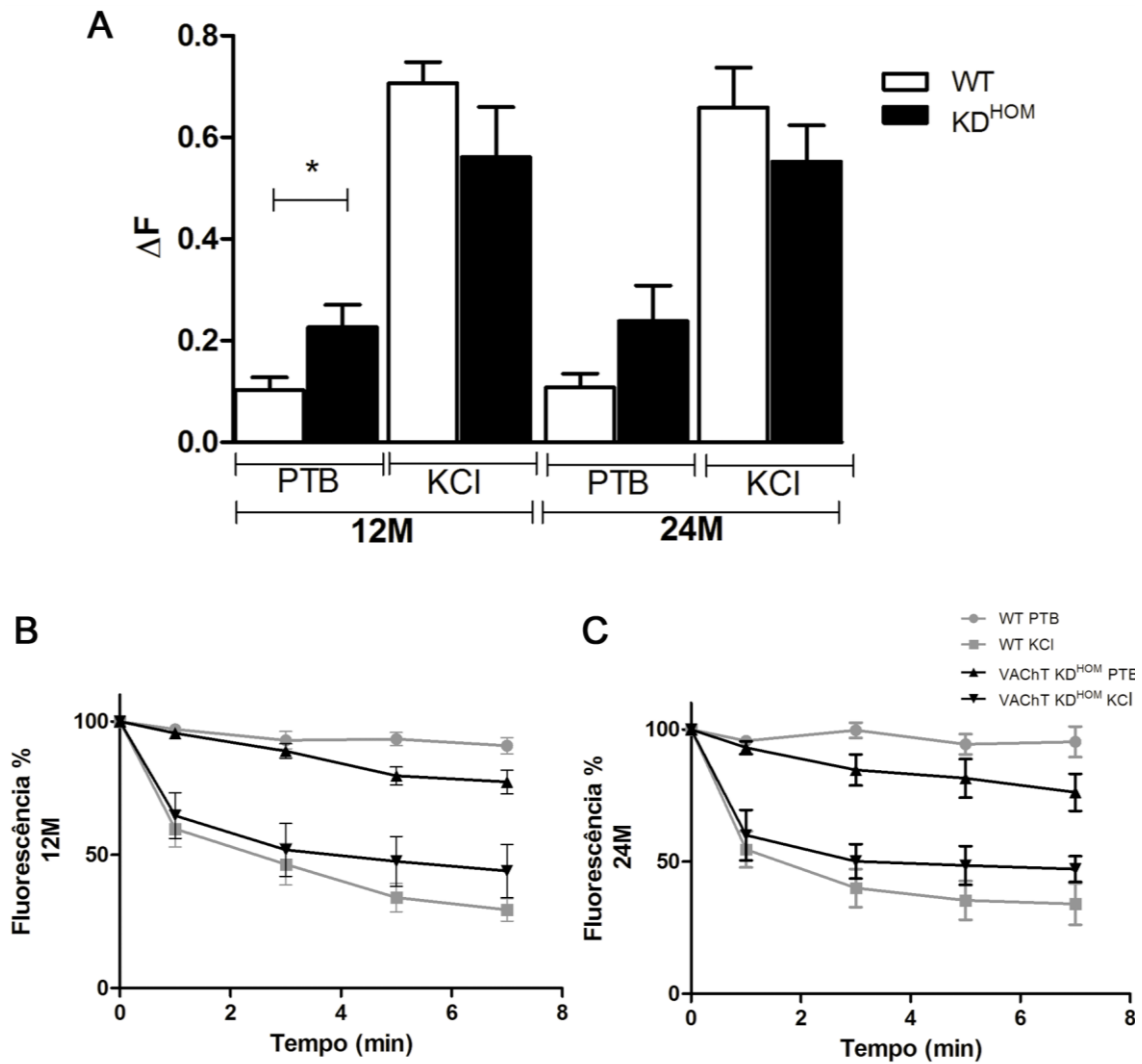


Figura 18. A redução a longo prazo da expressão do VACHT (12 meses) ocasiona aumento na liberação espontânea de vesículas - **Quantificação da exocitose espontânea e evocada por solução contendo alta concentração de KCl.** A) Os camundongos VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade apresentaram um aumento na liberação espontânea de VSs, demonstrado pelo aumento do photobleaching (teste *t* Student não pareado: * $p < 0.05$, $n = 6$ WT, e $n = 6$ VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade). B) Desmarcação de terminações nervosas marcadas com FM1-43: WT (linha cinza) e VACHT KD^{HOM} (linha preta) de animais de 12 e C) 24 meses. (35 spots fluorescentes, $n = 6$ camundongos por genótipo).

Uma vez observada a ocorrência de uma possível maior liberação espontânea de vesículas nos animais VAcHT KD^{HOM} de 12 meses, decidimos partir para análise eletrofisiológica no sentido de entender melhor sobre a liberação de vesículas e liberação quântica de ACh das terminações nervosas motoras de animais com déficit colinérgico a longo prazo.

Para isso, utilizamos a técnica de registro eletrofisiológico de MEPPs para, de forma indireta, avaliar a liberação de ACh no músculo diafragma. As análises foram realizadas em animais de 12 meses de idade. Os MEPPs dos camundongos VAcHT KD^{HOM} de 12 meses foram menores que os dos animais WT, como pode ser visto em histogramas de amplitude de MEPP (**Figura 19A**). Para confirmar a redução vista pelo histograma, foi feita a distribuição da frequência cumulativa da amplitude de MEPP, os quais demonstraram alteração semelhante, ou seja, os animais VAcHT KD^{HOM} apresentaram MEPPs menores (**Figura 19B**, teste de Kolmogorov-Smirnoff, $p < 0.001$). Usando o teste *t* de Student não pareado, a diferença estatística também foi confirmada, com os animais VAcHT KD^{HOM} apresentando menor amplitude de MEPP (WT: 1.9 ± 0.25 , $n=5$; VAcHT KD^{HOM}: 1.1 ± 0.17 , $n=5$; $p < 0.05$) quando comparados aos WT. Com isso, os animais de 12 meses com redução na expressão de VAcHT parecem conter uma menor quantidade de moléculas de ACh nas vesículas em comparação aos animais selvagem.

Além do tamanho quântico, a frequência de MEPP também foi investigada através de registros eletrofisiológicos do músculo diafragma em animais de 12 meses de idade com redução na expressão de VAcHT. Como pode ser visto na **Figura C**, os animais VAcHT KD^{HOM} de 12 meses apresentaram frequência similar aos WT (WT: 0.72 ± 0.09 , $n=5$ e VAcHT KD^{HOM}: 0.75 ± 0.06 , $n=5$ teste *t* de Student, $p > 0.05$).

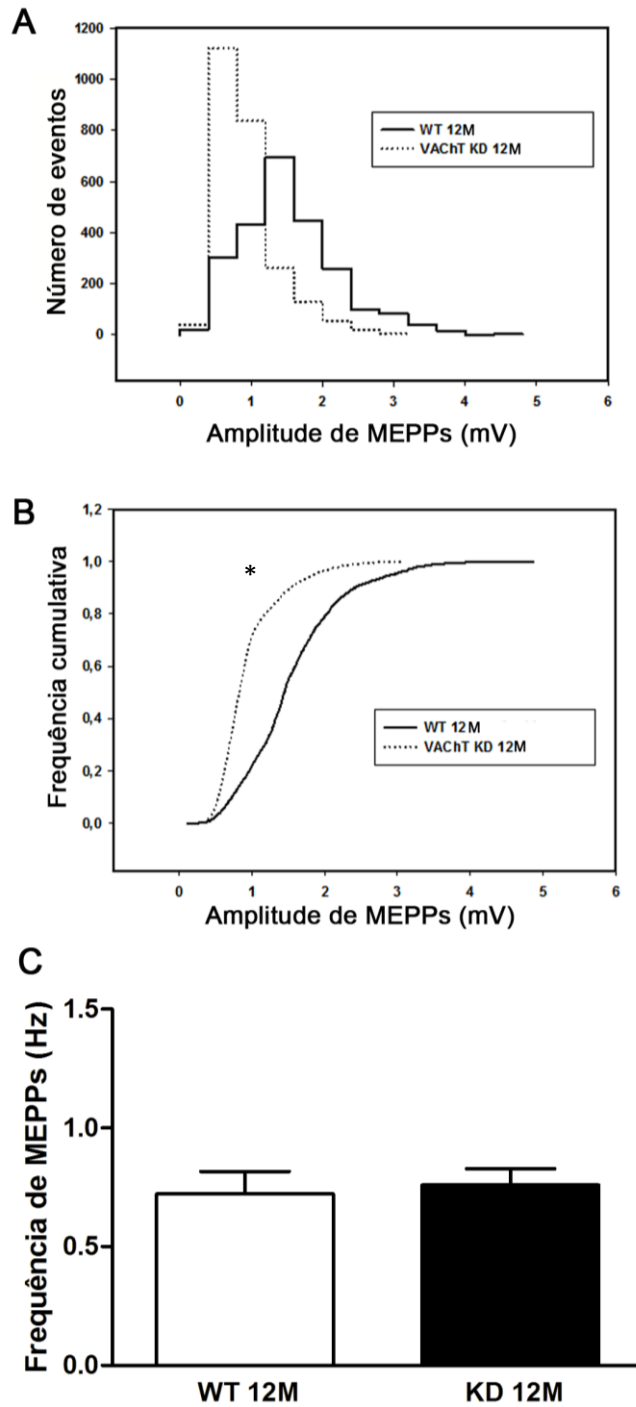


Figura 19. Redução a longo prazo (12 meses) da expressão de VACHT altera a liberação quântica de ACh – MEPP. A) Histograma normalizado da amplitude de MEPP para os animais WT (linha contínua) e VACHT KD^{HOM} (linha pontilhada) de 12 meses de idade. B) Tamanho quantal dos animais WT (linha contínua) e VACHT KD^{HOM} (linha pontilhada) de 12 meses quantificados através da representação gráfica da frequência cumulativa de amplitude de MEPP. C) Frequência de MEPP nas sinapses dos animais WT e VACHT KD^{HOM} de 12 meses de idade. (*) Indica diferença estatisticamente significativa dos camundongos WT (teste *t* de Student não pareado, $p < 0,05$). Dados de cinco fibras musculares de cinco a sete animais de cada genótipo na idade de 12 meses.

4.4. A redução a longo prazo da expressão de VChT acarreta prejuízos na função neuromuscular geral

Estudos prévios demonstraram que camundongos VChT KD^{HOM} adultos (3 meses) apresentaram um desempenho pior nas tarefas motoras quando comparados aos camundongos WT (Fig. 4 de Prado *et al.*, 2006). Considerando que o envelhecimento normalmente ocasiona algum grau de déficit motor (Ritter, 1978; Ingram *et al.*, 1981; Lhotellier and Cohen-Salmon, 1989; Carter *et al.*, 2010), nós nos perguntamos se os camundongos VChT KD^{HOM} poderiam apresentar déficits motores mais pronunciados que os WT. Para responder essa pergunta, nós avaliamos o desempenho muscular ou função neuromuscular dos camundongos VChT KD^{HOM} e WT (12 e 24 meses de idade) em testes de comportamento motor. Os testes realizados foram: campo aberto – deslocamento horizontal (**Figura 20A**), força de agarre (**Figura 20B**) e de coordenação (**Figura 20C**). No deslocamento horizontal durante o período de 300 s, os camundongos VChT KD^{HOM} (22.0 ± 4.5 s - média \pm EPM) apresentaram um desempenho pior quando comparados as camundongos WT (65.7 ± 9.0 s) aos 12 meses de idade ($p < 0.05$). Contudo, aos 24 meses, não foi observada diferença entre os grupos de ambos os genótipos avaliados como mostrado na **Figura 21A** (45.0 ± 24.0 s para VChT KD^{HOM} e 43.7 ± 11.4 s para WT [$p > 0.05$]). No teste para a medida da força de agarre, os camundongos VChT KD^{HOM} apresentaram dificuldade para sustentar o próprio peso na grade enquanto a maioria dos animais WT mantiveram-se agarrados à grade durante tempo maior, tanto aos 12 meses (VChT KD^{HOM}: 6.6 ± 1.4 s e WT: 47.5 ± 5.2 s; $p < 0.0001$) quanto aos 24 meses (VChT KD^{HOM}: 7.6 ± 1.5 s e WT: 31.0 ± 13.6 s; $p < 0.05$) (**Figura 21B**). Por fim, comparamos o desempenho dos animais WT e VChT KD^{HOM} no teste para avaliação da coordenação motora. Esse teste foi conduzido apenas nos camundongos de 12 meses de idade, uma vez que, aos 24 meses, os mesmos não conseguiram realizar essa tarefa. Com isso, os camundongos VChT KD^{HOM} apresentaram uma diminuição no tempo de latência a queda quando comparados aos WT (VChT KD^{HOM}: 153.3 ± 39.6 s e WT: 300.0 ± 0.0 s; $p < 0.001$) (**Figura 21C**).



Figura 20. Testes para função neuromuscular. A) Ilustração do teste para atividade locomotora através de deslocamento horizontal (campo aberto - *open field* – *crossing*) B). Ilustração do teste para medida da força de agarre (*wire hang*). C) Ilustração do teste para avaliação da coordenação motora (*rotarod*).

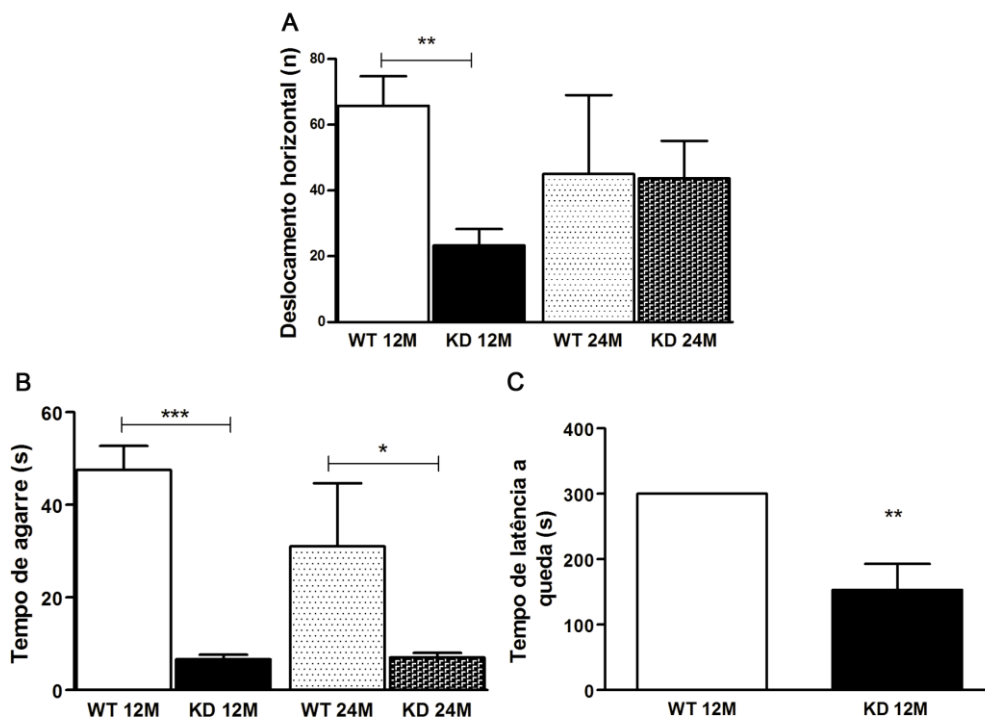


Figura 21. A redução a longo prazo da expressão de VACHT (12 e 24 meses de idade) acarreta déficits na função neuromuscular. A) Distância total de deslocamento horizontal – *crossing* - em 300 s. Os camundongos VACHT KD^{HOM} tiveram pior performance que os WT na idade de 12 meses (teste *t Student* não pareado: $**p < 0.001$, $n=8$ WT, e $n=8$ VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade). B) Tempo despedido quando os camundongos WT e VACHT KD^{HOM} foram colocados suspensos de cabeça para baixo em uma grade por um tempo máximo estipulado de 60s, nas idades de 12 e 24 meses de idade. Os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram pior performance no teste quando comparados aos WT (teste *t Student* não pareado: $***p < 0.0001$, $n=8$ WT, e $n=8$ VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade e teste *t Student* não pareado: $*p < 0.05$, $n=6$ WT, e $n=6$ VACHT KD^{HOM} aos 24 meses de idade). C) Desempenho dos camundongos WT e VACHT KD^{HOM} no teste para coordenação motora pelo aparelho *rotoarod* durante tempo de 300 s. Os camundongos VACHT KD^{HOM} tiveram pior desempenho quando comparados aos camundongos WT (teste *t Student* não pareado: $**p < 0.001$, $n=8$ WT, and $n=8$ VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade).

4.5. A redução a longo prazo da expressão VACHT ocasiona alterações na morfologia e composição molecular dos músculos SOL e EDL

Para verificar se a redução de ACh a longo prazo poderia ocasionar alterações morfológicas nas fibras musculares em camundongos WT e VACHT KD^{HOM}, músculos com diferentes perfis de atividade foram avaliados quanto a área de secção transversal (CSA) e perímetro nas idades de 12 e 24 meses. Com isso, foram escolhidos dois músculos: um de contração lenta (Soleus-SOL) e outro de contração rápida (Extensor Longo dos Dedos - EDL) respectivamente. Imagens representativas de cortes histológicos de fibras musculares dos músculos SOL e EDL são apresentadas na **Figura 22A, B e 23A, B**, respectivamente (12 meses – painel superior e 24 meses – painel inferior). Com relação ao músculo SOL, nós observamos um grande número de fibras musculares com aumento na CSA e perímetro nos camundongos VACHT KD^{HOM} comparado aos WT tanto aos 12 quanto aos 24 meses de idade (**Figuras 22A - B**). Na análise quantitativa, os camundongos VACHT KD^{HOM} mostraram um aumento de aproximadamente 50% na CSA e perímetro do músculo SOL comparado aos WT (teste *t* Student não pareado: 12 meses de idade; CSA e perímetro: $p < 0.001$ e 24 meses de idade; CSA $p < 0.001$; perímetro $p < 0.0001$) (**Figura 22C e D**). Em contrapartida, a análise do músculo EDL mostrou um grande número de fibras musculares com diminuição na CSA e perímetro nos camundongos VACHT KD^{HOM} comparado aos WT tanto aos 12 quanto aos 24 meses de idade (**Figuras 23A - B**). Os camundongos VACHT KD^{HOM} de 12 meses de idade apresentaram uma redução de aproximadamente 10% na CSA e perímetro quando comparado às medidas dos WT (teste *t* Student não pareado: $p < 0.05$). A redução observada na CSA e perímetro nos camundongos VACHT KD^{HOM} de 24 meses foi de aproximadamente 20% comparada ao dos WT (teste *t* Student não pareado, CSA e perímetro: $p < 0.001$) (**Figuras 23C e D**). Esses dados demonstram que o músculo SOL dos animais VACHT KD^{HOM} desenvolve hipertrofia enquanto que o músculo EDL desenvolve atrofia quando comparado aos animais WT em ambas as idades analisadas.

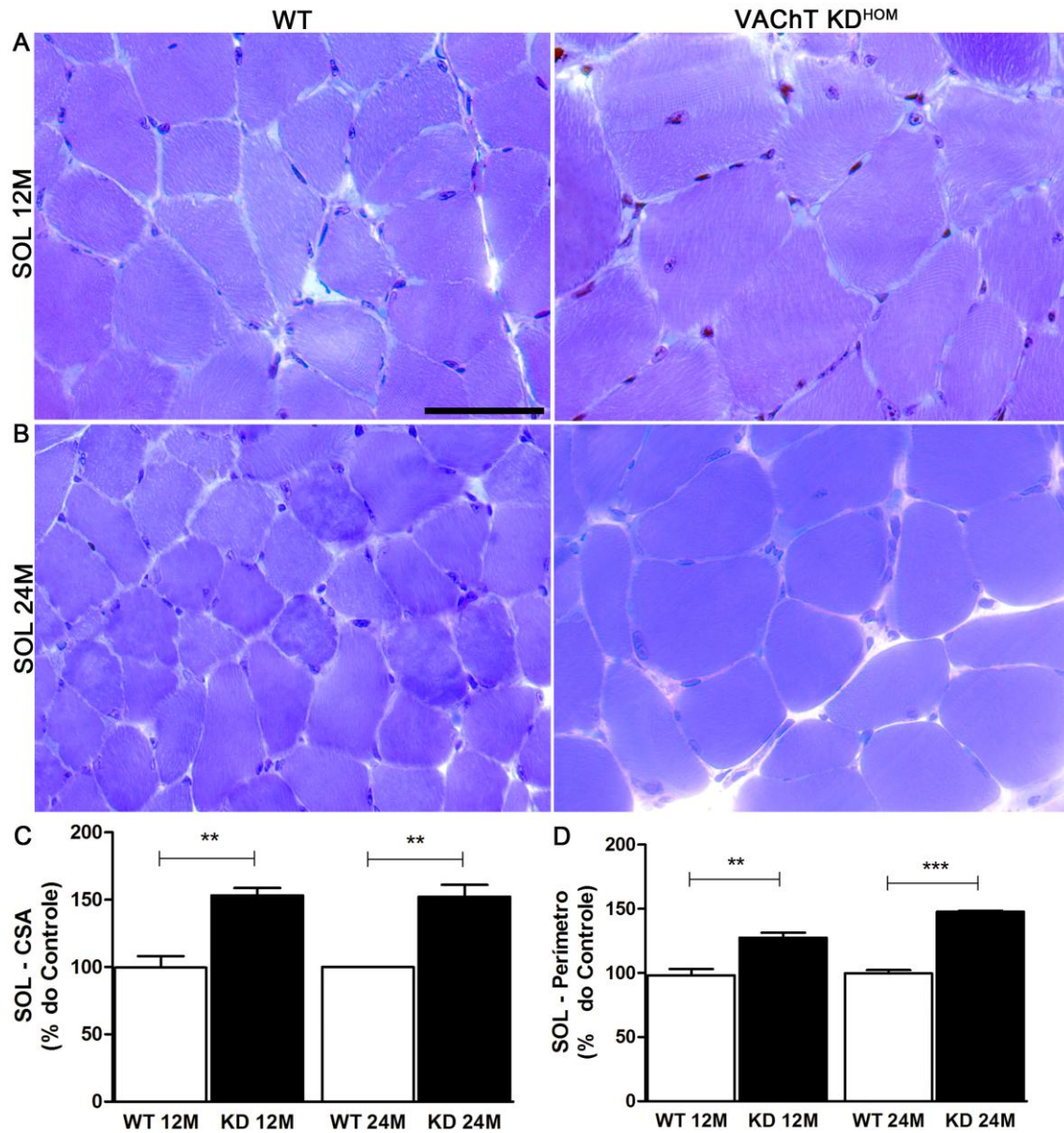


Figura 22. A redução a longo prazo da expressão VACHT acarreta aumento na CSA e Perímetro do músculo SOL (de contração lenta). A e B) Imagens representativas do músculo SOL de camundongos de 12 meses (A) e 24 meses de idade (B) WT (painéis da esquerda) e VACHT KD^{HOM} (painéis da direita). C) Os dados dos animais VACHT KD^{HOM} são apresentados como porcentagem das medidas dos valores de CSA D) e perímetro do músculo SOL nas idades de 12 e 24 meses em relação aos respectivos controles (WT). Em ambas as idades, o músculo SOL dos animais VACHT KD^{HOM} apresentaram aumento na CSA e perímetro quando comparados aos animais T WT (teste *t Student* não pareado, 12 meses de idade: ** $p < 0.001$ e 24 meses de idade: *** $p < 0.0001$, $n = 3$ WT, e $n = 3$ VACHT KD^{HOM} aos 12 e 24 meses de idade). Barra de escala = 50 μ m.

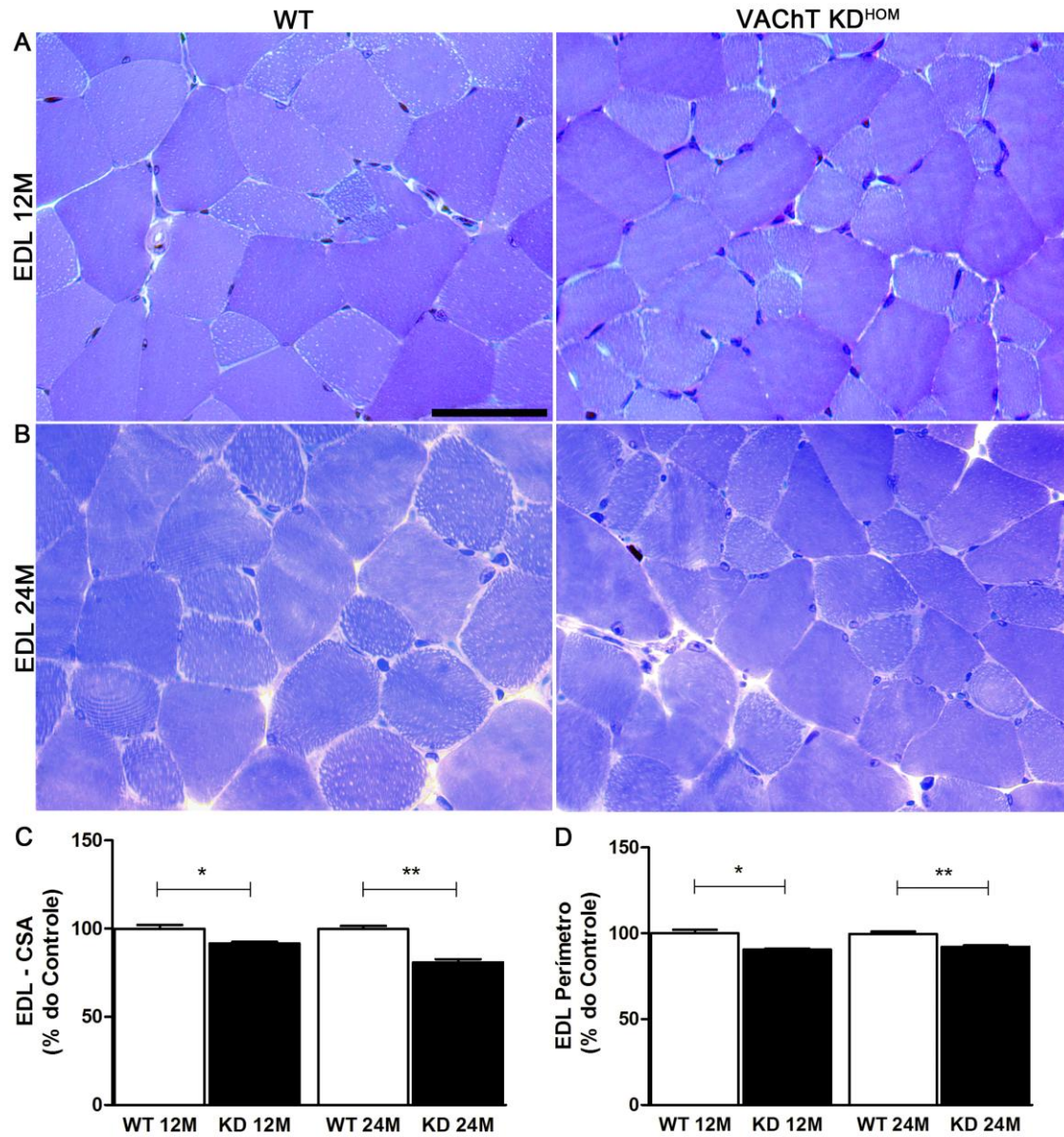


Figura 23. A redução a longo prazo da expressão de VACHT acarreta redução na CSA e Perímetro do músculo EDL (de contração rápida). A e B) Imagens representativas do músculo EDL de camundongos de 12 meses (A) e 24 meses de idade (B) WT (painéis da esquerda) e VACHT KD^{HOM} (painéis da direita). C) Os dados dos animais VACHT KD^{HOM} são apresentados como porcentagem das medidas dos valores de CSA D) e perímetro do músculo EDL nas idades de 12 e 24 meses em relação aos respectivos controle (WT). Em ambas as idades, o músculo EDL dos animais VACHT KD^{HOM} apresentaram uma redução na CSA e perímetro quando comparados aos animais WT (teste *t Student* não pareado, * $p < 0.05$ e 24 meses de idade: ** $p < 0.001$, $n = 3$ WT, e $n = 3$ VACHT KD^{HOM} aos 12 e 24 meses de idade). Barra de escala = 50 μm .

Nosso próximo passo foi utilizar a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para avaliar no plano ultraestrutural o músculo SOL dos camundongos WT e os VAcHT KD^{HOM} com déficit colinérgico a longo prazo. Essa análise foi realizada apenas nos animais de 12 meses devido ao alto índice de mortalidade no decorrer do envelhecimento dos animais, e o músculo EDL estava pouco preservado para as análises. Com isso, o músculo SOL foi submetido à avaliação qualitativa sendo observado que havia preservação dos componentes sarcoméricos, dos túbulos-T e retículo sarcoplasmático (RS). As mitocôndrias apresentaram aparência normal, embora em ambos os genótipos foram observados sinais de degeneração. No entanto, foram observados grande depósitos de glicogênio no músculo SOL dos animais VAcHT KD^{HOM}. Esses depósitos de glicogênio foram encontrados dentro dos sarcômeros, entre os filamentos de actina e miosina, denominados de depósito intramiofibrilar de glicogênio, bem como encontrados no espaço intermiofibrilar, espaço que é normalmente composto por túbulos-T e RS. Além disso, alguns depósitos de glicogênio também foram encontrados ao redor das mitocôndrias quando comparados com camundongos WT (**Figuras. 24A e B**).

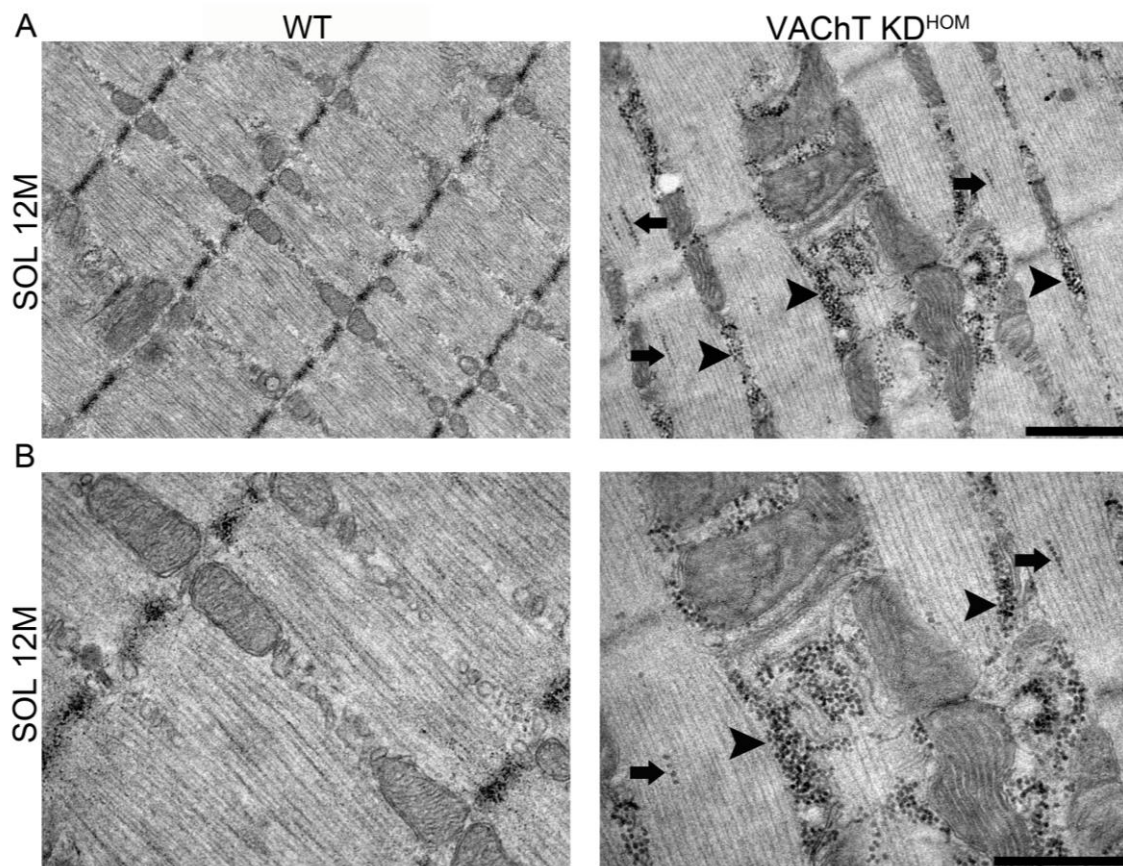


Figura 24. A redução a longo prazo na expressão de VAcHT favorece o acúmulo de grânulos de glicogênio intramiofibrilar e intermiofibrilar no músculo SOL. A-B) Életron-micrografias representativas do músculo SOL de camundongos WT (painéis esquerdos) e VAcHT KD^{HOM} (painéis direitos) demonstrando a presença de grânulos de glicogênio intramiofibrilar (seta) e intermiofibrilar (cabeça de seta) nos camundongos VAcHT KD^{HOM} mas não nos WT. Barra de escala = 500 nm. B) Aumento de 50.000x. (n = 4 animais por genótipo).

Uma vez que os músculos SOL e EDL de camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram alterações na CSA e perímetro, além da presença de depósitos de glicogênio no músculo SOL dos camundongos VACHT KD^{HOM} comparados aos animais WT, nós nos perguntamos se esses achados poderiam estar acompanhados de alterações nas isoformas da Cadeia Pesada de Miosina (MyHC) . O músculo SOL é definido com um músculo de contração lenta composto por principalmente fibras com as isoformas do tipo I e IIA e uma pequena porcentagem de fibras rápidas IIX e o músculo EDL é composto quase que totalmente por fibras musculares do tipo II (Delp and Duan, 1996). Cortes congelados do músculo SOL de camundongos VACHT 12 meses WT e VACHT KD^{HOM} foram incubados com anticorpos contra os isotipos I, IIA, IIX e IIB da MyHC. As imagens representativas das fibras musculares do músculo SOL dos camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram um aumento no número de fibras musculares que expressam a isoforma do tipo I comparado às fibras musculares dos camundongos WT (teste *t* Student não pareado: VACHT KD^{HOM}: 62.07±2.75 e WT: 49.29±1.16; p<0.001). Esse aumento no número das fibras do tipo I no músculo SOL dos VACHT KD^{HOM} também foi acompanhada por uma redução no número das fibras que expressam a isoforma do tipo IIA (teste *t* Student não pareado: VACHT KD^{HOM}: 32.49±2.87 e WT: 42.22±3.00; p<0.05). As expressões das isoformas do tipo IIX não sofreram alterações (teste *t* Student não pareado: VACHT KD^{HOM}: 5.43±1.22 e WT: 8.49±2.67; p>0.05) e a isoforma do tipo IIB não foi detectada em ambos os genótipos (**Figuras 25A e B**). Esses dados indicam que o músculo SOL dos camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam um aumento no perfil oxidativo demonstrado pelo aumento das fibras do tipo I e uma redução das fibras musculares do tipo IIA. Com relação ao músculo EDL, não foram observadas diferenças entre as isoformas da MyHC do tipo I (VACHT KD^{HOM}: 0.30 ± 0.15 e WT: 0.77 ± 0.46; teste *t* Student não pareado: p>0.05); tipo IIA (VACHT KD^{HOM}: 7.20 ± 2.30 e WT: 15.27 ± 5.04; teste *t* Student não pareado: p>0.05). tipo IIX (VACHT KD^{HOM}: 22.15 ± 9.8 e WT: 16.82 ± 0.69; teste *t* Student não pareado: p>0.05) e tipo IIB (VACHT KD^{HOM}: 70.35 ± 8.17 e WT: 67.13 ± 4.80; teste *t* Student não pareado: p>0.05) (**Figura 25C**).

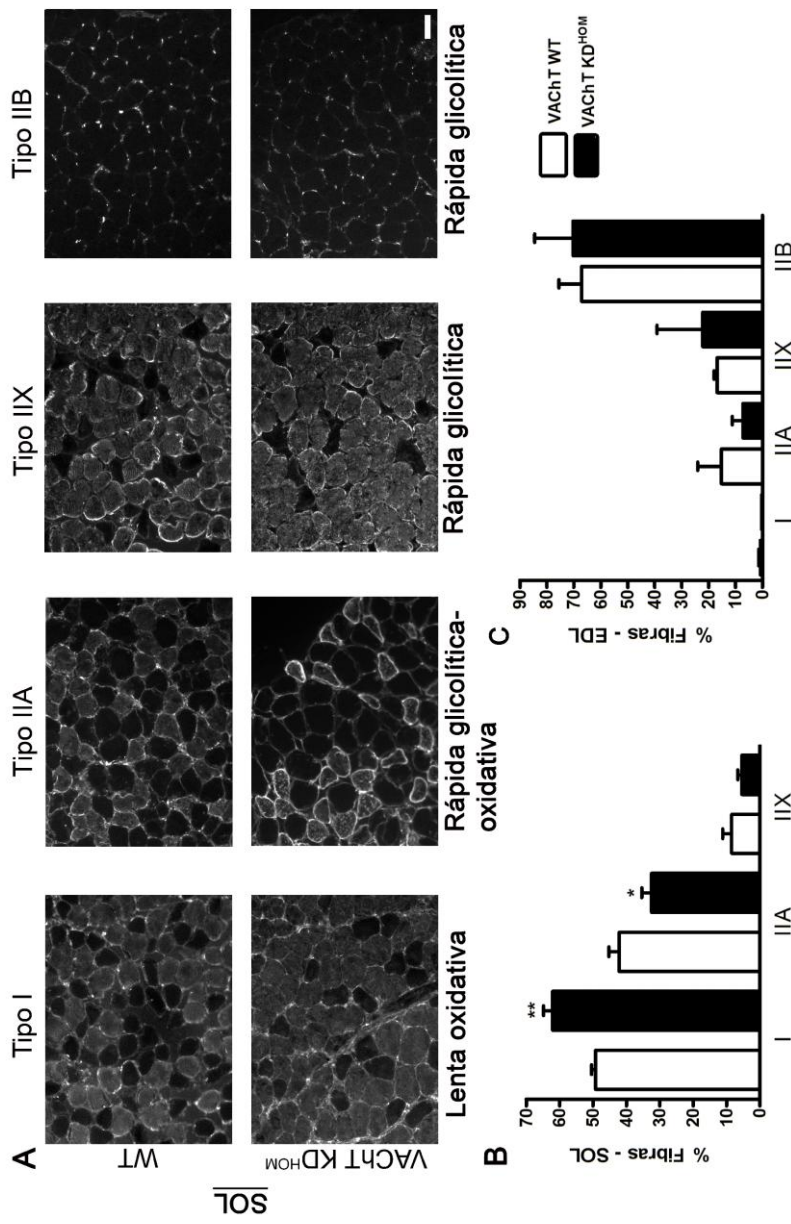


Figura 25. A redução a longo prazo da expressão de VACHT altera a composição do tipo de fibra muscular do músculo SOL dos VACHT KD^{HOM}, mas não no EDL. A) Imagens representativas dos tipos de fibras em cortes transversais do músculo SOL dos animais WT (painel superior) e VACHT KD^{HOM} (painel inferior) sendo cada corte marcado com anticorpos contra os isotipos I, IIA, IIX e IIB da MyHC. Barra de escala = 50 μ m. B) Quantificação da isoformas da MyHC representadas pela porcentagem das fibras musculares do músculo SOL dos animais WT e VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade (teste *t* Student não pareado, ***p*<0.003 e **p*<0.05, n=5 animais por genótipo) C) Quantificação da isoformas da MyHC representadas pela porcentagem das fibras musculares do músculo EDL dos animais WT e VACHT KD^{HOM} aos 12 meses de idade (teste *t* Student não pareado, *p*>0.05, n=3 animais por genótipo).

4.6. Reversão parcial da função neuromotora e da morfologia dos músculos SOL e EDL em camundongos com redução a médio prazo (6 meses) da expressão de VACHT após tratamento com piridostigmina

Considerando que nós observamos alterações na CSA e perímetro dos músculos SOL e EDL, assim como déficits motores funcionais nos camundongos VACHT KD^{HOM} nós nos perguntamos se um tratamento a médio prazo (28 dias) com piridostigmina poderia ser capaz de reverter os achados morfológicos e funcionais encontrados nesses camundongos. Para isso, nós usamos camundongos WT e KD^{HOM} de 6 meses de idade. Os grupos foram compostos de: grupo controle não tratado (WT) e tratado (WT^{PYR}) com piridostigmina, *knockdown* homocigoto não tratado (VACHT KD^{HOM}) e tratado com piridostigmina (VACHT KD^{HOM PYR}) (**Figuras 26, 27 e 28**). Nós escolhemos essa idade para ver se com o tratamento precoce, seria possível reverter as alterações comportamentais e musculares observadas nos camundongos VACHT KD^{HOM}. Além disso, esses animais de 6 meses apresentaram os mesmos déficits motores e histológicos que os animais nas idades de 12 e 24 meses de idade: deslocamento horizontal (WT 89.5 ± 11.3 n=6 e KD^{HOM}: 46.0 ± 4.7 n=5 p <0.001, teste *t Student* não pareado) (**Figura 26A**); força de agarre (WT 27.3 ± 3.6 n=6 e KD^{HOM}: 5.0 ± 0.5 n=6; p <0.0001, teste *t Student* não pareado) (**Figura 26B**); coordenação motora (WT 224.6 ± 44.6 n=5 e KD^{HOM}: 103.8 ± 26.9 n=5; p <0.05, teste *t Student* não pareado) (**Figura 26C**). Após a realização dos testes, os camundongos VACHT KD^{HOM PYR} apresentaram uma melhora em todos os testes comportamentais avaliados comparado aos KD^{HOM}: deslocamento horizontal (VACHT KD^{HOM PYR}: 83.4 ± 7.4 n=5 e VACHT KD^{HOM}: 46.0 ± 4.7 n=5; p <0.001, teste *t Student* não pareado) (**Figura 26A**); força de agarre (VACHT KD^{HOM PYR}: 10.8 ± 1.0 s n=6 e VACHT KD^{HOM}: 5.0 ± 0.5 s n=6; p <0.0001, teste *t Student* não pareado) (**Figura 26B**) e coordenação motora (VACHT KD^{HOM PYR}: 249.3 ± 17.0 s n=6 e VACHT KD^{HOM}: 103.8 ± 26.9 s n=6; p <0.001, teste *t Student* não pareado) (**Figura 26C**). A melhora na função muscular dos camundongos VACHT KD^{HOM PYR} foi acompanhada de uma reversão parcial da CSA e perímetro das fibras musculares nos músculos SOL (redução de aproximadamente 25% das medidas da CSA dos VACHT KD^{HOM}; p<0.0001 e 15% no perímetro p<0.0001; two-way ANOVA seguido por post hoc Bonferroni; **Figura 27A, B e C**) e EDL (aumento de aproximadamente 25% das medidas de CSA dos VACHT KD^{HOM}; p<0.0001 e 9% no perímetro; p<0.001; two-way ANOVA seguido por post hoc Bonferroni; **Figura 28A, B e C**). Esses dados indicam

que a grande quantidade de ACh na fenda sináptica proporcionada pela piridostigmina ocasionou uma reversão parcial das alterações observadas nas fibras musculares e melhorou a performance motora dos camundongos VACHT KD^{HOM}.

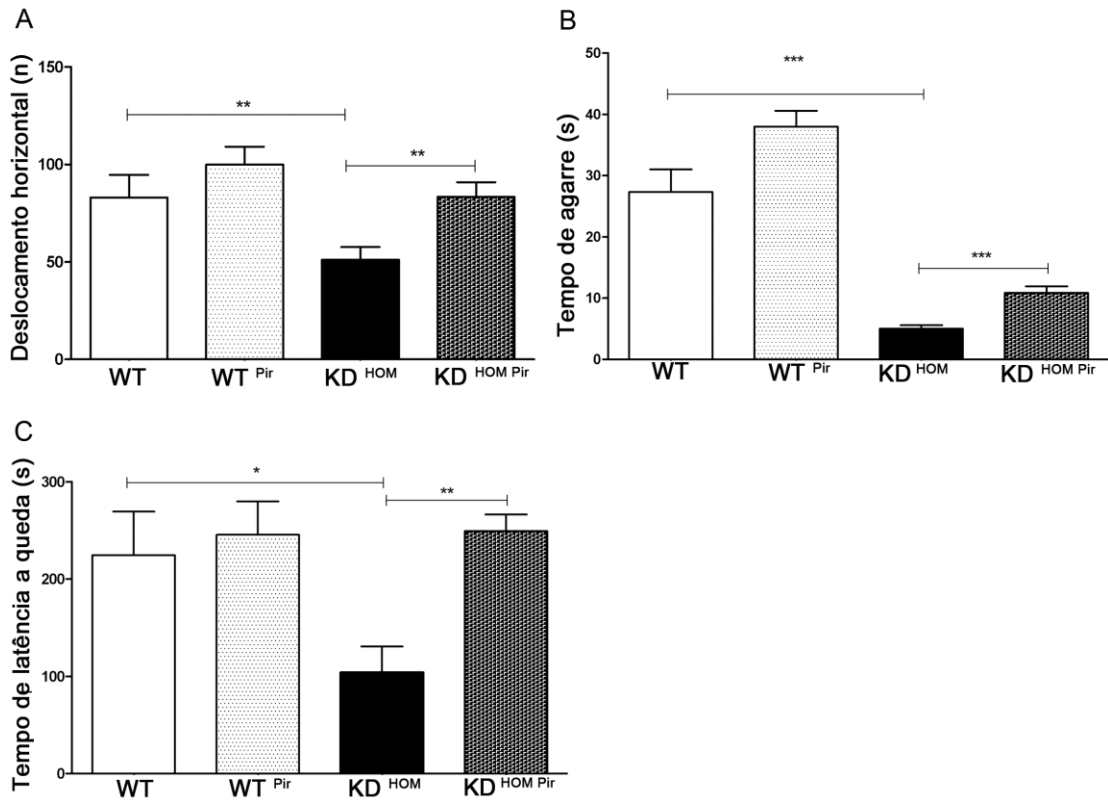


Figura 26. Tratamento com piridostigmina reverte parcialmente os déficits neuromusculares nos camundongos VACHT KD^{HOM}. A) Distância total movida através do deslocamento horizontal durante o tempo de 300 s. Os camundongos VACHT KD^{HOM} PYR apresentaram maior deslocamento quando comparados aos VACHT KD^{HOM} (teste *t Student* não pareado: ** $p < 0.001$, $n = 8$ VACHT KD^{HOM} PYR, e $n = 8$ VACHT KD^{HOM} aos 6 meses de idade). B) Tempo despedido quando os camundongos VACHT KD^{HOM} PYR e VACHT KD^{HOM} foram colocados suspensos de cabeça para baixo em uma grade por um tempo máximo estipulado de 60s. Os camundongos VACHT KD^{HOM} PYR apresentaram melhor performance no teste quando comparados aos VACHT KD^{HOM} (teste *t Student* não pareado; *** $p < 0.0001$, $n = 8$ KD^{HOM} PYR, e $n = 8$ VACHT KD^{HOM} aos 6 meses de idade) C) Desempenho dos camundongos no teste para coordenação motora pelo aparelho *rotarod* durante tempo de 300 s. Os camundongos VACHT KD^{HOM} PYR tiveram melhor desempenho quando comparados aos camundongos VACHT KD^{HOM} (teste *t Student* não pareado: ** $p < 0.001$, $n = 8$ WT, e $n = 8$ VACHT KD^{HOM} aos 6 meses de idade).

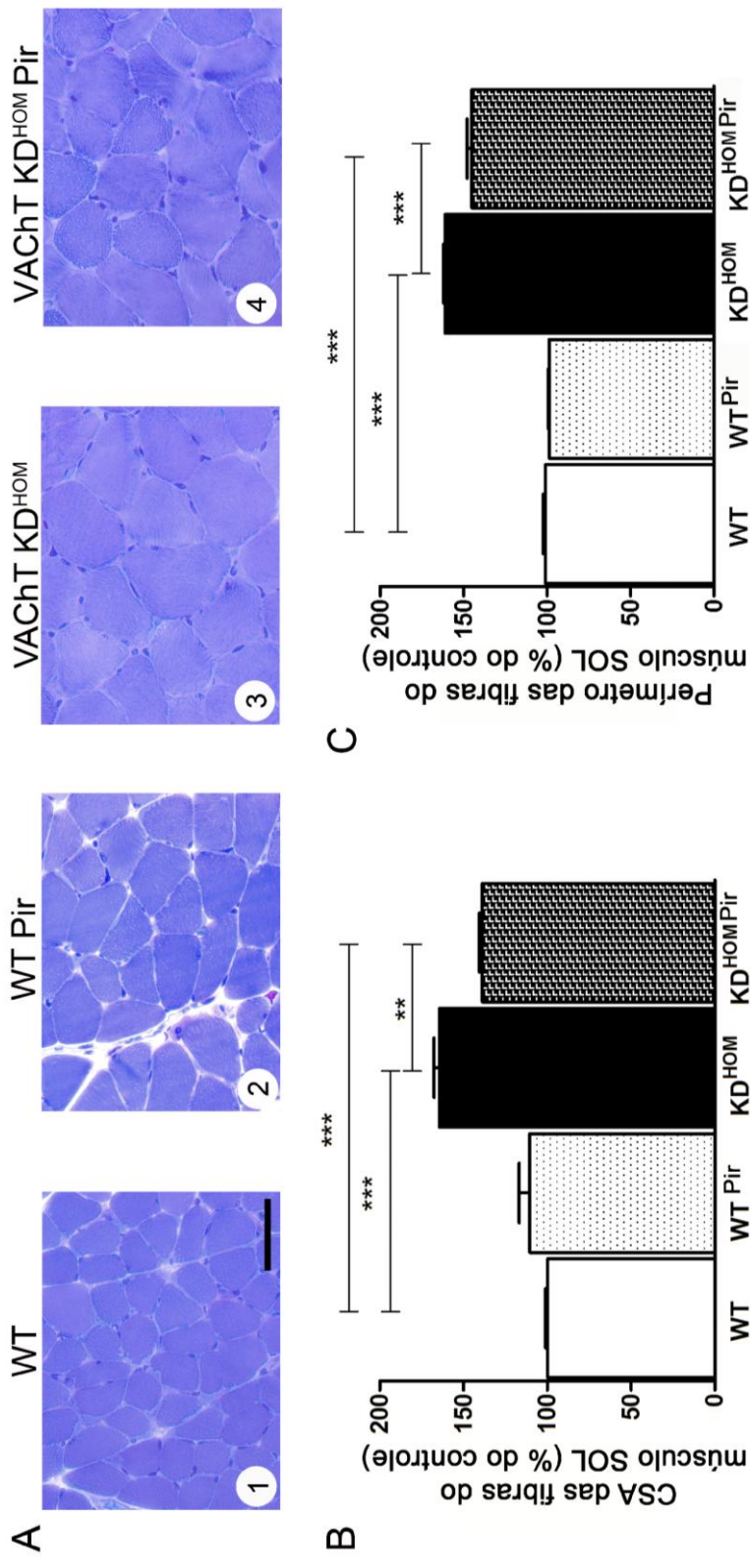


Figura 27. O tratamento com piridostigmina reverte parcialmente as alterações na CSA e Perímetro do músculo SOL encontrados nos camundongos VACHT KD^{HOM}. A) Imagens representativas do músculo SOL de camundongos WT (1), WT^{PYR} (2), VACHT KD^{HOM} (3) e VACHT KD^{HOM}PYR (4) de 6 meses B) Os dados são apresentados como porcentagem das medidas dos valores de CSA C) e perímetro do músculo SOL do controle (WT). O músculo SOL dos animais VACHT KD^{HOM}PYR apresentaram uma redução na CSA e perímetro quando comparados aos animais VACHT KD^{HOM} (two-way ANOVA seguido por Bonferroni post hoc, *p<0.0001 e **p<0.001, n=3 para cada genótipo). Barra de escala = 50 μm.**

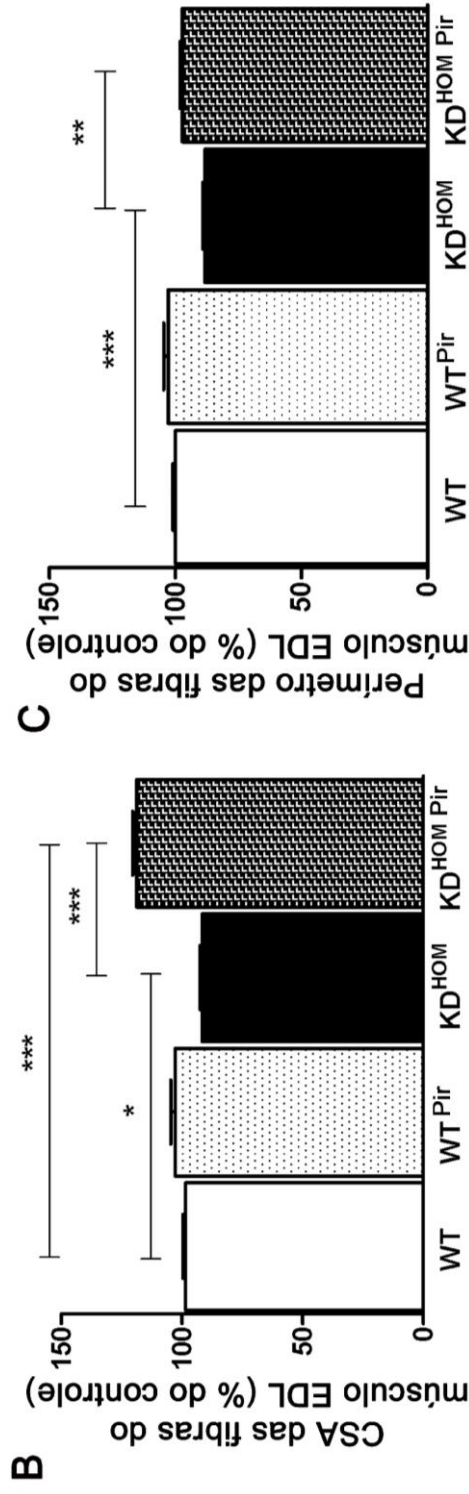
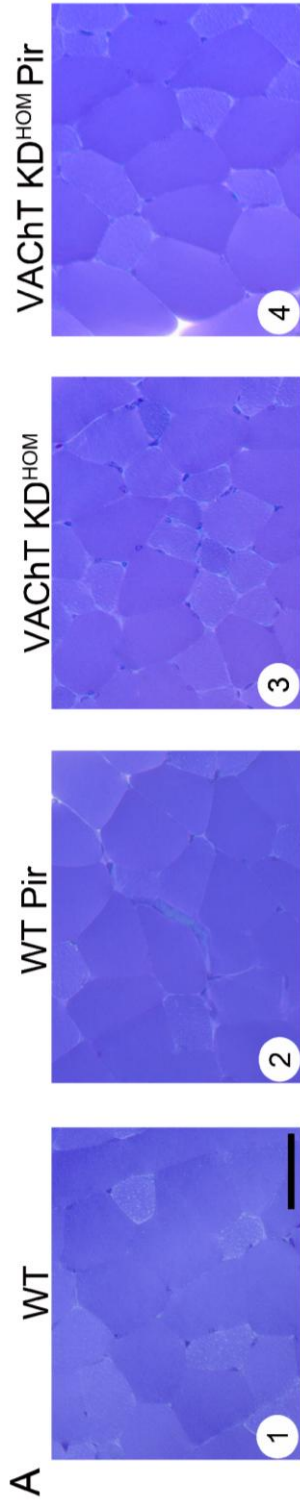


Figura 28. O tratamento com piridostigmina reverte as alterações na CSA e Perímetro do músculo EDL encontrados nos camundongos VACHT KD^{HOM}. A) Imagens representativas do músculo EDL de camundongos WT (1), WT^{PYR} (2), VACHT KD^{HOM} (3) e VACHT KD^{HOM} PYR (4) de 6 meses B) Os dados são apresentados como porcentagem das medidas dos valores de CSA C) e perímetro do músculo EDL do controle (WT). O músculo EDL dos animais VACHT KD^{HOM} PYR apresentaram um aumento na CSA e perímetro quando comparados aos animais VACHT KD^{HOM} (two-way ANOVA seguido por Bonferroni post hoc, *CSA: p<0.0001, * p<0.05 e perímetro: **p<0.001, n=3 para cada genótipo). Barra de escala = 50 µm.**

DISCUSSÃO

5.0. DISCUSSÃO

5.1. Função Pulmonar, Morfologia e Atividade Sináptica das JNMs do músculo diafragma de camundongos com redução a longo prazo da expressão de VACHT

Neste trabalho, nós investigamos os efeitos da expressão reduzida a longo prazo do gene que codifica a proteína VACHT, seja por período de 12 ou 24 meses sobre a função pulmonar bem como morfologia e a atividade sináptica das JNMs do músculo diafragma.

Utilizando a avaliação da função pulmonar pela pletismografia de corpo inteiro (Bruxco) percebemos que não houve diferença nos valores de Penh nos camundongos com redução na expressão de VACHT quando comparados aos animais WT. Caso o músculo diafragma se apresentasse disfuncional, com fraqueza muscular, o índice de broncoconstrição poderia se mostrar elevado com relação aos WT, representando uma dificuldade na passagem do fluxo aéreo.

A técnica de pletismografia oferece vantagens em relação às técnicas invasivas existentes, pois pode ser utilizada em animais vivos, respirando espontaneamente (Hamelmann *et al.*, 1997) o que para nossa análise torna-se importante uma vez que a respiração espontânea depende da integridade da função diafragmática (Voyvoda *et al.*, 1994; Yamaguti *et al.*, 2009). No entanto, tem havido inconsistência entre os valores obtidos pela pletismografia e pelas técnicas invasivas, utilizando anestesia geral e traqueostomia ou intubação traqueal (Albertine *et al.*, 2002; Flandre *et al.*, 2002; Pauluhn, 2004). Para eliminar esses fatores, nós decidimos avaliar a função pulmonar a partir de técnica invasiva, utilizando para tal um ventilador mecânico com o animal anestesiado e curarizado e, da mesma forma, não percebemos diferenças estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas. Baseando-se nesses dados, sugerimos que o déficit colinérgico a longo prazo não foi capaz de alterar a função pulmonar em animais aos 12 meses de idade.

Foi visto por nós, que os camundongos VACHT KD^{HOM} se locomovem menos, através do teste comportamental de campo aberto, em relação aos animais WT. Sabe-se, contudo, que o diafragma é mais exigido em condições de maior esforço físico ou fadiga (Kocis *et al.*, 1997). Com isso, talvez o teste em questão fizesse com que o animal com redução a longo prazo na expressão de VACHT tenha realizado menor

quantidade de movimentos, o que não os deixou fadigados e permitiu medidas da função pulmonar similares aos dos animais controle.

Tem sido demonstrado que pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e que apresentam disfunção diafragmática, caracterizada por uma baixa mobilidade do diafragma, apresentam maior mortalidade do que os pacientes sem disfunção diafragmática (Yamaguti *et al.*, 2009). Baseado nisso, os camundongos com redução a longo prazo na expressão de VACHT não apresentaram disfunção diafragmática bem como não diferiram quanto ao índice de mortalidade (dados não apresentados), pois os animais de ambos os genótipos viveram até idade avançadas (12 e 24 meses).

Sabe-se que o correto funcionamento pulmonar depende tanto da função ou contratilidade diafragmática quanto da preservação das estruturas do tecido pulmonar, ou seja, da sua morfologia (Arantes-Costa *et al.*, 2008). Corroborando com esses indicadores, nós realmente não encontramos acometimento nem da função pulmonar, indicador indireto da função diafragmática, bem como evidenciamos ausência de alteração na morfologia dos elementos pré e pós-sinápticos das JNMs do músculo diafragma nos animais VACHT KD^{HOM} de 12 meses, seja de maneira dependente ou não da atividade da terminação nervosa.

Outros trabalhos que estudaram a função respiratória nos VACHT KD^{HOM} mostraram que com 3 meses estes animais apresentam piora da função pulmonar em relação aos selvagens. Os autores atribuíram esta piora da função pulmonar à alterações histopatológicas observadas no pulmão como inflamação e deposição de fibras da matriz extracelular ao redor das vias aéreas, o que pode por se, aumentar a resistência a passagem do ar (Miranda, 2012). De fato, animais normais com 12 meses já apresentam uma piora da complacência pulmonar devido a um alargamento dos alvéolos e perda do recuo elástico que acontece com a idade (Andreotti *et al.*, 1998; Ishii *et al.*, 2008). Desta forma, uma possibilidade para explicar estas discrepâncias entre animais VACHT jovens e com 12 meses, possam ser devido ao fato de que os animais selvagens também envelhecem, e talvez tenham um pulmão já comprometido neste momento. Embora análises histopatológicas do pulmão e da reposta inflamatória em 12 meses possam ajudar a entender estas diferenças, estas não foram o foco do presente estudo e poderão ser feitas posteriormente.

Há alguns anos tem sido demonstrado que o movimento diafragmático se correlaciona com os volumes inspirados de maneira linear, por exemplo, quanto maior a excursão diafragmática, maior o volume inspirado (Houston *et al.*, 1994; Houston *et al.*, 1995). É verificado que pacientes com hemiplegia apresentam redução da capacidade vital, pressão expiratória e inspiratória máxima, e volume expirado forçado em 1 segundo comparados aos controles assim como também apresentam redução dos movimentos diafragmáticos do lado hemiplégico em comparação aos indivíduos controles (Voyvoda *et al.*, 2012). No entanto, mesmo com o conteúdo quântico de ACh reduzido nos VACHT KD^{HOM} visto aqui aos 12 meses, parece que a quantidade de ACh liberada foi suficiente para manter a funcionalidade diafragmática bem como seus volumes pulmonares pelos camundongos com redução a longo prazo de VACHT.

No teste rotarod, teste que avalia a coordenação motora dos animais, verificamos que os camundongos com redução a longo prazo de VACHT apresentaram uma performance pior quando comparados aos WT. Como foi estabelecido o tempo de corte de 300s para finalizar o experimento, esse teste avalia além da força e equilíbrio, a fadiga dos animais (Xu and Shan, 2014). Com isso, pode ser que os animais VACHT KD^{HOM}, além de terem uma redução na função dos músculos das patas, podem ter sofrido uma redução da função diafragmática, onde se apresentariam fadigados precocemente em relação aos WT. Esse dado é reforçado pela observação de que o rotarod foi o teste comportamental em que os animais VACHT KD^{HOM} tiveram dificuldade em realizar, uma vez que os de 24 meses nem mesmo conseguiram sua finalização. Seria interessante realizar experimentos para avaliar a função respiratória após fadiga nesses animais para verificar realmente a veracidade dessa hipótese.

Foi visto em trabalho prévio realizado por nosso grupo de pesquisa que os camundongos VACHT KD^{HOM} de 3 meses de idade não apresentaram alterações na morfologia das JNMs em comparação aos animais WT (Rodrigues *et al.*, 2013). Além do mais, outros trabalhos já demonstraram que na JNM colinérgica a ACh é o principal sinal neuronal que induz respostas na membrana pós-sináptica a partir dos receptores colinérgicos nicotínicos e então, regula a diferenciação pós-sináptica e coordena a maturação sináptica (Misgeld *et al.*, 2002; Witzemann, 2006; De Castro *et al.*, 2009). Com isso, nos perguntamos se com um déficit colinérgico a longo prazo, por período de 12 meses, ocorreriam alterações na morfologia dessas estruturas componentes da placa motora. Percebemos, através de análises qualitativas e quantitativas dos elementos

sinápticos de JNM dos animais WT e VACHT KD^{HOM} que as JNM demonstravam aparência geral normal quando comparadas aos WT em parâmetros como número, área e densidade dos perfis dos elementos pré- e pós-sinápticos.

Uma vez não observada alteração quanto aos elementos das JNM do músculo diafragma nos animais com redução de VACHT a longo prazo, partimos para uma análise qualitativa, onde maiores detalhes da estrutura poderiam ser analisadas, utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. Da mesma forma, nós não observamos alterações das JNM nos VACHT KD^{HOM} no plano ultraestrutural com relação aos animais WT além das previamente já descritas por Rodrigues *et al.* (2013) nos animais VACHT KD^{HOM} de 3 meses de idade. Dentre essas citamos alteração na forma das VSs, em que as vesículas das terminações motoras dos animais VACHT KD^{HOM} se apresentam com uma forma achatada e elíptica quando comparadas as dos animais WT. Assim sendo, nossos resultados sugerem que a expressão reduzida de VACHT, mesmo por período prolongado, garante um nível mínimo de liberação de ACh, que é suficiente para manter o desenvolvimento e promover o estabelecimento normal das JNMs no diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM}, porém ocasiona alteração morfológica nas VSs, corroborando com os achados descritos para os animais de VACHT KD^{HOM} de 3 meses de idade (Rodrigues *et al.*, 2013).

Uma vez observado que as VSs das terminações motoras dos camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram alterações em sua forma, nosso próximo passo foi entender como estaria a atividade sináptica nesses animais. Estudo pioneiro realizado por Prado *et al.* (2006), utilizou a sonda vital FM1-43, dependente da atividade da terminação nervosa, para monitorar a reciclagem de VSs em terminais pré-sinápticos de diafragma de camundongos VACHT KD^{HOM} na idade de 3 meses. Nesse trabalho ficou evidente que terminações motoras desses animais, após estímulo despolarizante por KCl, internalizavam FM1-43 em quantidade semelhante às dos animais WT, observado pela similaridade na quantificação do sinal fluorescente entre os genótipos (Prado *et al.*, 2006). Esse dado indica que a endocitose (ou vesículas que reciclam – endocitose compensatória) era a mesma entre os genótipos. Da mesma forma, nos propusemos a avaliar a endocitose dos camundongos com redução por maior período de tempo na expressão de VACHT (12 meses) sobre a atividade da terminação nervosa. Percebemos que as terminações motoras dos camundongos VACHT KD^{HOM} de 12 meses, após estímulo despolarizante por KCl, também não apresentaram diferença na quantificação

do sinal fluorescente com relação aos camundongos WT. E uma vez marcadas a terminações juntamente com os receptores nicotínicos, aproveitamos para realizar a quantificação dos elementos sinápticos de maneira dependente da atividade da terminação nervosa. Mais uma vez percebemos a inexistência de diferenças com relação aos animais WT de 12 meses. Esses dados sugerem que mesmo com um déficit colinérgico a longo prazo, o número de VSs que reciclam durante estímulo despolarizante é equivalente para os dois genótipos e que a morfologia da JNM permanece inalterada.

Uma vez não encontrada diferença na endocitose, partimos para a análise da exocitose de VSs nos animais com déficit a longo prazo da expressão de VAcHt e comparamos aos animais selvagens da mesma idade. Nesse caso, obtivemos resultados em camundongos com déficit colinérgico nas idades de 12 e 24 meses.

Nos experimentos de exocitose, para cada estímulo despolarizante por KCl, existia um controle da desmarcação denominado *photobleaching*, que é usado para verificar o decaimento do sinal fluorescente apenas pela exposição da amostra biológica a luz polarizada. Percebemos que a exocitose após estímulo com KCl era semelhante entre os genótipos nas idades de 12 e 24 meses, corroborando com os dados sobre a endocitose. De maneira similar aos nossos achados a respeito da endocitose e exocitose, outros estudos também demonstraram que vesículas que apresentam redução ou ausência de conteúdo quântico podem ser recicladas normalmente nas terminações axonais de células hipocámpicas e cerebelares (Cousin and Nicholls, 1997; Zhou *et al.*, 2000). O mesmo ocorre nas JNMs colinérgicas, onde mesmo após administração de vesamicol (inibidor do VAcHt), ocorre a reciclagem de VSs (Parsons *et al.*, 1999).. Esses achados, juntamente com os dados aqui mostrados, indicam que o transporte de ACh para as vesículas não é um requisito para o ciclo de vesículas sinápticas. No entanto, de maneira intrigante, percebemos um aumento no *photobleaching* na idade de 12 meses e uma tendência ao aumento na idade de 24 meses nos animais VAcHt KD^{HOM} quando comparados aos WT. Esses dados, por sua vez, poderiam indicar a ocorrência de um aumento na exocitose espontânea nos camundongos VAcHt KD^{HOM} de 12 meses de idade.

Para tentar elucidar melhor esse mecanismo, partimos para a avaliação eletrofisiológica do músculo diafragma. Assim, foram investigadas a frequência e amplitude de MEPPs na JNM do músculo diafragma dos camundongos VAcHt KD^{HOM}

de 12 meses de idade. Como era de se esperar, uma vez que há redução na expressão do VACHT, nós encontramos que as fibras musculares do músculo diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} de 12 meses exibiam amplitude de MEPPs reduzida comparada aos WT da mesma idade. No entanto, a frequência desse evento era similar nos dois genótipos sugerindo que, pelo menos para a sinapse neuromuscular, poderia haver um mecanismo compensatório no processo de exocitose de VSs para balancear a redução no conteúdo quântico de ACh nas terminações nervosas motoras do animais VACHT KD^{HOM} de 12 meses.

Eventos de exocitose espontânea têm sido descritos desde os primórdios dos estudos da comunicação sináptica (Fatt and Katz, 1950, 1952b; Del Castillo and Katz, 1954), porém apenas recentemente obteve-se um melhor entendimento dos mecanismos reguladores do processo (revisado por Ramirez and Kavalali, 2011; Andreae and Burrone, 2014; Kaeser and Regehr, 2014; Rizzoli, 2014). Algumas diferenças existem a cerca da liberação de VSs que ocorre de maneira dependente de estímulo com respeito a que ocorre de maneira espontânea. Uma delas, é que liberação dependente de estímulo necessita de um potencial de ação como gerador da exocitose, ou seja, é um mecanismo regulado que não pode ocorrer a qualquer momento, enquanto que a liberação espontânea pode aparentemente ocorrer sem a presença do potencial de ação além de ser um evento que pode acontecer espontaneamente na terminação nervosa (Zefirov *et al.*, 2006). Alguns mecanismos podem promover o aumento da exocitose espontânea em métodos experimentais, como por exemplo, os dependentes ou não de Ca²⁺ (Heuser and Miledi, 1971; Zefirov *et al.*, 2006) e solução hipertônica de sacarose (Rosenmund and Stevens, 1996). Recentemente tem sido postulada a hipótese de que existem dois mecanismos para liberação espontânea de vesículas sendo que num desses mecanismos as vesículas que exocitam são definidas como vesículas sinápticas liberadas espontaneamente (spontaneously releasing synaptic vesicles - SRSVs) e são liberadas em conjunto com as vesículas que respondem a estímulo. Já no outro mecanismo, as vesículas são definidas como vesículas constitutivamente liberáveis e são apenas liberadas espontaneamente (constitutively releasing vesicles - CRVs) (Truckenbrodt and Rizzoli, 2014).

Estudos utilizando sinapses localizadas no sistema nervoso central como modelo experimental mostraram que durante a inibição da liberação espontânea de vesículas, ocorre desestruturação de sinapses em desenvolvimento como também de sinapses já

estabelecidas, porém não ocorre alteração das estruturas sinápticas quando a liberação desencadeada por estímulo é abolida (McKinney *et al.*, 1999; Sutton *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2014). Além, disso, na JNM colinérgica, tem-se verificado que o neurotransmissor ACh, ao se ligar nos receptores nicotínicos, regula a diferenciação pós-sináptica e coordena a maturação sináptica (Misgeld *et al.*, 2002; Witzemann, 2006; De Castro *et al.*, 2009). Esse papel regulatório pode ser evidenciado pela desestruturação das JNMs do músculo diafragma vista em modelos *knockout* para o gene da enzima ChAT e pela geração de camundongos VChT^{del/del} (Misgeld *et al.*, 2002; Brandon *et al.*, 2003; de Castro *et al.*, 2009). Diante desses fatos, pode ser que a redução quântica de ACh aos 12 meses nos VChT KD^{HOM} pode ter gerado um mecanismo compensatório de aumento na liberação espontânea de vesículas e assim a morfologia das JNM permaneceu inalterada como verificado aqui.

Adicionalmente ao aumento da exocitose espontânea nos camundongos VChT KD^{HOM} de 12 meses, foi observado que os mesmos apresentaram frequência de MEPP similar ao dos WT. Essa observação torna-se intrigante uma vez que os camundongos VChT KD^{HOM} de 3 meses apresentaram redução na frequência de MEPP (Prado *et al.*, 2006) e no entanto, ao contrário do que foi observado aqui para os animais VChT KD^{HOM} de 12 meses, não houve aumento do *photobleaching* nas terminações motoras dos animais VChT KD^{HOM} de 3 meses (Prado *et al.*, 2006). Portanto, esses dados novamente sugerem um possível aumento compensatório da liberação espontânea de VVs nas JNMs de camundongos VChT KD^{HOM} de 12 meses.

5.2. Função Neuromuscular e Morfologia dos músculos SOL e EDL de camundongos com redução a longo prazo da expressão de VAcHT

Este trabalho mostra as consequências da redução da proteína VAcHT a longo prazo e consequente diminuição da liberação de ACh, por período de 12 ou 24 meses, nos músculos SOL e EDL e na função motora global.

Trabalhos prévios demonstraram que o próprio processo de envelhecimento acarreta piora na função motora (Rither, 1978; Ingram *et al.*, 1981; Marshall, 1982, Lhotellier and Cohen-Salmon, 1989; Hilber and Caston, 2001; Glenn *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2010,) e os dados de comportamento motor aqui demonstrados corroboram essa observação uma vez que os camundongos VAcHT KD^{HOM} apresentaram pior desempenho nos testes de função motora quando comparados aos do mesmo genótipo na idade de 3 meses de idade (Figura 4 de Prado *et al.*, 2006). Estes dados indicam que um déficit colinérgico prolongado parece ocasionar perda mais acentuada da força muscular. Adicionalmente à piora do desempenho motor demonstrado pelos animais com redução prolongada da expressão de VAcHT, foi também detectado que eles apresentaram aumento no depósito de grânulos de glicogênio intramiofibrilar (no interior das miofibrilas) e intermiofibrilar (externamente a elas, no espaço intermiofibrilar) além de aumento na expressão das fibras do tipo I e redução de fibras do tipo IIA quando comparados aos WT. Esse dado torna-se interessante, uma vez que também foram observadas alterações mitocondriais e aumento de fibras do tipo I no músculo vasto lateral de atletas corredores que sofreram declínio repentino no desempenho em corridas e com isso, de tolerar altas cargas de treinamento (St Clair Gibson *et al.*, 1998). Uma das alterações mitocondriais encontradas foi o acúmulo de grânulos de glicogênio e gotas lipídicas em biópsias do músculo vasto lateral de quinze atletas de treinamento de resistência (endurance) que adquiriram intolerância ao treinamento quando comparados a atletas de resistência assintomáticos pareados para idade e tempo de treinamento de resistência (Grobler *et al.*, 2007). Desde então tem-se estabelecido uma associação entre defeitos no metabolismo de glicogênio e algumas doenças de depósito de glicogênio. Algumas dessas doenças são classificadas de acordo com alterações em enzimas específicas e podem causar acúmulo patológico de moléculas de glicogênio de estrutura anormal e depleção de glicogênio (Gazzerro *et al.*, 2013). Clinicamente, essas condições resultam em duas principais síndromes: intolerância ao exercício, com câibras e mioglobulinúria e fraqueza progressiva (DiMauro

and Spiegel, 2011). Embora não possamos associar o padrão de acúmulo de glicogênio encontrado em camundongos VACHT KD^{HOM} de 12 meses com essas doenças de armazenamento de glicogênio, podemos ao menos argumentar que a redução a longo prazo de expressão VACHT e o consequente déficit colinérgico está relacionado a fraqueza muscular progressiva que pode resultar na deposição aumentada de grânulos de glicogênio.

Uma possível hipótese para explicar uma das causas para esse acúmulo de grânulos de glicogênio no músculo SOL dos camundongos com redução de VACHT a longo prazo seria a alteração no metabolismo mitocondrial. Trabalho recente tem discutido o papel da ACh na modulação do ambiente redox do tecido cardíaco, suprimindo a geração espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o estresse oxidativo (Sun *et al.*, 2014). E sabe-se que a redução da produção de ROS contribui para a preservação da função mitocondrial em músculos que expressam maior quantidade de fibras do tipo I comparados aos que expressam maior quantidade de fibras do tipo II (Amara *et al.*, 2007). Surpreendentemente, foi observado que cardiomiócitos ventriculares isolados de camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram aumento nos níveis de ROS (Roy *et al.*, 2012). Com isso, não podemos excluir a possibilidade dos animais com redução a longo prazo da expressão de VACHT contribuir para aumentar a produção de ROS e consequentemente, induzir alterações no funcionamento mitocondrial causando aumento do acúmulo de glicogênio nos músculos de contração lenta, como demonstrado aqui no músculo SOL. No entanto, experimentos adicionais se fazem necessários para medir a produção de ROS nos animais WT e VACHT KD^{HOM} para que possamos confirmar essa hipótese.

Sabe-se que a ACh é necessária para desencadear a despolarização da membrana da célula muscular, a qual culmina com a ativação dos receptores de rianodina no RS com o concomitante extravasamento de Ca²⁺ para o interior celular. Contudo, esse receptor depende da ativação prévia pelo sensor de voltagem DHPR, e que por sua vez depende da despolarização da membrana por ser um sensor de voltagem (Lamb, 2000). Dessa forma, a fadiga que é encontrada nos VACHT KD^{HOM} pode ser devida à ativação insuficiente dos canais sensíveis a voltagem nos túbulos T (incapacidade de manter a despolarização da membrana por redução da quantidade de ACh), que não ativam de forma suficiente os canais de Ca²⁺ no RS e dessa forma, pouco Ca²⁺ fica disponível para sustentar a contração muscular prolongada. Casos de fadiga também podem ser

encontrados por alteração nesse mecanismo, como por exemplo, pela depleção de ATP. A molécula de ATP é necessária tanto para sua ligação com a cabeça pesada de miosina ou para a sua ligação com os RyR1 no RS. Como o ATP tem ação estimulatória sobre esses canais de Ca^{2+} do RS, a sua redução permite a atuação inibitória do Mg^{2+} sobre esses canais e a quantidade de Ca^{2+} no interior da célula muscular, necessário para realização das pontes cruzadas, fica insuficiente. Dessa forma, o mecanismo de sustentação da contração torna-se falho (Sham *et al.*; 1998). Esse mecanismo, como a redução na quantidade de moléculas de ATP pode ser interligado com os citados acima sobre disfunções mitocondriais e ROS. Com isso, extrapolamos que a fadiga tanto pode ser gerada pelo déficit de ACh que ocasiona contração insuficiente, como também pode ocorrer por mecanismos patológicos gerados por um possível disfunção mitocondrial, com redução de ATP e acúmulo de glicogênio.

Dado inédito também é mostrado nesse trabalho com relação à morfologia dos músculos esqueléticos SOL e EDL. Esses dois músculos foram selecionados para o estudo por exibirem diferentes tipos de populações de fibras musculares e papel funcional. O músculo SOL é descrito como um músculo principalmente postural, exibindo alto ciclo de trabalho, sendo composto principalmente por fibras musculares do tipo I (Roy *et al.*, 1991; Delp and Duan, 1996). O músculo EDL, por sua vez, é principalmente composto por fibras musculares do tipo II e é recrutado muito mais durante a deambulação que em atividades posturais, sendo um dos responsáveis pela movimentação do tornozelo (Dum and Kennedy, 1980; Delp and Duan, 1996).

Nossos dados demonstraram que os camundongos com redução a longo prazo na expressão de VACHT (12 ou 24 meses de idade) apresentaram alterações na CSA e perímetro dos músculos SOL e EDL quando comparados aos animais WT. No caso, as fibras do músculo SOL apresentaram-se com hipertrofia e as do EDL com atrofia nos VACHT KD^{HOM} . Fato interessante é que o músculo SOL é constituído por uma grande porcentagem de fibras do tipo I (Valdez *et al.*, 2012; Bloemberg and Quadrilatero, 2012; Augusto *et al.*, 2004; Deschenes *et al.*, 2013), as quais são demonstradas como sendo menos vulneráveis à sarcopenia que as fibras do tipo II (Coggan *et al.*, 1992; Deschenes *et al.*, 2013) que são encontrados nos músculos EDL que são menos resistentes à atrofia relacionada com o envelhecimento (Valdez *et al.*, 2012; Bloemberg and Quadrilatero, 2012; Augusto *et al.*, 2004; Deschenes *et al.*, 2013). Outra possível explicação seria a de que as fibras do tipo IIB tendem a ser maiores, as IIX, de tamanho

intermediário, e as IIA e I menores (Bloemberg and Quadrilatero, 2012). Baseado nesse dado, nós poderíamos nos perguntar se estaria ocorrendo uma troca no isotipo de MyHC nesses músculos dos camundongos VACHT KD^{HOM} de 12 e 24 meses, com o músculo SOL podendo ter maior expressão dos tipos rápidos e o EDL com maior expressão dos tipo lentos, uma vez que apresentaram aumento e redução na CSA e perímetro, respectivamente. No entanto, essa hipótese foi refutada após realizarmos os experimentos para verificar a composição muscular baseado nos isotipos da MyHC. No caso, nós observamos que o músculo SOL apresentou maior expressão das fibras do tipo I, mais lenta, que é descrita como sendo menores que os outros tipos e não houve diferença em relação ao músculo EDL.

Esses achados de aumento e redução da CSA e perímetro dos músculos SOL e EDL, respectivamente, poderiam se assemelhar aos achados encontrados em músculo diafragma de rato onde, após desnervação, observa-se atrofia das fibras do tipo IIX e IIB, hipertrofia das fibras do tipo I e ausência de alterações nas fibras do tipo IIA (Aravamudan *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudos demonstraram que pode ocorrer hipertrofia logo após desnervação (Miledi and Slater, 1969; Kernell, 2006), como por exemplo, visto no músculo SOL de ratos após a administração de toxina que induz degeneração das fibras nervosas (notexin). Foi observada, após a administração da toxina, a ocorrência de duas fases: uma de remodelamento e outra de crescimento e maturação das fibras musculares. Na primeira, ocorre a formação de pequenas fibras musculares que ocupam as zonas degeneradas após três dias da aplicação da toxina. Na segunda, as fibras recém-formadas sofrem um rápido aumento no seu tamanho e se tornam morfológicamente maduras. A toxina, por sua vez, ocasiona danos leves aos axônios de maneira que a reinervação se inicia em três dias e é concluída após sete dias e neste sétimo dia é vista a hipertrofia das fibras regeneradas (Grubb and Harris, 1986; Sesodia and Cullen, 1991). Baseado nesse estudo, pode ser hipotetizado que no músculo SOL nos camundongos VACHT KD^{HOM} a quantidade de ACh liberada necessária para levar ao desenvolvimento não seja suficiente, promovendo um aumento no tamanho das fibras musculares.

Camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam um aumento na resposta inflamatória quando infectados com parasitas (Ribeiro Machado *et al.*, 2012) com aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral α (TNF- α). De maneira surpreendente, esse aumento da resposta inflamatória também poderia

contribuir para a atrofia seletiva das fibras musculares rápidas observadas em algumas condições como na sepse e caquexia relacionados ao câncer. Dados da literatura demonstram que TNF- α ativa a via de NF κ B levando a uma maior expressão da proteína ubiquitina ligase específica do músculo (MuRF1) (Cai *et al.*, 2004) a qual ubiquitina a miosina e outras proteínas dos filamentos grossos (Cohen *et al.*, 2009) bem como a actina e outras proteínas dos filamentos finos (Kedar *et al.*, 2004; Polge *et al.*, 2011). De fato, camundongos transgênicos com ativação constante da via de NF- κ B, desenvolvem atrofia dos músculos de contração rápida, como EDL, mas não nos de contração lenta, como no SOL por eles avaliados. Os autores confirmam que a atrofia observada no EDL é desencadeada pela via de NF κ B que estimula o aumento de MuRF1, levando a degradação proteica via ubiquitina/ proteassoma. No entanto não se sabe os mecanismos pelos quais o SOL é poupado (Cai *et al.*, 2004). Fato interessante é que em lesões induzidas por queimaduras, o mRNA da ubiquitina é aumentado cerca de 10 vezes no músculo EDL e 4 vezes no SOL, indicando que, nem sempre, o mesmo mecanismo coordena de maneira semelhante as vias sinalizadoras nos músculos esqueléticos (FANG *et al.*, 1998). Com isso, nós especulamos que os camundongos com redução a longo prazo na expressão de VACHT podem possuir um estado inflamatório, com concomitante aumento da expressão de NF κ B que por sua vez provoca atrofia no músculo EDL (rápido), porém essa via pode não estar tão atuante no SOL (lento), podendo o mesmo ativar vias alternativas que induzam sua hipertrofia. No entanto, mais estudos são necessários para a comprovação das vias atuantes no processo de atrofia e hipertrofia musculares resultantes da redução da expressão de VACHT e consequente redução da disponibilidade de ACh na fenda sináptica.

Adicionalmente às alterações encontradas na CSA e perímetro dos músculos avaliados, nossos resultados também demonstraram que os camundongos com redução a longo prazo na expressão de VACHT apresentaram um aumento na proporção nas fibras lentas, do tipo I e uma redução nas fibra do tipo IIA, rápidas, comparados aos WT de 12 meses. Sabe-se que o músculo SOL de camundongos saudáveis apresentam uma alta porcentagem de fibras do tipo I e IIX e uma pequena porcentagem do tipo IIA. (Bloemberg and Quadrilatero, 2012). Trabalhos prévios têm demonstrado que a inatividade ocasionada por degeneração ou bloqueio de impulsos nervosos pela injeção de tetrodotoxina (TTX) induziu um aumento na CSA de fibras musculares do tipo I e uma redução das isoformas rápidas (IIA, IIX e IIB) quando comparados ao controle

(Aravamudan *et al.*, 1985; Zhan and Sieck, 1992; Myata *et al.*, 1995). Além disso, durante a desnervação ou inatividade induzida por tetrodotoxina, o músculo diafragma e gastrocnêmio medial apresentaram um aumento na área das fibras do tipo I e redução das fibras do tipo II (Zhan and Sieck, 1992; Myata *et al.*, 1995).

O processo de envelhecimento é acompanhado por um aumento nas fibras musculares do tipo I e redução nas isoformas rápidas (Holloszy *et al.*, 1991; Thompson, 1994; Larsson and Ansved, 1995). Em dado recente ainda não publicados do nosso grupo de pesquisa foi observado que os camundongos VChT KD^{HOM} de 3 meses de idade podem apresentar sinais prematuros de envelhecimento baseado no fato de que esses animais apresentam uma tendência ao aumento das fibras do tipo I e redução das fibras do tipo IIA, padrão similar ao que ocorre com os camundongos WT de 12 meses. Um aumento na expressão da isoforma do tipo I foi visto também em modelos de diabetes e em camundongos com distrofina deficiente (*mdx*) (Banks *et al.*, 2014). Esse modelo de distrofia, os camundongos apresentaram redução da isoforma do tipo IIA e aumento na isoforma I e a isoforma IIX não sofreu alterações, se comportando de modo similar ao observado em nosso modelo (Banks *et al.*, 2014).

Finalmente, para o melhor esclarecimento do papel da liberação de ACh na contribuição da hipertrofia no músculo SOL e atrofia no músculo EDL dos camundongos VChT KD^{HOM}, nós tratamos os camundongos WT e VChT KD^{HOM} de 6 meses de idade com piridostigmina para aumentar a disponibilidade de ACh na fenda sináptica. A partir daí, nós observamos que os parâmetros de comportamento motor e achados histológicos foram parcialmente revertidos nos camundongos VChT KD^{HOM} PIR. Portanto, uma vez que o fenótipo não foi totalmente alterado para a CSA e perímetro, parece que além das vias desencadeadas pela redução de ACh, outras vias podem atuar no processo e merecem ser melhor estudadas posteriormente.

CONCLUSÃO

6.0. CONCLUSÃO

Apesar da JNMs de camundongos com redução da expressão de VAcHT já ter sido estudada previamente (Prado *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2013), nós estudamos de forma inédita, os efeitos da redução por período muito maior (pelo menos 12 meses até 24 meses) sob as mesmas. Nossos resultados sugerem que uma liberação mínima de ACh garantida pela expressão reduzida do VAcHT, mesmo por período prolongado de tempo, é suficiente para manter o desenvolvimento e a biogênese normal das sinapses neuromusculares nos camundongos VAcHT KD^{HOM}, além de não afetar a função e mecânica pulmonar. No entanto, com relação às alterações morfológicas no plano ultraestrutural das JNMs dos animais VAcHT KD^{HOM}, foram encontradas que as VSs apresentaram as mesmas alterações já presenciadas aos 3 meses de idade (Rodrigues *et al.*, 2013) além de demonstrarem alterações de amplitude de MEPPs. A ausência de alteração nas JNMs e na função e mecânica pulmonares desses animais com déficit colinérgico a longo prazo pode estar associado a um aumento compensatório na liberação espontânea de vesículas sinápticas, mecanismo tido como essencial para a manutenção das mesmas.

Adicionalmente, nossos dados sugerem, que a redução a longo prazo na expressão do VAcHT, com concomitante redução na liberação de ACh por longo período de tempo, é capaz de alterar a função muscular geral, ocasionando fraqueza, fadiga, diminuição da locomoção e coordenação musculares. Além disso, essa deficiência na liberação colinérgica, também é capaz de modificar a morfologia dos músculos esqueléticos, por desencadear hipertrofia ou atrofia das fibras musculares juntamente com alteração na composição muscular, modificando a expressão das isoformas da MyHC nas fibras musculares e ocasionando aumento de glicogênio intra e intermiofibrilar. No entanto, essa alteração depende do músculo afetado, sendo diferente se um músculo é caracterizado por ser de contração lenta ou de contração rápida. A importância fundamental da ACh na neurotransmissão periférica, necessária para a manutenção da função muscular, morfologia dos músculos esqueléticos, foram confirmados pelo tratamento com o fármaco piridostigmina, onde os VAcHT KD^{HOM} Pir apresentaram reversão parcial dos parâmetros de comportamento motor e achados histológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABI, A. A.; TSIEN, R. W. Synaptic vesicle pools and dynamics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 8, a013680, 2012.

ALBERTINE, K. H.; WANG, L.; WATANABE, S.; MARATHE, G. K.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M. Temporal correlation of measurements of airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, v. 283, n.1, p.L219-L233, 2002.

AMADOR, F. J.; STATHOPOULOS, P. B.; ENOMOTO, M.; IKURA, M. Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 280, n. 21, p. 5456-70, 2013

AMARA, C. E.; SHANKLAND, E. G.; JUBRIAS, S. A.; MARCINEK, D. J.; KUSHMERICK, M. J.; CONLEY, K. E. Mild mitochondrial uncoupling impacts cellular aging in human muscles in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 1057-1062, 2007.

ANDREAE, L. C., AND BURRONE, J. The role of neuronal activity and transmitter release on synapse formation. **Current Opinion of Neurobiology**, v. 27C, p. 47–52, 2014.

ARANTES-COSTA, F. M.; LOPES, F. D.; TOLEDO, A. C.; MAGLIARELLI-FILHO, P. A.; MORIYA, H. T.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; MAUAD, T.; SALDIVA, P. H.; MARTINS, M. A. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 5, p.680-6, 2008.

ARAVAMUDAN, B.; MANTILLA, C. B., ZHAN, W. Z.; SIECK, G. C. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. **Journal Applied Physiology**, v. 100, n. 5, p. 1617-1622, 1985.

ARAVAMUDAN, B.; MANTILLA, C. B.; ZHAN, W. Z.; SIECK, G. C. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. **Journal of Applied Physiology** v. 100, p. 1617–22, 2006.

ASHCROFT, F. M. From molecule to malady. **Nature**, v. 440, 23 March 2006.

AUGUSTO, V.; PADOVANI, C. R.; CAMPOS, G. E. R. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. **Brazilian Journal Morphological Science**, v. 21, n. 2, p. 89-94, 2004.

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

BALICE, G. Age related changes in neuromuscular innervation. **Muscle Nerve Supplement**, v.5, p.S83-7, 1997.

BANKS, G. B.; COMBS, A. C.; ODOM, G. L.; BLOCH, R. J. Chamberlain JS Muscle structure influences utrophin expression in mdx mice. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 6, e1004431, 2014.

BARANY, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. **The Journal of General Physiology**, v.50, n.6, Jul, p.Suppl:197-218, 1967.

BÁREZ-LÓPEZ, S.; BOSCH-GARCÍA, D.; GÓMEZ-ANDRÉS, D.; PULIDO-VALDEOLIVAS, I.; MONTERO-PEDRAZUELA, A.; OBREGON, M. J.; GUADAÑO-FERRAZ, A. Abnormal Motor Phenotype at Adult Stages in Mice Lacking Type 2 Deiodinase. **PLoS ONE**. v. 9, n. 8: e103857. 2014.

BATES, J.; IRVIN, C.; BRUSASCO, V.; DRAZEN, J.; FREDBERG, J.; LORING, S.; EIDELMAN, D.; LUDWIG, M.; MACKLEM, P.; MARTIN, J.; MILIC-EMILI, J.; HANTOS, Z.; HYATT, R.; LAI-FOOK, S.; LEFF, A.; SOLWAY, J.; LUTCHEN,

K.; SUKI, B.; MITZNER, W.; PARÉ, P.; PRIDE, N.; SLY, P. The use and misuse of Penh in animal models of lung disease. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 31, n. 3, p. :373-4, 2004.

BEKKERS, J. M., RICHERSON, G. B., STEVENS, C. F. Origin of Variability in Quantal Size in Cultured Hippocampal-Neurons and Hippocampal Slices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 5359-5362, 1990.

BETZ, W. J., MAO, F., BEWICK, G. S. Activity dependent fluorescent staining and 508 destaining of living vertebrate motor nerve terminals. **Journal of Neuroscience**, v.12, p. 363–375, 1992.

BLOEMBERG, D.; QUADRILATERO, J. Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor immunofluorescence Analysis. **PLoS One**, v.7, p.1-11, 2012.

BRANDON, E. P.; LIN, W.; D'AMOUR, K. A.; PIZZO, D. P.; DOMINGUEZ, B.; SUGIURA, Y.; THODE, S.; KO, C. P.; THAL, L. J.; GAGE, F. H.; LEE, K. F. Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase deficient mice. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 539–549, 2003.

BRAVO, D.; PARSONS, S. M.. Microscopic kinetics and structure-function analysis in the vesicular acetylcholine transporter. **Neurochemistry International**, v.41, n.5, Nov, p.285-9, 2002.

CAI, D.; FRANTZ, J. D.; TAWA, N. E. Jr.; MELENDEZ, PA.; OH, B. C.; LIDOV, H. G.; HASSELGREN, P. O.; FRONTERA, W. R.; LEE, J.; GLASS, D. J.; SHOELSON, S. E. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell**, v. 119, p. 285–98, 2004.

CALVO, S.; VENEPALLY, P.; CHENG, J.; BUONANNO, A. Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 1, p. 515-25, 1999.

CAMPOS, G. E.; LUECKE, T. J.; WENDELN, H. K.; TOMA, K.; HAGERMAN, F. C.; MURRAY, T. F.; Murray, T. F.; Ragg, K. E.; Ratamess, N. A.; Kraemer, W. J.; Staron, R. S. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **European Journal of Applied Physiology**, v.88, n.1-2, Nov, p.50-60, 2002.

CARTER, E. E.; THOMAS, M. M.; MURYNKA, T.; ROWAN, S. L.; WRIGHT, K. J.; HUBA, E.; HEPPLER, R. T. Slow twitch soleus muscle is not protected from sarcopenia in senescent rats. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 9, p.662-70, 2010.

CECCARELLI, B., HURLBUT W. P, MAURO A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. **Journal of Cell Biology**, v.57, n.2, May, p.499-524, 1973.

CHAI, R. J.; VUKOVIC J.; DUNLOP S.; GROUNDS M.D.; SHAVLAKADZE T. Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. **PLoS One**, v.6, n.12, e28090, 2011.

COGGAN, A. R; SPINA, R. J.; KING, D. S.; ROGERS, M. A.; BROWN, M.; NEMETH, P. M.; HOLLOSZY, J. O. Histochemical and enzymatic comparison of the gastrocnemius muscle of young and elderly men and women. **Journal of Gerontology**, v. 47, p. 71-6, 1992.

COHEN, S.; BRAULT, J. J.; GYGI, S. P.; Glass, D. J.; Valenzuela, D. M.; Gartner, C.; Latres, E.; Goldberg, A. L. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. **The Journal of Cell Biology**, v. 185, p.1083–95, 2009.

COUSIN, M. A.; NICHOLLS, D. G. Synaptic vesicle recycling in cultured cerebellar granule cells: role of vesicular acidification and refilling. **Journal of Neurochemistry**, v.69, n.5, p.1927-35, 1997.

COVAULT, J.; SANES J. R.. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. **The Journal Cell Biology**, v.102, n.3, Mar, p.716-30, 1986.

DAY, N. C.; WOOD, S. J.; INCE, P. G.; VOLSEN, S. G.; SMITH, W.; SLATER, C. R.; SHAW, P. J. Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. **Journal of Neuroscience**, v.17, n.16, Aug 15, p.6226-35, 1997.

DE CASTRO, B. M.; DE JAEGER, X.; MARTINS-SILVA, C.; LIMA, R. D.; AMARAL, E.; MENEZES, C.; LIMA, P.; NEVES, C. M.; 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.; PRADO, M. A.; PRADO, V. F. The Vesicular Acetylcholine Transporter is Required for Neuromuscular Development and Function. **Molecular and Cellular Biology**, v.29, n.19, p.5238–5250, 2009.

DEL CASTILLO, J.; ANDKATZ, B. Quantal components of the end-plate potential. **Journal of Physiology**, v. 124, p. 560–573, 1954.

DELP, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **Journal Applied Physiology**, 80: 261-70, 1996.

DESCHENES, M. R.; MARESH, C. M.; CRIVELLO, J. F.; ARMSTRONG, L. E.; KRAEMER, W. J.; COVAULT, J. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. **Journal of Neurocytology**, v. 22, p. 603–615, 1993.

DESCHENES, M. R.; ROBY M. A.; GLASS, E. K. Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. **Neuroscience**, v.190, Sep 8, p.56-66, 2010.

DESCHENES, M. R.; ROBY, M. A.; GLASS, E. K. Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. **Neuroscience**, 190: 56-66, 2011.

DESCHENES, M. R.; SHERMAN, E. G.; GLASS, E. K. The Effects of Pre-habilitative Conditioning on Unloading induced Adaptations in Young and Aged Neuromuscular Systems. **Experimental Gerontology**, v. 47, n. 9, p. 687-94, 2012.

DESCHENES, M. R.; GAERTNER, J. R.; O'REILLY, S. The effects of sarcopenia on muscles with different recruitment patterns and myofiber profiles. **Current Aging Sciences**, v. 6, n. 3, p. 266-72, 2013.

DIMAURO, S.; SPIEGEL, R. Progress and problems in muscle glycogenoses. **Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases.**, v. 30, n. 2, p. 96-102, 2011.

DUM, R. P.; KENNEDY, T. T. Physiological and histochemical characteristics of motor units in cat tibialis anterior and extensor digitorum longus muscles. **Journal of Neurophysiology**, v. 43, p. 1615-30, 1980.

ELLIOTT, A.; OFFER, G. Shape and flexibility of the myosin molecule. **Journal of Molecular Biology**, v.123, n.4, Aug 25, p.505-19, 1978.

ENGEL, A. G.; OHNO, K.; SINE, S. M. Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, p. 339-352, 2003.

FANG, C. H.; LI, B. G.; TIAO, G.; WANG, J. J.; FISCHER, J. E.; HASSELGREN, P. O. The molecular regulation of protein breakdown following burn injury

is different in fast- and slow-twitch skeletal muscle. **International Journal of Molecular Medicine**, v.1, n.1, p. 163-9, 1998.

FATT, P.; KATZ, B. Some observations on biological noise. **Nature**, v. 166, p. 597–598, 1950.

FATT, P.; KATZ, B. The electric activity of the motor end-plate. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character**. v. 40, n. 899, p. 183-6, 1952a.

FATT, P.; KATZ, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. **Journal of Physiology**, v. 117, p. 109–128, 1952b.

FERREIRA-VIEIRA, T. H.; BASTOS, C. P.; PEREIRA, G. S.; MOREIRA, F. A.; MASSENSINI, A. R. A Role for the Endocannabinoid System in Exercise-Induced Spatial Memory Enhancement in Mice. **Hippocampus**, v. 24, p.79–88, 2014.

FLANDRE, T. D.; LEROY, P. L.; DESMECHT, D. J. M. Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmographic respiratory function values in healthy mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 3, p. 1129-1136, 2003.

FLUCHER, B. E.; DANIELS, M. P. Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. **Neuron**, v.3, n.2, Aug, p.163-75, 1989.

FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. **Review Physiology Biochemistry Pharmacology**, v. 146, p. 159-216, 2003.

FRIES, J. M. Critical rehabilitation of the patient with spinal cord injury. **Critical Care Nursing**, v. 28, p. 179-187, 2005.

GAFFIELD, M. A.; BETZ, W. J. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.2916-2921, 2006.

GARNER, C. C.; KINDLER, S.; GUNDELFINGER, E. D. Molecular determinants of presynaptic active zones. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, p. 321-327, 2000.

GANDHI, S. P.; STEVENS, C. F.. Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. **Nature**, v.423, n.6940, Jun 5, p.607-13, 2003.

GAZZERRO, E.; ANDREU, A. L.; BRUNO, C. Neuromuscular disorders of glycogen metabolism. **Current Neurology Neuroscience Reports**, v. 13, n. 3, p. 333, 2013.

GLENN, C. F.; CHOW, D. K.; DAVID, L.; COOKE, C. A.; GAMI, M. S.; ISER, W. B.; HANSELMAN, K. B.; GOLDBERG, I. G; WOLKOW, C. A. Behavioral deficits during early stages of aging in *Caenorhabditis elegans* result from locomotory deficits possibly linked to muscle frailty. **Journal of Gerontology**, v. 59, n. 12, p. 1251-1260, 2004.

GOLDSTEIN, J. D.; REID, L. M. Pulmonary hypoplasia resulting from phrenic nerve agenesis and diaphragmatic amyoplasia. **The Journal of Pediatrics**, v. 97, n. 2, p.282-287, 1980.

GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; TORENSMA R.; VON DEN HOFF, J. W. Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem Cells and Development**, v.16, p.857-868, 2007.

GROBLER, L. A.; COLLINS, M.; LAMBERT, M. I.; SINCLAIR-SMITH, C.; DERMAN, W.; ST CLAIR GIBSON, A.; NOAKES, T. D. Skeletal muscle pathology in endurance athletes with acquired training intolerance. **British Journal Sports of Medicine**, v. 38, n. 6, p. 697-703, 2004.

GRUBB, B. D.; HARRIS, J. B. The development of neuromuscular junctions on rat regenerating skeletal muscle fibres. **Journal of Physiology (London)**, v. 380, p. 65, 1986.

HAMELMANN, E.; SCHWARZE, J.; TAKEDA, K.; OSHIBA, A.; LARSEN, G. L., IRVIN, C. G.; GELFAND, E. W. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 156, p.766–75, 1997

HAMMOND, C. **Cellular and Molecular Neurophysiology**. Academic Press. 3 ed. 2008. 416 p.

HANTOS, Z.; DARÓCZY, B.; SUKI, B.; NAGY, S.; FREDBERG J. J. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 72, n. 1, p. 168-78, 1992.

HAWKE, T. J, GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, n. 2, p. 534-51, 2001.

HEUSER, J.; MILEDI, R. Effect of lanthanum ions on function and structure of frog neuromuscular junctions. **Proceedings of the Royal Society of London**, 179, 247–260, 1971.

HEUSER, J. E.; REESE, T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. **The Journal of Cell Biology**, v.57, n. 2, p.315-44, 1973.

HILBER, P.; CASTON, J. Motor skills and motor learning in Lurcher mutant mice during aging. **Neuroscience**, v. 102, n. 3, p. 615-23, 2001.

HOCH, W.; MCCONVILLE, J.; HELMS, S.; NEWSOM-DAVIS, J.; MELMS, A.; VINCENT, A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with

myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. **Nature Medicine**, v. 7, p.365-368, 2001.

HOLLOSZY, J. O.; CHEN, M.; CARTEE, G. D.; YOUNG, J. C. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. **Mechanisms of Ageing and Development.**, v. 60, n. 2, p. 199- 213, 1991.

HOUSTON, J. G.; ANGUS, R.M.; COWAN, M. D.; MCMILLAN, N. C.; THOMSON, N.C.Ultrasound assessment of normal hemidiaphragmatic movement relation to inspiratory volume. **Thorax**, v. 49, n. 5, p.500-503, 1994.

HOUSTON, J. G.; MORRIS, A. D.; GROSSET, D. G.; LEES, K. R.; MCMILLAN, N.; BONE, I. Ultrasonic evaluation of movement of the diaphragm after acute cerebral infarction. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v.58, n. 6, p.738-741, 1995.

HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v. 164, p. 1356-1366, 1969.

INGRAM D.K., LONDON E.D., REYNOLDS M.A., WALLER S.B., GOODRICK C.L. Differential effects of age on motor performance in two mouse strains. **Neurobiology of Aging**. v. 2, n. 3, p. 221-7. 1981.

ISA, T.; KINOSHITA, M. AND NISHIMURA Y. Role of Direct vs. Indirect Pathways from the Motor Cortex to Spinal Motoneurons in the Control of Hand Dexterity. **Frontiers in Neurology**. v. 4, p. 191, 2013.

ISHII, M.; YAMAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, H.; HANAOKA, Y.; OUCHI, Y. Airspace enlargement with airway cell apoptosis in klotho mice: a model of aging lung. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1289-98, 2008.

JAHROMI, B. S.; ROBITAILLE, R.; CHARLTON, M. P. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. **Neuron**, v. 8, n. 6, p. 1069-77, 1992.

KADI, F.; SCHJERLING, P.; ANDERSEN, L. L.; CHARIFI, N.; MADSEN, J. L.; CHRISTENSEN, L. R.; ANDERSEN, J. L. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. **Journal of Physiology**, v. 558, n. 3, p.1005-12, 2004.

KAESER, P. S.; REGEHR, W. G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. **Annuals Review Physiology**, v. 76, p. 333–363, 2014.

KATZ, B. Nerve, Muscle and Synapse. **McGraw-Hill Book Company**. p.193, 1966.

KEDAR, V.; MCDONOUGH, H.; ARYA, R.; , LI, H. H.; ROCKMAN, H. A.; PATTERSON, C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. **Proceedings National Academy Science U S A**, v. 101, p.18135–40, 2004.

KERNELL, D. The Motoneurone and its Muscle Fibres. **Oxford University Press**. 341p. 2006.

KOCIS, K. C; RADELL, P. J.; STERNBERGER, W. I.; BENSON, J. E.; TRAYSTMAN, R. J.; NICHOLS, D.G. Ultrasound evaluation of piglet diaphragm function before and after fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v.83, n. 5, p.1654-1659, 1997.

KREJCI, E.; THOMINE, S.; BOSCHETTI, N.; LEGAY, C.; SKETELJ, J.; MASSOULIÉ J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. **Journal of Biology Chemistry**, v.272, n.36, Sep 5, p.22840-7, 1997.

KUMMER, T. T.; MISGELD, T.; SANES, J. R. Assembly of the Postsynaptic Membrane at the Neuromuscular Junction: Paradigm Lost. **Current Opinion in Neurobiology**, v.16, n.1, p.74-82, 2006.

LAMB, G. D. Excitation–contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 216–224, 2000.

LARSSON, L.; ANSVED, T. Effects of ageing on the motor unit. **Progress in Neurobiology**, v. 45, n. 5, p. 397-458, 1995.

LAZARONI, T. L.; RASLAN, A. C.; FONTES, W. R.; DE OLIVEIRA, M. L.; BADER, M.; ALENINA, N.; MORAES, M.F.; DOS SANTOS, R.A.; PEREIRA, G.S. Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. **Neurobiology of Learn Memory**, v. 97, p. 113–123, 2012.

LESNIEWSKI, L.A.; MILLER, T.A.; ARMSTRONG, R.B. Mechanisms of force loss in diabetic mouse skeletal muscle. **Muscle Nerve**, v. 28, n. 4, p. 493-500, 2003.

LIMA R.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A.; KUSHMERICK, C. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. **Journal Neurochemistry**, v. 113, n. 4, p. 943-51, 2010.

LHOTELLIER, L.; COHEN-SALMON, C. Genetics and senescence. I. Age-related changes in activity and exploration in three inbred strains of mice. **Physiology Behavioral**, v. 45, n. 3, p. 491-3, 1989.

LIN, W.; BURGESS, R. W.; DOMINGUEZ, B.; PFAFF, S. L.; SANES, J. R.; LEE, K. F. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1057-64, 2001

LOWEY, S.; SLAYTER, H. S.; WEEDS, A.G.; BAKER, H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. **The Journal of Molecular Biology**, v.42, n.1, May 28, p.1-29, 1969.

MANTILLA, C. B.; SIECK, G. C. Key aspects of phrenic motoneuron and diaphragm muscle development during the perinatal period. **Journal of Applied Physiology**, v.104, p.1818–1827, 2008.

MARSHALL, J. F. Sensorimotor disturbances in the aging rodent. **Journal of Gerontology**, v. 37, p. 548-54, 1982.

MARTIN, A. R. Amplification of neuromuscular transmission by postjunctional folds. **Proceedings of Biological Sciences**, v. 258, p. 321–326, 1994.

MARTIN, P. T.; KAUFMAN, S. J.; KRAMER, R. H.; SANES, J. R. Synaptic integrins in developing, adult, and mutant muscle: selective association of alpha1, alpha7A, and alpha7B integrins with the neuromuscular junction. **Developmental Biology**, v.174, n.1, Feb 25, p.125-39, 1996.

MAYCOX, P. R.; HELL, J. W.; JAHN, R. Amino acid and neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. **Trends in Neurosciences**, v. 13, p. 83-87, 1990.

MCCONVILLE, J.; VINCENT, A. Diseases of the neuromuscular junction. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 296-301, 2002.

MCKINNEY, R. A.; CAPOGNA, M.; DÜRR, R.; GÄHWILER, B. H.; AND THOMPSON, S. M. Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. **Natural Neurosciences**, v. 2, p. 44–49, 1999.

MILEDI, R., SLATER, C. R. Electron-microscopic structure of denervated skeletal muscle. **Proceedings of the Royal Society London**, v. 174, p. 253-269, 1969.

MIRANDA, C. J. C. P. Avaliação da função e da histopatologia pulmonar em modelo experimental de inflamação pulmonar alérgica crônica: efeitos da redução da função colinérgica em camundongos geneticamente modificados. 2012.118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

MISGELD, T.; BURGESS, R. W.; LEWIS, R. M.; CUNNINGHAM, J. M.; LICHTMAN, J. W.; SANES, J. R. Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. **Neuron**, v. 36, p. 635–648, 2002.

MOSCOSO, L. M.; CHU, G. C.; GAUTAM, M.; NOAKES, P. G., MERLIE, J. P.; SANES, J. R. Synapse-associated expression of an acetylcholine receptor-inducing protein, ARIA/heregulin, and its putative receptors, ErbB2 and ErbB3, in developing mammalian muscle. **Developmental Biology**, v.172, n.1, Nov, p.158-69, 1995.

MURTHY, V. N.; DE CAMILLI P. Cell biology of the presynaptic terminal. **Annual Review of Neuroscience**, v.26, p.701-28, 2003.

MYATA, H.; ZHAN, W. H.; PRAKASH, Y. S.; SIECK, G. C. Myoneural interactions affect diaphragm muscle adaptations to inactivity. **Journal of Applied Physiology**, v. 79: p. 1640-1649, 1995.

NAGUIB, M.; FLOOD, P.; McARDLE, J. J.; BRENNER, H. R. Advances in Neurobiology of the Neuromuscular Junction – Implications for the Anesthesiologist. **Anesthesiology**, v. 96, p. 202-231, 2002.

NAS, K.; YAZMALAR, L.; S.; AYDIN, A.; ÖNEŞ, K. Rehabilitation of spinal cord injuries. **World Journal of Orthopedics**, v. 6, n. 1, p 8-16, 2015.

NGUYEN, M. L.; COX, G. D.; PARSONS, S. M. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. **Biochemistry**, v.37, n.38, Sep 22, p.13400-10, 1998.

NICHOLLS, D. G. **Proteins, Transmitters and Synapses**. Oxford: Blackwell Science, 1994, 253 p.

NISHIDA, N., TAGUCHI, A., MOTOYOSHI, K.; HYODO, M.; GYO, K.; DESAKI, J. Age-related changes in rat intrinsic laryngeal muscles: analysis of muscle fibers, muscle fiber proteins, and subneural apparatuses. **European Archives of Oto-rhino-Laryngology**, v. 270, n. 3, p 975-84, 2013.

NISHIMUNE, H.; VALDEZ, G.; JARAD, G.; MOULSON, C. L.; MÜLLER, U.; MINER, J. H.; SANES, J. R. Laminins promote postsynaptic maturation by an autocrine mechanism at the neuromuscular junction. **Journal of Cell Biology**, v. 182, n. 6, p. 1201-15, Sep 22; 2008.

OLSON, E.N.; KLEIN, W .H. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. **Genes and Developmental**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 1994.

PARSONS, R. L.; CALUPCA, M. A.; MERRIAM, L. A.; PRIOR, C. Empty synaptic vesicles recycle and undergo exocytosis at vesamicol-treated motor nerve terminals. **Journal of Neurophysiology**, v.81, n.6, p.2696-2700, 1999.

PAULUHN, J. Comparative Analysis of Pulmonary Irritation by Measurements of Penh and Protein in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Brown Norway Rats and Wistar Rats Exposed to Irritant Aerosols. **Inhalation Toxicology**, v. 16, n. 3, p.159-175, 2004.

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy Research and Technique**, v.50, n.6, Sep 15, p.500-9, 2000.

POLGE, C.; HENG, A. E.; JARZAGUET, M.; VENTADOUR, S.; CLAUSTRE, A.; COMBARET, L.; BÉCHET, D.; MATONDO, M.; UTTENWEILER-JOSEPH, S.; MONSARRAT, B.; ATTAIX, D.; TAILLANDIER, D. Musclectin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase

MuRF1. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, p. 3790–802, 2011.

PRADO, M. A.; REIS, R. A.; PRADO, V. F.; DE MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; DE MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v.41, n.5, Nov, p.291-9, 2002.

PRADO, V. F.; MARTINS-SILVA, C.; DE CASTRO, B. M.; LIMA, R. F.; BARROS, D. M.; AMARAL, E. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron**, v.51, n.5, Sep 7, p. 601-12, 2006.

PRADO, V. F.; ROY, A.; KOLISNYK, B.; GROS, R.; PRADO M. A. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. **Biochemistry Journal**, v. 450, n. 2, p 265-74, 2013.

PYLE, J. L.; KAVALALI, E. T.; PIEDRAS-RENTERÍA, E. S.; TSIEN, R. W. Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. **Neuron**, v.28, n.1, Oct, p.221-31, 2000.

RAMIREZ, D. M. O.; KAVALALI, E. T. Differential regulation of spontaneous and evoked neurotransmitter release at central synapses. **Current Opinion Neurobiology**, v. 21, p. 275–282, 2011.

RANDO, T. A. Stem cells, ageing and the quest for immortality. **Nature**, v. 441, n. 29, 2006.

RAUE, U.; SLIVKA, D.; JEMIOLO, B.; HOLLON, C.; TRAPPE, S. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 1, p. 53-9, 2006.

REID, B.; SLATER, C. R.; BEWICK, G. S. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. **Journal of Neuroscience**, v.19, p.2511-2521, 1999.

RIBEIRO, F. M.; BLACK S. A.; PRADO, V. F.; RYLETT, R. J.; FERGUSON, S. S.; PRADO, M. A. The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. **Journal Neurochemistry**, v.97, n.1, Apr, p.1-12, 2006.

RIBEIRO MACHADO, M. P.; ROCHA, A. M.; OLIVEIRA, L. F.; CASTELLANO, L. R., SILVA, M. V.; MACHADO, J. R.; NASCENTES, G. A.; PAIVA, L. H.; SAVINO, W.; JUNIOR, V. R.; BRUM, P. C.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A.; SILVA, E. L.; MONTANO, N.; RAMIREZ, L. E.; DIAS DA SILVA, V. J. Autonomic nervous system modulation affects the inflammatory immune response in mice with acute Chagas disease. **Experimental. Physiology**, v. 97, p. 1186–1202, 2012.

RICHARDS, D. A.; GUATIMOSIM, C.; RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic vesicle pools at the frog neuromuscular junction. **Neuron**, v.39, n.3, Jul 31, p. 529-41, 2003.

RICHMAN, D. P.; AGIUS, M. A. Treatment principles in the management of autoimmune myasthenia gravis. **Myasthenia Gravis and Related Disorders**, v. 998, p. 457-472, 2003.

RITTER, B. Effect of chronic restraint on open field activity of aging C57BL/6N mice. **Experimental Aging Research**, v. 4, n. 2, p. 87-95, 1978.

RIZZOLI, S. O. Synaptic vesicle recycling: steps and principles. **The EMBO Journal**, v. 33, p. 788–822, 2014.

ROBITAILLE, R.; GARCIA, M. L.; KACZOROWSKI, G.J.; CHARLTON, M. P. Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. **Neuron**, v.11, n.4, Oct, p.645-55, 1993.

RODRIGUES, H. A.; FONSECA, M.D.C.; CAMARGO, W. L.; LIMA, P. M. A.; MARTINELLI, P. M.; 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**, v. 8, n. 11, e78342, 2013.

ROSENMUND, C.; STEVENS, C. F. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. **Neuron**, v. 16, p. 1197–1207, 1996.

ROY, A.; LARA, A.; GUIMARAE, S. D.; PIRES, R.; GOMES, E. R.; CARTER, D. E.; GOMEZ, M. V.; GUATIMOSIM, S.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A.; GROS, R. An analysis of the myocardial transcriptome in a mouse model of cardiac dysfunction with decreased cholinergic neurotransmission. **PloS one**, v. 7, n. 6, e39997, 2012.

ROY, R. R.; HUTCHISON, D. L.; PIEROTTI, D. J.; HODGSON, J. A.; EDGERTON, V. R. EMG patterns of rat ankle extensors and flexors during treadmill locomotion and swimming. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, p.2522-9, 1991.

SALPETER, M. M.; LORING R. H. Nicotinic acetylcholine receptors in vertebrate muscle: properties, distribution and neural control. **Progress in neurobiology**, v.25, n.4, p.297-325, 1985.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annual Review of Neuroscience**, v.22, p.389-442, 1999.

SANGO, K.; MCDONALD, M. P.; CRAWLEY, J. N.; MACK, M. L.; TIFFT, C. J.; SKOP, E.; STARR, C. M.; HOFFMANN, A.; SANDHOFF, K.; SUZUKI, K.; PROIA, R. L. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. **Nature Genetics**, v.14, n.3, Nov, p.348-52, 1996.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiology Review**, v. 76, n. 2, p. 371-423, 1996.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiology Review**, v.91, n.4, Oct, p.1447-531, 2011.

SESODIA, S.; CUHEN M. J. The effect of denervation on the morphology of regenerating rat soleus muscles. **Acta Neuropathologica**, v.82, n. 21, p. 32, 1991.

SCOTT, L. J.; BACOU, F.; SANES, J. R. A synapse-specific carbohydrate at the neuromuscular junction: association with both acetylcholinesterase and a glycolipid. **Journal of Neuroscience**, v.8, n.3, Mar, p.932-44, 1988.

SEALE, P., RUDNICKI, M. A. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. **Developmental Biology**, v. 218, n. 2, p. 115-24, 2000.

SHAM, J. S. K.; SONG, L. S.; CHEN, Y.; DENG, L. H.; STERN, M. D.; LAKATTA, E. G.; CHENG, H. Termination of Ca²⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 096–101, 1998.

SHEARD, P. W.; ANDERSON, R. D. Age-related loss of muscle fibres is highly variable amongst mouse skeletal muscles. **Biogerontology**, v. 13, n. 2, p. 157-67, 2012.

SHI, L.; FU, A. K.; IP, N. Y. Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. **Trends in Neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 441-53, 2012

SHIGEMOTO, K.; KUBO, S.; MORI, S.; YAMADA, S.; AKIYOSHI, T.; MIYAZAKI, T. Muscle weakness and neuromuscular junctions in aging and disease. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 10 p. 137-47, 2010.

SLATER, C. R. Postnatal maturation of nerve–muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse. **Developmental Biology**, v. 94, p. 11–22, 1982.

SOUSA, N.; ALMEIDA, O. F.; WOTJAK, C. T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. **Genes Brain Behavioral**, v. 5, n. 5–24, 2006.

ST CLAIR GIBSON, A.; LAMBERT, M. I.; WESTON, A. R.; MYBURGH, K. H.; EMMS, M. KIRBY P, MARINAKI, A. M.; OWEN, P. E.; DERMAN, W.; NOAKES, T. D. Exercise-induced mitochondrial dysfunction in an elite athlete. **Clinical Journal of Sport Medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine**, v. 8, n. 1, p. 52-55, 1998.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.509-47. 2004.

SUDHOF, T. C.; RIZO, J. Synaptic vesicle exocytosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2011.

SUDHOF, T. C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 675-90, 2013.

SUGIURA, Y.; WOPPMANN, A.; MILJANICH, G. P.; KO, C. P. A novel omega-conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. **Journal of Neurocytology**, v.24, n.1, Jan, p.15-27, 1995.

SUTTON, M. A.; ITO, H. T.; CRESSY, P.; KEMPF, C.; WOO, J. C.; AND SCHUMAN, E. M. Miniature neurotransmission stabilizes synaptic function via tonic suppression of local dendritic protein synthesis. **Cell**, v. 125, p. 785–799, 2006.

TALMADGE, R. J.; ROY R. R. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, p. 2337-2340, 1993.

TODD, K. J.; AULD, D. S.; ROBITAILLE, R. Neurotrophins modulate neuron–glia interactions at a vertebrate synapse. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 1287–1296, 2007.

THOMPSON, L. V. Effects of age and training on skeletal muscle physiology and performance. **Physical Therapy**, v. 74, n. 1, p. 71-81, 1994.

TRUCKENBRODT, S.; RIZZOLI, S. O. Spontaneous vesicle recycling in the synaptic bouton. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 409, 2014.

VALDEZ, G.; TAPIA, J. C.; KANG H.; CLEMENSON G. D. JR., GAGE, F. H.; LICHTMAN, J. W. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.33, Aug 17, p.14863-8, 2010.

VALDEZ, G.; TAPIA, J. C.; LICHTMAN, J. W.; FOX, M. A.; SANES, J. R. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. **PLoS One**, v.7, n.4, e34640, 2012.

VALENZUELA, D. M.; STITT, T. N.; DISTEFANO, P. S.; ROJAS, E.; MATTSSON, K.; COMPTON, D. L. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. **Neuron**, v.15, n. 3, p.573-84, 1995.

VAN DER KLOOT, W. Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. **Progress in Neurobiology**, v. 71, n. 4, p. 269-303, 2003.

VIANNA, M. R.; ALONSO, M.; VIOLA, H.; QUEVEDO, J.; DE PARIS, F.; FURMAN, M.; DE STEIN, M. L.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in therat. **Learn and Memory**, v. 7, n. 5, p.333-40, 2000.

VINCENT, A.; LEITE, M. I. Neuromuscular junction autoimmune disease: muscle specific kinase antibodies and treatments for myasthenia gravis. **Current Opinion in Neurology**, v. 18, p. 519-525, 2005.

WEEDS, A. G.; LOWEY, S. Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. **American journal of molecular biology**, v.61, n.3, Nov 14, p.701-25, 1971.

WILLOUGHBY, D. S.; NELSON, M. J. Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 34, n. 8, p.1262-9, 2002.

WITZEMANN, V. Development of the Neuromuscular Junction. **Cell and Tissue Research**, v.326, p.263–271, 2006.

WOOD, S. J.; SLATER, C. R. The contribution of postsynaptic folds to the safety factor for neuromuscular transmission in rat fast- and slow-twitch muscles. **Physiology journal**, v.500 (Pt 1), Apr 1, p.165-76, 1997.

WOOD, S. J.; SLATER, C. R. Safety factor at the neuromuscular junction. **Progress in Neurobiology**, v. 64, p. 393-429, 2001.

XU, Z.; SHAN, Y. Anti-fatigue effects of polysaccharides extracted from *Portulaca oleracea* L. in mice. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, 1 v. 51, n. 4, p.321-325. 2014.

YAMAGUTI, W. P. S.; PAULIN, E.; SALGE, J. M.; CHAMMAS, M. C.; CUKIER, A.; CARVALHO, C. R. F. Disfunção diafragmática e mortalidade em pacientes portadores de DPOC. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p.1174-1181, 2009

YEE, V. C.; PESTRONK A.; ALDERSON K.; YUAN C. M. Regional heterogeneity in the distal motor axon: three zones with distinctive intrinsic components. **Journal of neurocytology**, v.17, n.5, Oct, p.649-56, 1988.

ZEFIROV, A. L.; ABDRAKHMANOV, M. M.; MUKHAMEDYAROV, M. A.; AND GRIGORYEV, P. N. The role of extracellular calcium in exo- and endocytosis of synaptic vesicles at the frog motor nerve terminals. **Neuroscience**, v. 143, p. 905–910, 2006.

ZHAN, W. Z.; SIECK, G. C. Adaptations of diaphragm and medial gastrocnemius muscles to inactivity. **Journal of applied physiology**, v. 72, n. 4, p. 1445-1453, 1992.

ZHOU, Q.; PETERSEN, C. C.; NICOLL, R. A. Effects of reduced vesicular filling on synaptic transmission in rat hippocampal neurons. **The Journal of Physiology**, v.525, n.1, p.195-206, 2000.

ZHU, X.; LAI, C.; THOMAS, S.; BURDEN, S. J. Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. **Embo Journal**, v.14, n.23, Dec 1, p.5842-8, 1995.

ZUO, Y.; BISHOP, D. Glial imaging during synapse remodeling at the neuromuscular junction. **Neuron Glia Biology**, v. 4, n. 4, p. 319-26, 2008.

ANEXOS