

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Matheus Proença Simão Magalhães Gomes

**Análise histológica e imuno-histoquímica de músculos de contração rápida e lenta
em camundongos com déficit colinérgico**

Belo Horizonte
Fevereiro de 2014

Matheus Proença Simão Magalhães Gomes

**Análise histológica e imuno-histoquímica de músculos de contração rápida e lenta
em camundongos com déficit colinérgico**

Dissertação 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 Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientação: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

Co-orientação: Profa. Dra. Patrícia Massara Martinelli

Belo Horizonte

Fevereiro de 2014

APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios: Laboratório de Biologia da Neurotransmissão (LBN) e no Laboratório de Neurobiologia (Profa. Conceição Machado) ambos localizados no Departamento de Morfologia. Contamos ainda com o apoio do Laboratório de Neuro-imuno Patologia experimental, do Departamento de Patologia, coordenado pela Profa. Dra. Rosa Esteves Arantes, Laboratório de Biologia das Interações Celulares, do Departamento de Morfologia, sob supervisão da Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra e Laboratório de Farmacologia, do Departamento de Farmacologia, sob supervisão da Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira. Os laboratórios aqui citados encontram-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Este trabalho foi realizado sob orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca (Departamento de Morfologia) e co-orientação da Profa. Dra. Patrícia Massara Martinelli do mesmo Departamento. Essa pesquisa contou com o apoio financeiro 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).

“Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus. Sem Ele, não estaria aqui. Obrigado Senhor por tudo que fazes em minha vida. Obrigado por sempre me ouvir, por colocar paz em meu coração quando as aflições surgem. OBRIGADO MUITO OBRIGADO!

Agradeço aos meus queridos pais, Marcelo e Vanessa, pelo Amor e carinho que me concedem a cada dia, por serem minha base, por não medirem esforços para que eu estivesse onde estou. O meu eterno agradecimento a vocês, AMO vocês. À minha irmã Letícia, pelo apoio e pelo carinho. A toda minha família, avós, tios, tias, primos e primas, a todos vocês que de alguma forma me ajudaram nessa etapa.

A você meu AMOR, pessoa mais que especial, muito mais que uma colega excelente de trabalho, que surgiu em minha vida de forma inesperada, mas que me trouxe tanta felicidade. Jéssica, obrigado amorzinho por todo apoio que você deu e me dá a cada dia. Já se passaram um ano, 12 meses e a minha alegria em estar ao seu lado é cada vez maior. Deus sabe o quanto sofremos naquele período longe um do outro, num momento que começávamos nosso relacionamento, mas Deus na sua bondade infinita nos juntou a Ele e assim conseguimos passar por tudo. Minha linda, a você que diretamente fez parte desse trabalho, me ajudando nas análises e sempre junto de mim me confortando com seu abraço nos momentos de angústias, o meu mais eterno Obrigado! Com você a caminhada foi/é mais leve, você me dá Paz! TE AMO! Juntos estaremos sempre, na Paz do Senhor! J∞M.

Ao Professor Robson, que mais que um grande Mestre, um grande amigo! Sem o qual não estaria aqui agora! Muito obrigado!

À Professora Cristina por todos os ensinamentos e oportunidades, por todas as sugestões para engrandecer este trabalho e também por me tranquilizar em alguns momentos de grande ansiedade.

À Professora Patrícia Massara, minha co-orientadora, por sempre estar disposta a me ajudar, por ter me ensinado as técnicas de imunofluorescência e por deixar os momentos de trabalho mais leves.

À Professora Patrícia Lima, pessoa que me iniciou no laboratório e que tanto me ajudou com as técnicas histológicas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia da Neurotransmissão por todos os momentos de diversão e aprendizado. Ao Hermann, amigo querido, sempre disponível para

ajudar, seja com as necessidades dos projetos, seja com uma boa conversa. À Prica e Babi pela companhia divertida durante as longas horas de trabalho seja no lab ou nas horas dispendidas no Confocal (rsrsrs). À Luana por ter ajudado quando precisei e pelas conversas. Agradeço também a Fernanda, pela ajuda com as análises, ao amigo Matheus Fonseca, à Marina (mamãe do Dudu) e também, Débora, Rubens e Rayara. À Professora Janice por também estar presente e pelos conselhos. Muito obrigado a todos vocês!

Ao Professor José Carlos, nosso grande mestre e amigo, nos ajudando sempre com os conselhos e sugestões do nosso Professor Emérito!

Às Professoras Rosa Arantes, do Departamento de Patologia por ter me deixado utilizar o criostato de seu lab e também a Pós-doc Cristiane por me auxiliar no uso do mesmo. À Professora Wal pela simpatia e por ter cedido o meu uso em seu microscópio. À Professora Luciene Vieira, da Farmacologia por também, de forma gentil, ter liberado o uso de seu microscópio. Muito obrigado!

Ao Diogo pelo cuidado com os animais e pelos momentos descontraídos nas horas de experimentos.

Ao técnico Carlos, do laboratório de Neurobiologia por sempre estar disposto a ajudar e por ter me ensinado muito do que aprendi.

A todos os colegas da Pós-graduação em Biologia Celular.

A todos os professores da Pós-graduação em Biologia Celular.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular.

A todos os funcionários das secretarias da Pós e também da Morfologia, bem como aos funcionários da limpeza.

À UFMG e as agências de financiamento da pesquisa no Brasil, CNPq, CAPES em especial à FAPEMIG, pela concessão da minha bolsa de Mestrado.

A todos vocês, eu deixo aqui o meu Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O Músculo Estriado Esquelético	15
1.2. As Isoformas da Cadeia Pesada de Miosina (MyHC)	18
1.3. A Junção Neuromuscular e a Transmissão Sináptica Química	30
1.4- A Neurotransmissão Colinérgica	35
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo Geral	40
2.2. Objetivos Específicos	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 População e amostra	41
3.2 Obtenção dos músculos	42
3.3 Histologia	42
3.4 Imunofluorescência	43
3.5 Aquisição e análise das imagens	44
3.6 Análise estatística	44
4. RESULTADOS.....	46

4.1 As fibras musculares do Sóleo de animais VACHT KD não apresentam alterações em relação ao número de fibras totais, porém, os animais VACHT KD ^{HOM} apresentam um maior número de fibras por área.....	46
4.2 O músculo Sóleo de camundongos VACHT KD apresentam fibras musculares com maior área de secção transversal (CSA) e perímetro quando comparado ao de camundongos controles WT.....	49
4.3 O músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL) de animais KD ^{HOM} apresenta um maior número de fibras musculares quando comparado ao de animais VACHT WT.	51
4.4 O músculo EDL de camundongos VACHT KD apresentam fibras musculares com menor área de secção transversal (CSA) e perímetro quando comparado ao de camundongos controles WT.....	54
4.5 Avaliação qualitativa das fibras musculares do Sóleo e Extensor Longo dos Dedos (EDL) de animais VACHT WT, KD ^{HET} e KD ^{HOM} , marcadas com anticorpo anti- MyHC tipo I.....	56
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	67
7. REFERÊNCIAS	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ALS	Esclerose Lateral Amiotrófica
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ca ²⁺	Íon cálcio
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
CSA	Área de Secção Transversal
EDL	Músculo Extensor Longo dos Dedos
FM1-43	<i>N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(4(dibutylamino)-styryl)pyridinium dibromide</i>
H ⁺	Íon hidrogênio
Hz	Hertz
JNM	Junção Neuromuscular
K ⁺	Íon potássio
MEE	Músculo Estriado Esquelético
MEPPs	Potencial de placa motora em miniatura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MG	Músculo Gastrocnêmio Medial
MyHC	Cadeia pesada de miosina
Na ⁺	Íon sódio
SDH	Succinato Desidrogenase
SMA	Atrofia Muscular Espinhal
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
SNAP-25	Proteína de 25 kDa associada ao sinaptosoma
SOL	Músculo Sóleo
T-SNARE	<i>Target SNARE</i>
TTX	Tetrodotoxina

UMs	Unidades Motoras
VAcHT	Transportador vesicular da acetilcolina
VAcHT KD ^{HOM}	<i>Knockdown</i> homozigoto para o gene VAcHT
VAcHT KD ^{HET}	<i>Knockdown</i> heterozigoto para o gene VAcHT
VAcHT WT	<i>Wild-type</i> para o gene VAcHT
VAcHT ^{del/del}	<i>Knockout</i> para o gene VAcHT
VAMP	Proteína de membrana associada à vesícula
VH ⁺ -ATPase	Bomba vesicular de íons hidrogênio
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
V-SNARE	<i>Vesicular SNARE</i>
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens representativas de secções transversais de músculos esqueléticos evidenciando diferentes marcações que possibilitam a identificação das isoformas da cadeia pesada de miosina.....	19
Figura 2: Imagens representativas de diferentes músculos esqueléticos de camundongos na idade de 5 dias que expressam a isoforma lenta (tipo I)	23
Figura 3: Representação de unidades motoras e a relação com os diferentes tipos de fibras musculares.....	25
Figura 4: Características das unidades motoras em fibras musculares de contração rápida e lenta	27
Figura 5: Alteração no padrão de estimulação elétrica em músculo Sóleo em regeneração é capaz de alterar a expressão gênica da MyHC	28
Figura 6: A Junção Neuromuscular visualizada através de diferentes técnicas.....	31
Figura 7: Etapas básicas do ciclo de vesículas sinápticas	34
Figura 8: Sequência de aminoácidos com topologia prevista para o VACHT e Mecanismo de preenchimento das vesículas sinápticas com ACh via VACHT	37
Figura 9: Síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina.....	38
Figura 10: Imagem representativa do gel de agarose mostrando os genótipos utilizados neste trabalho.....	41
Figura 11: Imagens representativas de cortes transversais do músculo Sóleo de animais VACHT WT (A), KD^{HET} (B) e KD^{HOM} (C).....	47
Figura 12: Os animais VACHT KD^{HOM} apresentam alterações quantitativas das fibras musculares no músculo Sóleo	48
Figura 13: O músculo Sóleo dos animais VACHT KD apresenta fibras musculares com maiores CSA e perímetro..	50

Figura 14: Imagens representativas de cortes transversais do músculo EDL de animais VACHT WT (A), KD ^{HET} (B) e KD ^{HOM} (C).....	52
Figura 15: A análise quantitativa do músculo EDL nos animais VACHT KD ^{HOM} mostra um impacto na musculatura pela menor liberação de acetilcolina	53
Figura 16: O músculo EDL dos animais VACHT KD apresenta fibras musculares com menores CSA e perímetro..	55
Figura 17: Imagens representativas da marcação do músculo Sóleo de animais VACHT WT, KD ^{HET} e KD ^{HOM} com anticorpo anti-MyHC tipo I.	57
Figura 18: Imagens representativas da marcação do músculo EDL de animais VACHT WT, KD ^{HET} e KD ^{HOM} com anticorpo anti-MyHC tipo I.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de fibras musculares.	21
Tabela 2: Alterações no padrão de expressão da cadeia pesada de miosina em diferentes condições.....	29
Tabela 3: Resultado da análise quantitativa do músculo Sóleo.	46
Tabela 4: Resultado da análise da área e perímetro das fibras musculares do Sóleo nos três genótipos..	49
Tabela 5: Resultado da análise quantitativa do músculo EDL.....	51
Tabela 6: Resultado da análise da área e perímetro das fibras musculares do EDL nos três genótipos..	54

RESUMO

O músculo estriado esquelético é um tecido extensivamente inervado e vascularizado e é de fundamental importância na contração muscular voluntária. Apresenta grande plasticidade, podendo alterar seu fenótipo em decorrência de processos patológicos neuromusculares, de forma induzida por estimulação física ou naturalmente durante a senescência. A contração das fibras musculares esqueléticas pode ocorrer de forma rápida ou lenta e essa característica é dependente da expressão de quatro isoformas existentes da cadeia pesada de miosina (MyHC). Assim, as fibras são classificadas em: tipo I (lenta) e tipo II (IIA, IIX e IIB-rápidas). A estimulação nervosa é de fundamental importância para a contração muscular, e, em mamíferos, ocorre quando o neurotransmissor acetilcolina se liga a receptores nicotínicos na membrana pós-sináptica localizada na fibra muscular. O armazenamento apropriado da acetilcolina em vesículas sinápticas é essencial para a neurotransmissão colinérgica e é promovido por uma proteína presente na membrana da vesícula denominada transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Para compreender melhor os efeitos da disfunção colinérgica, Prado e colaboradores (2006) geraram através de recombinação homóloga uma linhagem de camundongos com redução na expressão da proteína VACHT (VACHT KD^{HET} e KD^{HOM}). Esses animais possuem, respectivamente, uma redução em torno de 40% e 70% na expressão da proteína. Os mesmos pesquisadores observaram que, em testes de resistência e força, os animais apresentaram uma importante diminuição na função muscular. Assim sendo, os objetivos deste trabalho consistem em avaliar qualitativamente e quantitativamente, através de histologia de rotina, a morfologia geral, o número total de fibras, a distribuição de fibras por área, a área de secção transversa (CSA) e o perímetro de fibras musculares de contração rápida e lenta em diferentes músculos nesses animais, bem como realizar, através de imunofluorescência, análise qualitativa de possíveis alterações no padrão de expressão das isoformas da MyHC. Nossos resultados mostraram que o músculo de contração lenta Sóleo, apresenta, nos animais KD^{HOM} , uma menor relação fibras/área em relação ao controle e tanto os animais KD^{HOM} quanto os KD^{HET} apresentaram maiores CSA e perímetro. Diferentemente, o músculo de contração rápida, EDL, apresentou nos animais KD^{HOM} um aumento no número total de fibras e uma redução na CSA e perímetro, sugerindo atrofia das fibras musculares. A análise qualitativa da expressão da MyHC mostra um provável aumento da isoforma tipo I no EDL dos animais KD^{HOM} . Assim, nossos resultados mostram que a atividade colinérgica possui um importante papel no estabelecimento do fenótipo das fibras musculares e que perturbações nesse sistema, exemplificada por este modelo, são capazes de interferir com a função desses músculos.

ABSTRACT

The Skeletal Muscle is a widely innervated and vascularized tissue and has a great importance on voluntary muscle contraction. Has great plasticity and can change its phenotype during neuromuscular diseases, physical stimulation and during aging process. The contraction of the muscle fibers can occur in a fast or in a slow way and this characteristic is dependent on the expression of four Myosin Heavy Chain (MyCH) isoforms, which can be classified in type I (slow) and three types of the II isoform (IIA, IIX and IIB- fast). Nerve stimulation is fundamentally important for muscles to contract and in mammals, it happens when the neurotransmitter, acetylcholine is released in the synaptic cleft and binds to nicotinic receptors at the post synaptic membrane. The correct storage of acetylcholine in synaptic vesicles is essential for cholinergic neurotransmission. This storage is promoted by a protein that is localized in the synaptic vesicle membrane called, Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT). In order to understand the effects of a cholinergic dysfunction, Prado et al., (2006) developed by homologue recombination a strain of mice that present reduced levels of the VACHT protein (VACHT KD^{HET} and KD^{HOM}). These animals have respectively 40% and 70% reduction in this protein levels and motor performance studies showed a significant deficit in muscle strength. Therefore our aim is to evaluate qualitatively and quantitatively by histological techniques, the general morphology, the total number and distribution of muscle fibers and the CSA and perimeter of slow and fast muscle fibers from different muscles in these animals, as well as evaluate by immunofluorescence possible alterations in the expression pattern of the MyHC isoforms. Our results show that the Soleus, a slow twitch muscle present a reduction in the distribution of fibers per area in KD^{HOM} and an increase in the CSA and perimeter in KD^{HET} and KD^{HOM}, compared to control. Differently, the Extensor Digitorum Longus muscle (EDL), a fast twitch muscle in KD^{HOM} mice presented an increase in the total number of fibers and a reduction in the CSA and perimeter of this muscle, suggesting an atrophy of these fibers. The qualitative evaluation of the MyHC isoforms just showed a possible increase in the expression of the type I. Thereby, our results show that cholinergic activity plays a role in the establishment of muscle fibers phenotype and disturbances in this system, exemplified by this mice model is capable to interfere with the correct function of these muscles.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Músculo Estriado Esquelético

Os diferentes músculos estriados esqueléticos de um indivíduo são coletivamente responsáveis por 40% do seu peso corporal. As fibras musculares compõem em torno de 85% do peso úmido de cada músculo, sendo que o restante do peso é constituído por tendões, outros tecidos conjuntivos e vasos sanguíneos (GOLLNICK et al., 1981). A maioria dos músculos estriados esqueléticos é presa aos ossos por meio de tendões que se localizam em ambas as extremidades e se estendem através de uma ou de várias juntas (KERNELL, 2006).

O músculo estriado esquelético (M.E.E) é altamente plástico, alterando suas características fisiológicas, bioquímicas e moleculares frente a diferentes estímulos (fisiológicos ou patológicos). Portanto, o fenótipo do M.E.E resulta da interação entre o genótipo e as influências do meio externo nas fibras musculares, e é largamente caracterizado pelo número de fibras musculares presentes, a área de secção transversa (CSA), o número de sarcômeros em série, a distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares (JASPERS et al., 2010).

No plano histológico, o M.E.E é formado por feixes de células longas, cilíndricas, apresentando miofibrilas de contração voluntária, contendo múltiplos núcleos que se localizam próximos ao sarcolema (JUNQUEIRA & CANEIRO, 2008). As fibras musculares, quando visualizadas sob um microscópio de luz polarizada, apresentam estriações mostrando um padrão transversal de bandas que são: claras não polarizadas (BANDAS I) e bandas escuras (BANDAS A). Essas bandas são recorrentes com uma periodicidade em torno de 2 a 3µm no repouso. Durante a contração, a banda I estreita-se, porém a espessura da banda A se mantém constante. É interessante notar que as bandas A e I refletem o arranjo intracelular de proteínas estruturais que são as responsáveis pela produção da força muscular. Essas proteínas são os miofilamentos espessos (MIOSINA) e finos (ACTINA), no entanto, dentro dos miofilamentos finos encontram-se também outras proteínas de fundamental importância para o processo de contração muscular, como a tropomiosina e a família das troponinas (C, I e T). Ao visualizarmos esse padrão no microscópio eletrônico de transmissão, os miofilamentos estão organizados em repetidas unidades denominadas sarcômeros. Essas unidades estão ligadas umas as outras através de uma estrutura proteica, os discos Z. Os miofilamentos finos de actina estão conectados em cada extremidade ao disco Z e os miofilamentos espessos de

miosina ocupam uma posição mais central, entre os filamentos de actina. Cada filamento espesso é ancorado pelos filamentos de titina, que conectam as suas extremidades aos discos Z. A banda A, vista sob luz polarizada, corresponde às porções ocupadas pelos filamentos espessos; por sua vez, a banda I corresponde aos filamentos finos (HERZORG et al., 1992; WANG e KERNELL, 2000; KERNELL, 2006). Em relação ao disco Z, a primeira função dessa estrutura é promover uma ligação mecânica, longitudinalmente entre os sarcômeros adjacentes e transversalmente, através do citoesqueleto miofibrilar, às miofibrilas adjacentes. O disco Z, através de mecanismos de sinalização, é o ponto central na recepção, transdução e transmissão de sinais mecânicos e bioquímicos (PYLE e SOLARO, 2004; SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011).

Para que ocorra a contração do músculo, as miofibras despolarizam em consequência da ativação nervosa e esse evento acontece da seguinte forma: após a despolarização do neurônio motor e liberação das vesículas sinápticas contendo acetilcolina pelo terminal nervoso, o neurotransmissor se liga em receptores nicotínicos na membrana pós-sináptica, o que culmina na despolarização e consequente propagação de um potencial de ação pela membrana muscular (sarcolema). As seguintes etapas se sucedem para que ocorra a contração da célula muscular: (1) Para cada sarcômero ao longo das fibras, o potencial de ação gerado, é propagado ao longo das fibras, passando por estruturas tubulares denominadas Túbulos T; (2) Os túbulos T estão intimamente próximos ao retículo sarcoplasmático (RS), estruturas essas responsáveis por armazenar o cálcio intracelular. Uma vez que o potencial de ação chega ao RS, os íons cálcio são passivamente liberados no citoplasma das células musculares (sarcoplasma); (3) Os íons cálcio liberados ligam-se de forma reversível às moléculas de troponina C dos miofilamentos de actina; (4) A ligação dos íons cálcio às moléculas de troponina C induz uma mudança conformacional de outra proteína, também localizada nos miofilamentos de actina, a tropomiosina. Essa alteração temporária na estrutura da tropomiosina é necessária para a liberação dos sítios ativos e consequente interação entre os filamentos finos e espessos. Essa interação entre os filamentos de actina e miosina recebe o nome de pontes cruzadas; (5) 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; (6) 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, que de forma interessante é utilizada na clínica e em pesquisas na identificação de diferentes isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) que podem estar alteradas em decorrência de processos patológicos que

afetam a célula muscular; (7) Uma vez que a ponte cruzada é desfeita, actina e miosina retornam para a conformação de início e as etapas (5)-(7) se repetem enquanto a concentração de cálcio no sarcoplasma seja alta o suficiente para a ligação efetiva com a troponina C; (8) Com o fim do potencial de ação gerado na célula muscular, a concentração do cálcio sarcoplasmático diminui pelo transporte ativo dos íons cálcio do sarcoplasma para RS, processo esse promovido por uma bomba RS-Ca²⁺; (9) Consequente à diminuição dos íons Ca²⁺ e não ligação desses íons as 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. A título de curiosidade, o ATP não é apenas importante para prover de energia o ciclo da ponte cruzada, mas caso sua concentração no sarcoplasma se aproximar de zero, o que ocorre logo após a morte, os miofilamentos de actina e miosina se manterão ligados e o músculo se encontrará rígido. Esse fenômeno é denominado de *rigor mortis*. (GREFTE et al., 2007; KERNELL, 2006).

A função de cada M.E.E pode variar de acordo com sua localização e constituição, portanto, o reconhecimento de que o músculo esquelético é formado por diferentes tipos de fibras, que se diferem em sua estrutura, composição molecular e funcionalidade, vem contribuindo para um melhor entendimento da fisiologia e plasticidade muscular, o que auxilia em um diagnóstico mais efetivo de disfunções neuromusculares.

1.2. As Isoformas da Cadeia Pesada de Miosina (MyHC)

O estudo da porção globular da cadeia pesada de miosina mostra a existência de quatro isoformas dessa proteína, sendo elas: I, IIA, IIX e IIB, que se diferem uma das outras com base no metabolismo, contratilidade e nas propriedades elétricas. Essas fibras podem ser de contração lenta a rápida, e variam de acordo com expressão do gene da cadeia pesada de miosina (MyHC) (CHAKKALAKAL et al., 2010). Fibras de contração lenta expressam a cadeia pesada de miosina tipo I (MyHC- β /slow), também presente no músculo cardíaco e localizada no gene *Myh7*. As fibras de contração rápida expressam: a MyHC IIA, codificada pelo gene *Myh2*, MyHC IIX, no gene *Myh1* e MyHC IIB no gene *Myh4* (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). A identificação das isoformas diferentes da MyHC pode ser realizada através de técnicas histoquímicas (reação da ATPase miofibrilar, marcação para glicogênio, atividade da succinato desidrogenase (SDH), que objetiva avaliar o potencial oxidativo das fibras). Existem ainda anticorpos específicos que se ligam a cada isoforma da MyHC, que permitem avaliar os tipos de fibras por imunofluorescência e também por técnicas de biologia molecular como o Western Blotting (**FIGURA 1**).

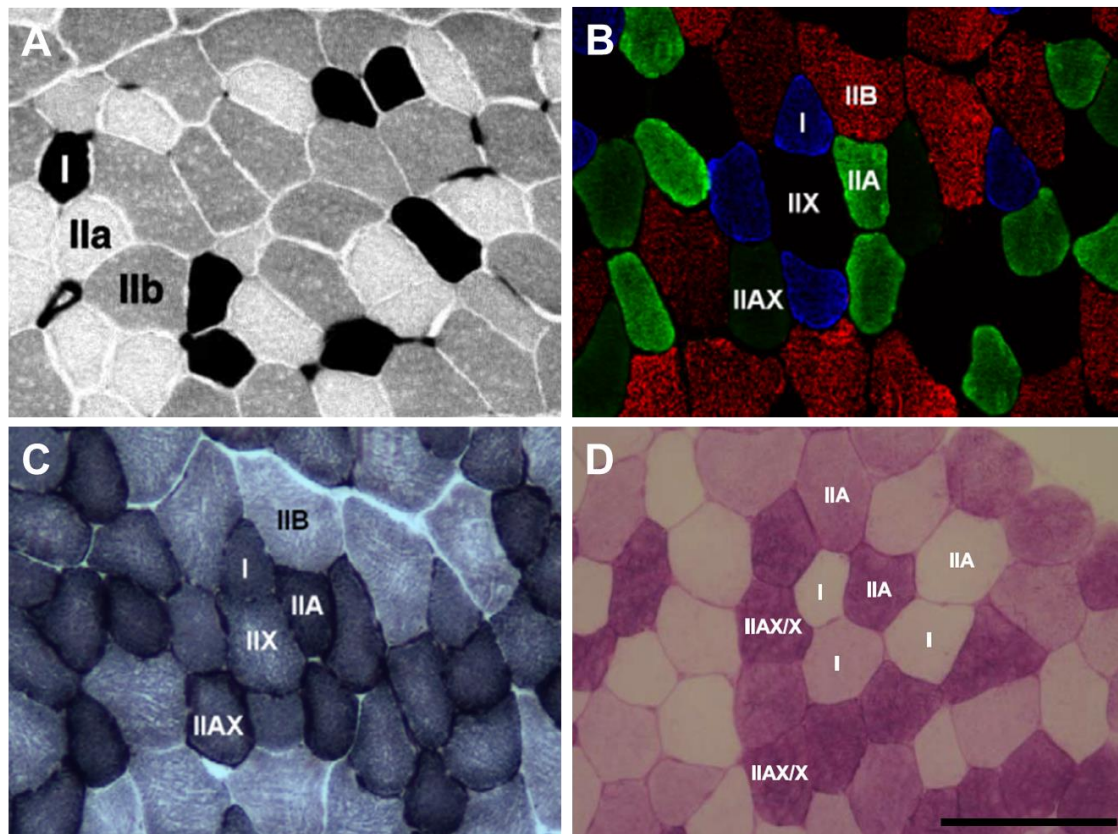


Figura 1: Imagens representativas de secções transversais de músculos esqueléticos evidenciando diferentes marcações que possibilitam a identificação das isoformas da cadeia pesada de miosina. (A). Marcação de músculo tibial anterior de ratos, submetido à técnica clássica de ATPase miofibrilar incubado em pH 4,3. Nessa variação de pH é possível identificar fibras do tipo I (pretas), IIA (claras) e IIB (cinza) (Imagem de DEVICI E EGGINTON, 2002). **(B).** Secção transversal de músculo tibial anterior de ratos mostrando a marcação por imunofluorescência das diferentes isoformas da MyHC utilizando anticorpos específicos (Imagem de BLOEMBERG & QUADRILATERO, 2012). **(C).** Músculo tibial anterior de rato em corte transversal mostrando a reação da succinato desidrogenase (SDH). Essa marcação diz respeito ao metabolismo oxidativo (mitocondrial). As fibras do tipo I e IIA apresentam maior densidade de mitocôndrias, portanto, maior atividade para SDH. As fibras do tipo IIX e IIB são mais glicolíticas, portanto, menor atividade da enzima (Imagens de BLOEMBERG & QUADRILATERO, 2012). **(D).** Corte transversal de músculo esquelético humano mostrando marcação com o corante Ácido Periódico de Schiff PAS, evidenciando estoques de glicogênio muscular. Fibras do tipo II por apresentarem metabolismo glicolítico marcam-se mais fortemente com o PAS em comparação com fibras do tipo I (Imagem de QUADRILATERO et al., 2009). Barra de escala: 100µm.

Em geral, cada fibra muscular expressa uma única isoforma da MyHC, porém, existem fibras que podem apresentar diferentes combinações das isoformas, o que as classifica como fibras híbridas. Seguindo essa linha de raciocínio, as possíveis combinações já descritas para os diferentes tipos de fibras, em ratos, são: I- I/IIA- IIA- IIA/IIX- IIX- IIX/IIB- IIB. Além dessas, existem isoformas da MyHC que são expressas em músculos esqueléticos específicos como o músculo extraocular (MyHC-EO) (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). Músculos em desenvolvimento apresentam dois tipos de MyHC: neonatal (MyHC-neo) e embrionária (MyHC-emb) os quais são bons marcadores para fibras em regeneração (CHAKKALAKAL et al., 2010; CHAKKALAKAL et al., 2011; SCHIAFFINO, 2010; SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). As isoformas da MyHC são responsáveis pela grande variabilidade de velocidade máxima de encurtamento entre fibras musculares de contração rápida e lenta (REGGIANI et al., 1997). A tabela 1 a seguir exemplifica algumas características dos diferentes tipos de fibras.

	Tipo I (Vermelha)	Tipo IIA	Tipo IIX	Tipo IIB (Branca)
Velocidade de contração	Lenta	Moderada/rápida	Rápida	Superior a IIX
Tamanho da placa motora	Pequena	Média	Grande	Superior a IIX
Resistência à fadiga	Alta	Moderada/alta	Intermediária	Baixa
Respiração	Aeróbica	Aeróbica de longo prazo	Anaeróbica de curto prazo	Anaeróbica
Utilização em 24hrs	5,3 a 8,4 hrs	23-72 minutos	< 5 minutos	0,5-3 minutos
Força produzida	Baixa	Média	Alta	Superior a IIX
Densidade de mitocôndrias	Alta	Alta	Média	Baixa
Densidade de capilares	Alta	Intermediária	Baixa	Baixa
Capacidade oxidativa	Alto	Alto	Intermediário	Baixo
Capacidade glicolítica	Baixo	Alto	Alto	Alto
Conteúdo de mioglobina	Alto	Alto	Baixo	Baixo

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de fibras musculares (dados a partir de: SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011).

É importante ressaltar diferenças que existem entre a musculatura esquelética de seres humanos e a de outros mamíferos, como ratos e camundongos. Essas diferenças devem ser levadas em conta antes de extrapolar qualquer conclusão feita em outros mamíferos para humanos. Como exemplo dessas diferenças, temos que, em humanos, a isoforma IIB é expressa apenas nos músculos da laringe e extraoculares, sendo que é a isoforma IIX que se encontra em grande proporção (SCHIAFFINO, 2010). Devido à inexistência das fibras IIB, as combinações ficam assim restritas em humanos: I- I/IIA- IIA- IIA/IIX- IIX. Além dessa observação, a proporção das diferentes isoformas e as propriedades metabólicas mostra uma importante diferença quando comparamos humanos com camundongos e ratos. Em

camundongos adultos, os músculos são compostos, de forma predominante, por fibras dos tipos IIB e IIX, apresentando poucas fibras IIA; e fibras do tipo I são raras e estão localizadas em maior proporção em músculos específicos como o Sóleo. De forma contrária, a musculatura humana é predominantemente do tipo I e IIA, sendo as fibras IIX pouco expressas na maioria dos indivíduos (SCHIAFFINO, 2010). Outro ponto de diferença entre as espécies reside no metabolismo oxidativo, o qual é avaliado pela atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) presente na membrana mitocondrial interna. Músculos de camundongos apresentam maior marcação para a atividade da SDH. Além disso, a quantidade de mitocôndrias e de enzimas oxidativas é maior em fibras do tipo I e menor em fibras do tipo IIX, enquanto que na musculatura de ratos e camundongos, o potencial oxidativo é superior em fibras do tipo IIA e menor em fibras IIB (SCHIAFFINO, 2010).

A diversificação dos tipos de fibras musculares inicia-se durante o período embrionário de desenvolvimento, sendo independente de influências neuronais. No entanto, é somente após a formação e estabilização das sinapses neuromusculares que a grande variabilidade dos tipos de fibras ocorre (CLOSE, 1964). Ao nascimento, além da presença das isoformas embrionárias e neonatal, uma pequena mas considerável quantidade da isoforma lenta (tipo I) foi encontrada em quase todos os músculos, exceto na língua de camundongos (AGBULUT, 2003). A musculatura esquelética de mamíferos é formada em duas fases sucessivas e vários pesquisadores mostraram que a maioria das fibras de primeira geração expressa de forma padrão a isoforma lenta. A isoforma tipo I é sintetizada nos primeiros momentos da miogênese em ambos os músculos, que expressarão de forma constitutiva isoformas rápidas (como o EDL) e em músculos já determinados a expressar a MyHC lenta (Sóleo). Conjuntamente com essa isoforma padrão, os músculos também expressam, em uma população de células, a isoforma embrionária. A ativação do gene que codificará a miosina lenta é independente de inervação. Várias fibras musculares de primeira geração mantêm a expressão da miosina lenta, enquanto outras iniciam a mudança para a isoforma neonatal. As fibras de segunda geração inicialmente expressam as isoformas embrionárias como também a neonatal (precursora da isoforma adulta rápida) e a maioria dessas fibras adquirem o perfil de rápidas, aumentando-se assim o número de fibras rápidas (MyHC tipo II) em todos os músculos, o que é importante para a geração desse mosaico de distribuição de fibras rápidas e lentas. Nessa fase, a atividade neuronal é muito importante para que as fibras da segunda geração continuem a expressar a MyHC lenta (tipo I) (AGBULUT, 2003; CONDON *et al.*, 1990). A **FIGURA 2** mostra diferentes músculos esqueléticos de camundongos na idade de cinco dias (marcados com anticorpo específico para a MyHC I), que ainda retém a isoforma

lenta, mesmo em músculos (como o EDL) que na idade adulta apresentarão mais de 90% de suas fibras expressando a MyHC do tipo II (BLOEMBERG & QUADRILATERO, 2012).

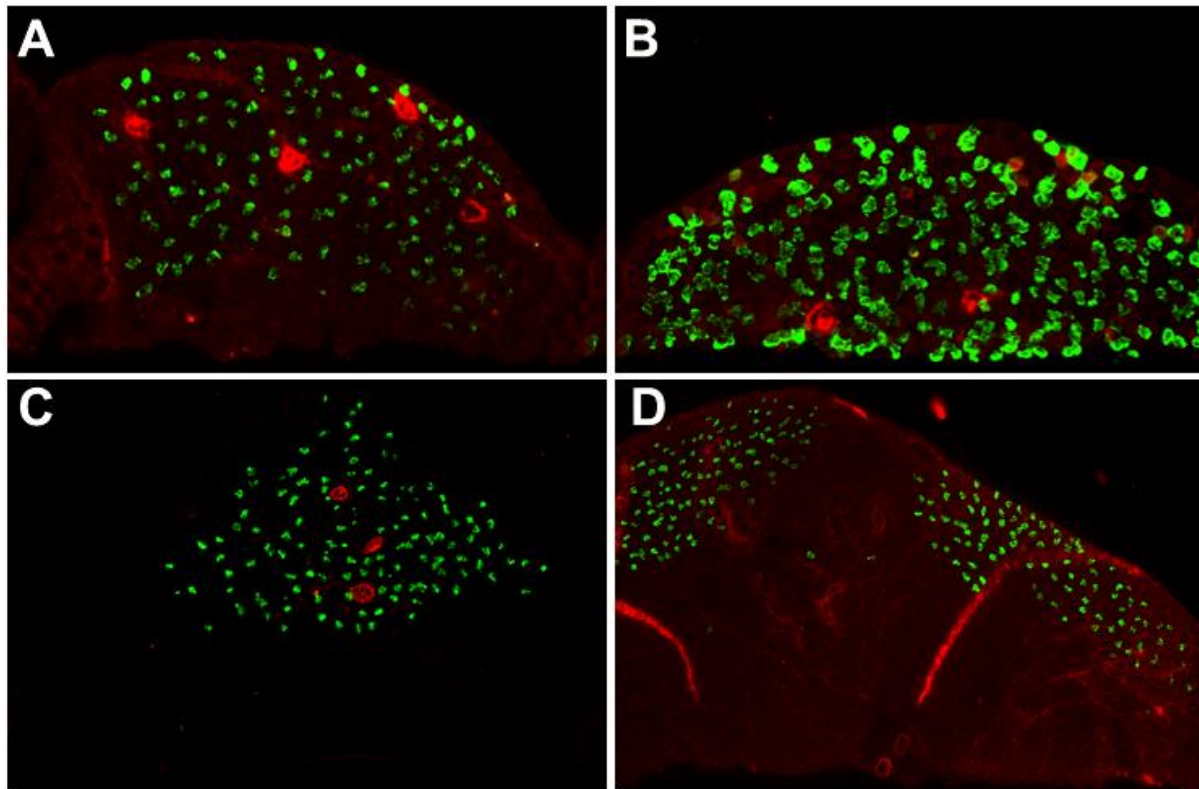


Figura 2: Imagens representativas de diferentes músculos esqueléticos de camundongos na idade de 5 dias que expressam a isoforma lenta (tipo I). (A). O músculo EDL apresenta uma grande proporção de suas fibras expressando a isoforma lenta, marcadas em verde (B). O músculo Sóleo, que na idade adulta é exclusivo de fibras tipo I, nessa idade já apresenta uma grande proporção de fibras lentas. (C). Músculo Tibial anterior, apresentando a marcação padrão para a isoforma lenta. (D). Músculo Gastrocnêmio também expressa a isoforma tipo I.

Músculos em desenvolvimento apresentam maior plasticidade do que músculos maduros. Durante essa fase, os músculos tornam-se mais susceptíveis a alterações nos tipos de fibras musculares quando comparados a músculos adultos (SCHIAFFINO & BORMIOLI, 1973). A fim de se entender como músculos EDL em desenvolvimento reagiriam a alterações na carga aplicada sobre eles, foi realizada uma cirurgia na qual o músculo tibial anterior, sinérgico ao EDL, foi removido. Foi visto que esses animais em desenvolvimento apresentaram maior expressão da isoforma tipo I e um switch completo de fibras IIB para IIA/IIIX, evidenciado por reações histoquímicas para ATPase miofibrilar e atividade da

enzima SDH. De forma contrária, ao realizar o mesmo experimento em animais adultos, não se observou alterações nos tipos de fibras musculares (SCHIAFFINO & BORMIOLI, 1973; SCHIAFFINO, 2010).

Durante o desenvolvimento pós-natal e na idade adulta, a atividade neuronal e de alguns hormônios, em particular os hormônios da tireóide, exercem uma importante e fundamental influência para a diferenciação das quatro isoformas existentes da MyHC (SCHIAFFINO, 2010). Em relação aos hormônios tireoidianos, foi mostrado que durante o desenvolvimento o aumento nos níveis plasmáticos desses hormônios (hipertireoidismo) resulta na expressão precoce das isoformas adultas rápidas. De forma interessante, o hipotireoidismo resulta na inibição da expressão dessas isoformas rápidas e induz a persistência de isoformas presentes apenas no desenvolvimento (MyHC neonatal e embrionárias) (AGBULUT, 2003; IZUMO, 1986).

No desenvolvimento pós-natal, para que as fibras musculares possam diferenciar-se e expressar as quatro isoformas existentes da MyHC, existe a necessidade de se estabelecer uma comunicação nervosa entre as fibras musculares e neurônios motores localizados na medula espinhal. Nesse tipo de comunicação, em um mesmo músculo, cada axônio motor é responsável pela inervação de várias fibras musculares, formando dessa forma a chamada unidade motora homogênea. **(FIGURA 3)**.

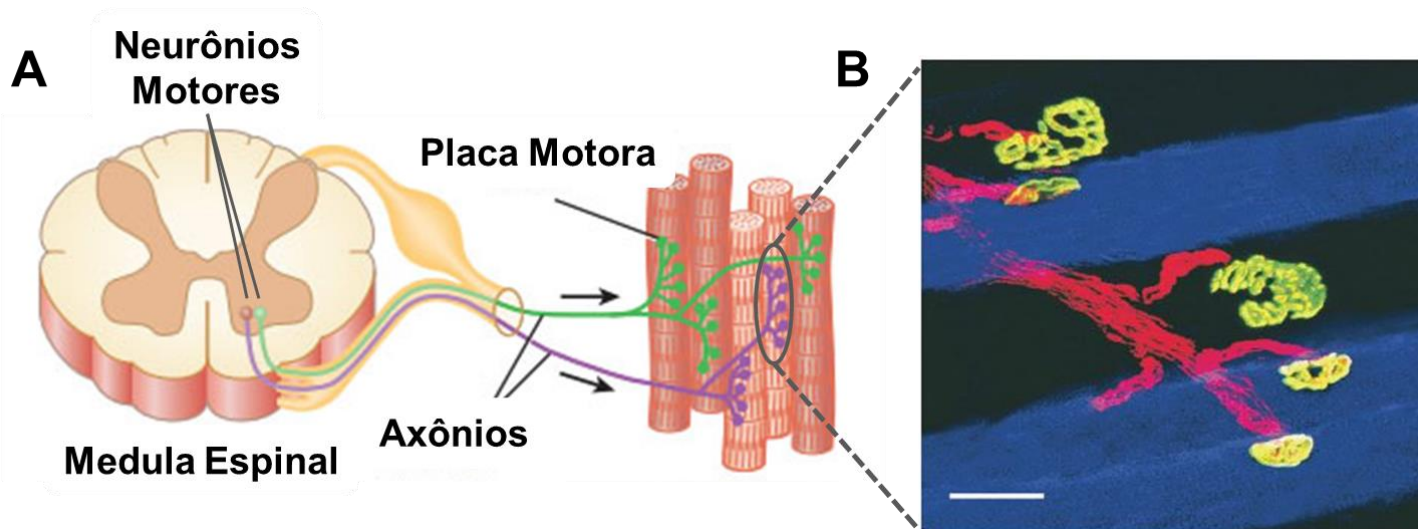


Figura 3: Representação de unidades motoras e a relação com os diferentes tipos de fibras musculares em mamíferos. (A). Neurônios motores localizados no corno anterior da medula espinhal emitem axônios que irão inervar cada fibra muscular. O contato entre o terminal nervoso e as fibras musculares forma as placas motoras e é nesse local que vesículas sinápticas contendo o neurotransmissor acetilcolina serão excitadas, o que em última instância culminará com a contração do músculo. Adaptado de: (<http://antranik.org/wp-content/uploads/2012/04/motor-unit-somatic-motor-neuron.jpg>) Acesso em: 26 Nov 2013. (B). Imagem mostrando a relação entre as unidades motoras e os tipos de fibras musculares por elas inervadas. Terminais nervosos e axônios motores do músculo diafragma foram marcados com uma sonda fluorescente (vermelho), as placas motoras estão evidenciadas (amarelo) e as fibras musculares foram marcadas (azul) com anticorpos específicos para as isoformas da MyHC I e IIA. Note que algumas fibras não apresentam marcação azul, indicando que provavelmente são fibras musculares que expressam isoformas do tipo IIx ou IIB (MANTILLA *et al.*, 2007).

Notavelmente, a grande maioria das fibras musculares de uma unidade motora é de um único tipo. As propriedades das fibras musculares podem ser determinadas independentemente, porém influências externas poderiam alterar o padrão sináptico durante a maturação das unidades motoras (CHAKKALAKAL et al., 2010). Algumas características pré-sinápticas podem ser descritas em relação aos diferentes tipos de fibras: **(1)** Motoneurônios que inervam fibras de contração tipo I apresentam uma alta taxa de impulsos (300,000 a 500,000 em 24hrs) e baixa frequência de disparo (~20 Hz). Fibras tipo IIA e IIX apresentam 90,000 a 250,000 impulsos e uma frequência média de disparo de 50 a 80 Hz. As fibras tipo IIB disparam 3,000 a 10,000 impulsos a uma frequência de 70 a 90 Hz. **(2)** As fibras musculares de contração lenta são inervadas por junções neuromusculares (JNM) de menor tamanho, o que se contrapõem com as fibras de contração rápida que apresentam JNM de tamanho superior. Além disso, JNM de fibras tipo II possuem uma maior amplitude do potencial evocado quando comparado a fibras tipo I, porém, essa amplitude decresce durante estimulações repetidas. A quantidade de acetilcolina liberada com o tempo nas JNM de fibras tipo I (Sóleo) é inferior à quantidade liberada em fibras do tipo II (EDL), porém, as terminações de fibras tipo I conseguem manter por mais tempo a liberação de acetilcolina, o que é consistente com o padrão de atividade *in vivo* desse músculo (REID et al., 1999; SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). **(FIGURA 4)**.

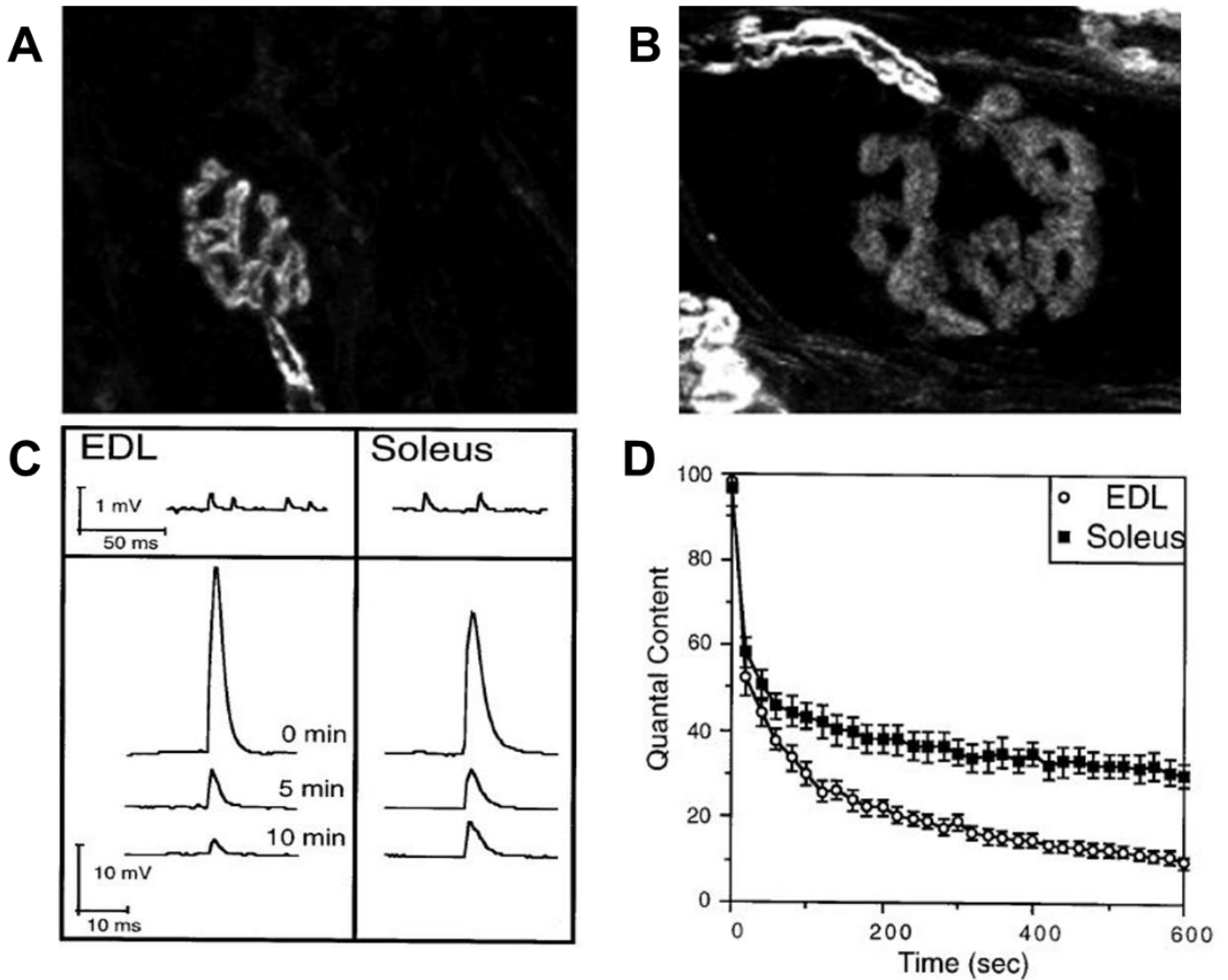


Figura 4: Características das unidades motoras em fibras musculares de contração rápida e lenta. (A). As JNM de fibras do tipo I em músculo diafragma mostram-se com área reduzida quando comparado a fibras do tipo IIX ou IIB (B). Adaptado de MANTILLA *et al.* (2007). (C). A amplitude do potencial evocado por estímulo nervoso é maior nas unidades de fibras do tipo II (EDL) do que em fibras do tipo I (Sóleo), porém, as fibras do tipo I conseguem manter a amplitude de seu potencial por mais tempo que as fibras do tipo II durante estimulação repetida (REID, 1999). (D). A liberação de acetilcolina é maior no EDL (tipo II) do que no Sóleo (tipo I), no entanto o músculo Sóleo é capaz de manter uma liberação controlada ao longo do tempo (REID, 1999).

É importante ressaltar que a estimulação externa crônica de fibras musculares com diferentes frequências de estímulos elétricos é capaz de alterar o padrão de inervação dos motoneurônios (influência retrógrada) que são responsáveis pela inervação de fibras rápidas e lentas (BEWICK, 2003). Desta forma, quando fibras musculares de contração rápida são estimuladas por estímulos característicos de inervação de fibras lentas, estes estímulos são capazes de alterar o padrão de inervação dos motoneurônios. Assim sendo, estes motoneurônios são alterados e passam a disparar impulsos em uma frequência mais baixa, característica de fibras de contração lenta, o que é capaz de modificar as características contráteis, metabólicas e ainda modificar a estrutura da fibra muscular. O mesmo fenômeno é passível de ocorrer no sentido contrário (BEWICK, 2003). Como representação, a **FIGURA 5** mostra que a alteração no padrão de estimulação elétrica das fibras musculares do Sóleo é capaz de alterar a expressão gênica da MyHC.

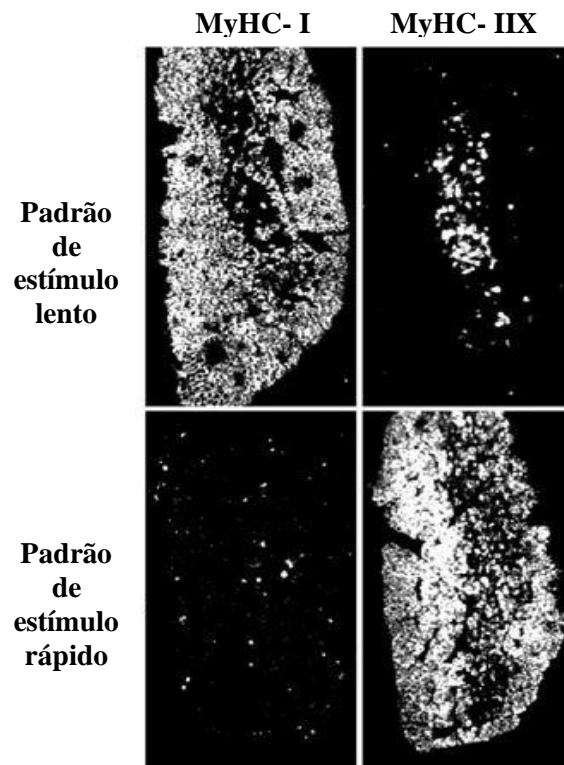


Figura 5: Alteração no padrão de estimulação elétrica em músculo Sóleo em regeneração é capaz de alterar a expressão gênica da MyHC. Músculos Sóleo desnervados foram estimulados eletricamente com um padrão de estímulo lento (20Hz) e um padrão de estímulo rápido (100Hz). Hibridização *in-situ* utilizando sondas específicas para MyHC-Lenta e Rápida mostra que o padrão de estímulo lento aumentou drasticamente a expressão da miosina lenta, o que não ocorreu com o estímulo rápido. No entanto, o padrão de estímulo rápido elevou a expressão da miosina rápida (IIX). Adaptado de CICILIOT & SCHIAFFINO (2010).

Alterações no padrão de expressão das diferentes isoformas da MyHC são vistas em várias condições e dependendo do mecanismo pelo qual é modificado, a forma como vai se proceder a mudança no perfil de expressão das isoformas pode ser diferente (CICILIOT et al., 2013). A tabela 2 a seguir exemplifica esse fato.

Mecanismo	Lenta-Rápida	Rápida-Lenta
Perda da influência neuronal; alteração na carga muscular	Desnervação; Injúria na medula espinal; Imobilização de membro; Suspensão de membro superior; Repouso; Microgravidade (voos espaciais)	
Desnutrição e Inflamação		Jejum; Administração de glicocorticóides; Diabetes tipo I; Sepses, Caquexia do câncer e AIDS
Múltiplos Fatores		Senescência
Múltiplos Fatores	Insuficiência cardíaca e DPOC (músculos dos membros)	Insuficiência cardíaca e DPOC (diafragma)

Tabela 2: Alterações no padrão de expressão da cadeia pesada de miosina em diferentes condições (modificado de: CICILIOT et al., 2013).

Ainda, levando em consideração essas diferenças no padrão de expressão da MyHC sob diferentes estímulos, existem na literatura trabalhos que mostram como é complexo o estudo sobre as isoformas da MyHC, uma vez que já foi documentado que um mesmo tipo de fibra submetida ao processo de desnervação responde de forma totalmente diferente (em termos de atrofia ou hipertrofia) quando diferentes músculos como o SOL, EDL e Diafragma são avaliados. As fibras do tipo I no músculo Sóleo desnervado passa por um processo atrofico, enquanto que no músculo EDL, essas mesmas fibras mantêm praticamente o mesmo tamanho. Diferenças parecidas foram observadas nas fibras IIA que sofreram muita e pouca atrofia em músculos Sóleo e EDL, respectivamente (CICILIOT et al., 2013). Entretanto, de forma inversa, o músculo respiratório diafragma, após desnervação, apresentou atrofia das fibras IIX e IIB; as fibras IIA por sua vez não sofreram mudanças, porém, as fibras do tipo I

sofreram hipertrofia (ARAVAMUDAN et al., 2006). Assim, esses dados mostram como o músculo estriado esquelético é plástico, podendo alterar seu fenótipo quando submetido a diversos estímulos.

Apesar dessas diferenças morfológicas e funcionais que residem nas fibras musculares, a forma com que uma fibra de contração lenta e uma fibra de contração rápida realiza a comunicação com o sistema nervoso é a mesma, ou seja, essa comunicação depende de uma sinapse química na qual a acetilcolina, em mamíferos, é o principal neurotransmissor. Essa conexão é estabelecida pelo contato entre o neurônio motor e uma fibra muscular esquelética. Nos próximos capítulos mais detalhes serão dados a respeito dessa forma de comunicação.

1.3. A Junção Neuromuscular e a Transmissão Sináptica Química

A Junção Neuromuscular ou Placa motora de vertebrados foi um dos primeiros modelos experimentais para o estudo da transmissão sináptica química (SANES; LICHTMAN, 1999). É um dos modelos de sinapses mais estudados e melhor compreendidos devido ao seu tamanho, sua simplicidade estrutural e acessibilidade (KUMMER; MISGELD; SANES, 2006). Em mamíferos, ela consiste em uma sinapse química colinérgica cuja função é transferir impulsos de uma terminação motora relativamente pequena para uma fibra muscular ampla e, assim, desencadear a contração (KATZ, 1966). **(FIGURA 6)**

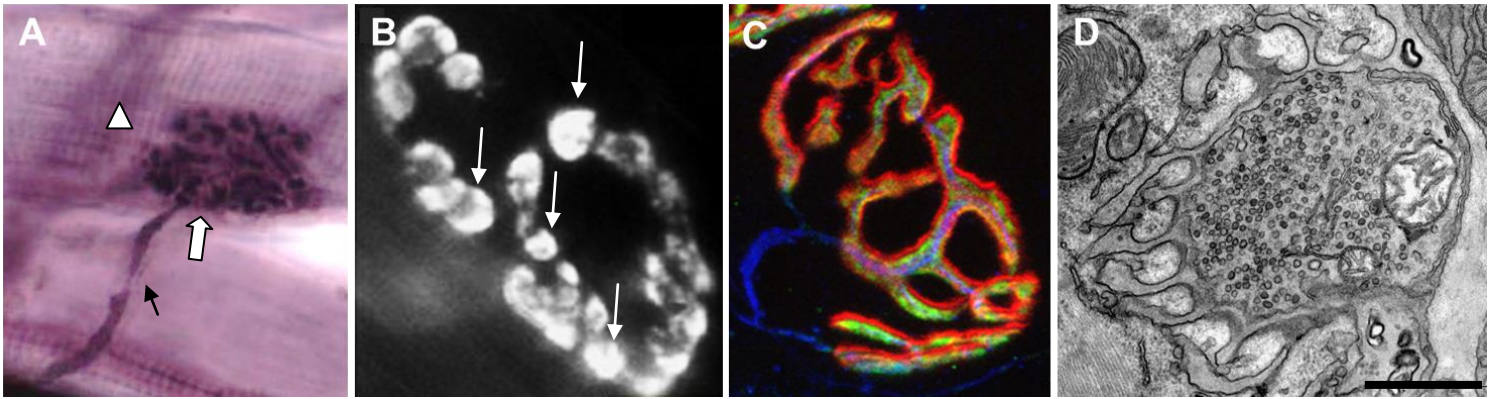


Figura 6: A Junção Neuromuscular visualizada através de diferentes técnicas.

(A). JNM pode ser identificada nessa preparação pela impregnação pelo cloreto de ouro. Note a íntima relação entre a placa motora (seta) e a musculatura esquelética (cabeça de seta). A seta preta indica o axônio motor (Adaptado de http://zoomify.lumc.edu/histoneu/neuro/neuro_main.htm) Acesso em: 20 Dez 2013. (B). Imagem de uma JNM de camundongo marcada com uma sonda fluorescente (FM1-43). Note a presença de *spots* fluorescentes (setas), que nada mais são do que aglomerados de vesículas sinápticas que internalizaram a sonda para o interior do terminal pré-sináptico (VALADÃO, 2013). (C). JNM de camundongo identificada pela marcação do terminal pré-sináptico com anticorpos que se ligam a proteínas de vesículas sinápticas (verde). O componente pós-sináptico pode ser identificado em vermelho, pela α -búngarotoxina que se liga a receptores para acetilcolina. Em azul identifica-se o axônio motor. Note o formato arborizado da JNM (Matheus Proença S. Magalhães Gomes). (D). Micrografia eletrônica de transmissão mostrando uma JNM de camundongo. O terminal pré-sináptico é composto por inúmeras vesículas sinápticas e mitocôndrias. A membrana da célula muscular emite projeções, as invaginações pós-juncionais, local esse onde se encontram os receptores para a acetilcolina. Separando o componente pré-sináptico do pós-sináptico visualiza-se uma fina fenda sináptica (Barra de escala: 1 μ m) (RODRIGUES, 2011).

A transmissão sináptica é iniciada quando um potencial de ação dispara a liberação de neurotransmissores a partir de um terminal nervoso pré-sináptico. O potencial de ação induz a abertura de canais para cálcio (Ca^{2+}) sensíveis à voltagem e o aumento transiente e localizado da concentração intracelular de cálcio estimula a exocitose de vesículas sinápticas (KATZ, 1966).

O terminal pré-sináptico típico é uma porção especializada do axônio motor. É caracterizado por uma zona ativa, que é uma região em que a membrana plasmática do terminal pré-sináptico está em contato íntimo com a membrana plasmática pós-sináptica, além da presença de um aglomerado de vesículas sinápticas. Essas vesículas podem ser agrupadas em três possíveis *pools* de liberação: o pool prontamente liberável, o pool de reciclagem e o pool de reserva. As vesículas sinápticas adjacentes às zonas ativas são denominadas vesículas ancoradas (MURTHY; DE CAMILLI, 2003; RIZZOLI & BETZ, 2005).

A transmissão sináptica química, principal forma de comunicação neuronal, requer as seguintes etapas: (1) a síntese de um neurotransmissor no terminal pré-sináptico; (2) o armazenamento dos neurotransmissores em vesículas sinápticas; (3) a liberação regulada dos neurotransmissores; (4) a presença de receptores específicos para os neurotransmissores na membrana pós-sináptica; (5) e um mecanismo para finalizar a ação dos neurotransmissores (SÜDHOF, 2004).

A exocitose de vesículas sinápticas é responsável pela liberação dos neurotransmissores. Esse evento é regulado por interações importantes entre proteínas presentes na membrana da vesícula e na membrana do terminal pré-sináptico (proteínas do complexo SNARE), que se entrelaçam promovendo a abertura de um poro de fusão e liberação de seu conteúdo na fenda sináptica (MURTHY; DE CAMILLI, 2003). A pergunta que se encontrava em aberto era se a fusão de vesículas sinápticas na membrana do terminal pré-sináptico era mediada simplesmente por interações com domínios lipídicos ou se proteínas intrínsecas da membrana desempenhavam algum papel no processo. Atualmente já está bem estabelecido que uma fusão eficiente das vesículas com a membrana requer as proteínas do complexo SNARE (MURTHY; DE CAMILLI, 2003). Na exocitose de vesículas sinápticas, as proteínas relevantes do complexo SNARE para o processo são: Sinaptobrevina/VAMP 1 e 2, também chamadas de v-SNAREs (*vesicular SNAREs*), Sintaxina e SNAP-25, conhecidas também como t-SNAREs (*target SNAREs*) (MURTHY; DE CAMILLI, 2003; SÜDHOF, 2004). A fusão das membranas que permite a exocitose das vesículas ocorre pela interação progressiva entre as proteínas do complexo SNARE (MURTHY; DE CAMILLI, 2003). No que diz respeito à localização, a sinaptobrevina está

localizada primariamente na membrana da vesícula, syntaxina e SNAP-25 na membrana plasmática do terminal pré-sináptico. Além dessas, outra proteína de grande relevância para o processo e que está envolvida com a sinalização do Ca^{2+} é a Sinaptotagmina I. Quando ocorre um aumento na concentração intraterminal de Ca^{2+} , a sinaptotagmina I, localizada na membrana da vesícula, altera sua conformação e interage mais fortemente com as proteínas do complexo SNARE e com fosfolípidos da membrana, promovendo a abertura de um poro de fusão e consequente liberação dos neurotransmissores (MURTHY; DE CAMILLI, 2003; CHAPMAN, 2002). Em condições de repouso as vesículas sinápticas sofrem fusão naturalmente com a membrana plasmática, entretanto, quando ocorre um potencial de ação que leva a um aumento no Ca^{2+} citosólico, a taxa de vesículas que se fundem a membrana aumenta drasticamente (MURTHY; DE CAMILLI, 2003). Após a liberação de seu conteúdo, as vesículas passam por um processo de endocitose compensatória, reciclagem e reenchimento com neurotransmissor para possibilitar um novo ciclo (SÜDHOF, 2004) (**FIGURA 7**). Esse ciclo de vesículas é composto por inúmeras outras proteínas que são de extrema relevância para o processo, no entanto, como o foco deste trabalho é outro, um panorama mais detalhado dessas proteínas bem como o de suas funções, pode ser encontrado em excelentes revisões da literatura.

O estudo do ciclo de vesículas sinápticas, bem como o de outros tipos vesiculares e suas implicações na medicina, ganhou a partir desse ano um novo estímulo. Juntamente com James E. Rothman e Randy W. Sheckman, o neurocientista Thomas C. Südhof foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina pelas descobertas a cerca da maquinaria que regula o tráfego de vesículas, o maior sistema de transporte de nossas células. ("Thomas C. Südhof - Facts". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. Web. 21 Dec 2013. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2013/sudhof-facts.html)

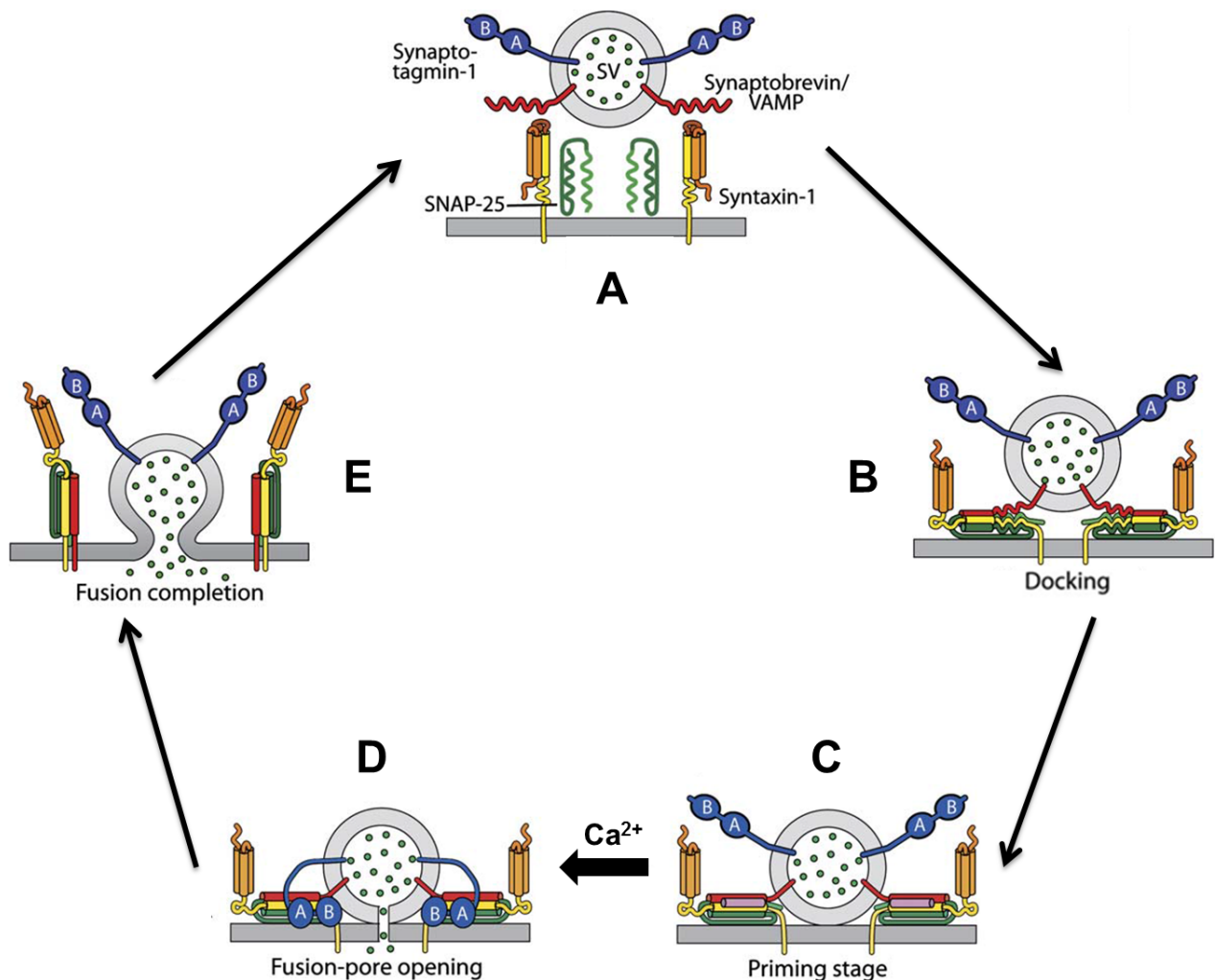


Figura 7: Etapas básicas do ciclo de vesículas sinápticas. (A). Vesículas sinápticas próximas às zonas ativas iniciam uma interação através da aproximação das proteínas do complexo SNARE, tanto t-SNARE como v-SNARE. (B). A partir dessa interação, as vesículas então ancoram (*docking*) na membrana do terminal. Nessa etapa, como a concentração de íons cálcio é nula, a proteína sinaptotagmina não se liga a membrana. (C). O entrelaçamento contínuo dessas proteínas auxilia no amadurecimento das vesículas (*priming*), tornando-as competentes para exocitose. (D). A partir do momento em que o potencial de ação é deflagrado, o aumento na concentração citoplasmática de cálcio promove a ligação da sinaptotagmina-1 à membrana do terminal. Conjuntamente com a força de tração exercida pelas outras proteínas do complexo, abre-se um poro de fusão e à medida que a interação entre as proteínas aumenta, o poro de fusão cresce até que ocorra uma liberação ainda maior dos neurotransmissores (E). Após a exocitose, as proteínas são desacopladas e as vesículas passam por um processo de endocitose para possibilitar o início de um novo ciclo (Adaptado de TANG et al., 2006).

1.4- A Neurotransmissão Colinérgica

A acetilcolina exerce um papel crucial no controle de inúmeros processos fisiológicos tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (PRADO et al., 2006). Neurônios colinérgicos estão envolvidos em processos cognitivos importantes, como atenção, memória, sono. Além dessas funções, esses neurônios no cérebro podem ainda secretar o neurotransmissor glutamato, enquanto no SNP esses neurônios são capazes de sintetizar vários peptídeos e ATP, o que sugere uma importante papel na modulação de várias funções fisiológicas (MESTIKAWY et al., 2011; PRADO et al., 2013). Certas doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica, afetam preferencialmente neurônios colinérgicos, evidenciando a importância no entendimento da neurotransmissão colinérgica para o avanço das estratégias terapêuticas (RIBEIRO et al., 2006). A acetilcolina é um neurotransmissor utilizado pelos motoneurônios da medula espinal e conseqüentemente é liberada em todas as junções neuromusculares de vertebrados (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2003).

A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal pré-sináptico de neurônios colinérgicos a partir da colina e da acetil-coenzima A (acetil-CoA) derivada do metabolismo mitocondrial, sendo que essa reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) (RIBEIRO et al., 2006). Essa enzima possui um papel crucial no processo de síntese de acetilcolina. Experimentos realizados em camundongos deficientes para a ChAT mostraram uma diminuição significativa na transmissão colinérgica (MISGELD et al., 2002). Esses camundongos mostraram redução da atividade de acetilação da enzima e abolição de registros eletrofisiológicos tanto para potenciais de placa motora em miniatura (MEPP) quanto para os potenciais evocados (EPP). Além disso, esses modelos mostraram um aumento da arborização dos terminais nervosos e uma alteração na distribuição dos receptores para a acetilcolina, que se encontram aumentados e mais espalhados ao longo da placa motora. Com relação ao músculo diafragma em si, esse modelo mostrou diminuição no diâmetro dos miotubos e aumento na contagem de núcleos centrais. Dessa forma, esses dados em conjunto mostram que a ChAT é muito importante para a formação e estabelecimento das terminações nervosas, bem como interfere no desenvolvimento da célula muscular (BRANDON et al., 2003; MISGELD et al., 2002;).

O suprimento de colina é provido pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1), responsável pela recaptação da colina para o terminal pré-sináptico, sendo este um

importante requisito para a manutenção da síntese de acetilcolina (RIBEIRO et al., 2006). Um suprimento constante e suficiente de colina nas terminações nervosas colinérgicas pode manter altos níveis de síntese e liberação de acetilcolina por um tempo prolongado (PRADO et al., 2002).

Dado o seu caráter catiônico, a ACh não se difunde de forma efetiva pelas membranas celulares, portanto se faz necessário um mecanismo de transporte para que essa molécula seja liberada para a fenda sináptica (PRADO et al., 2013). Dessa forma, após a síntese, a acetilcolina é armazenada dentro de vesículas sinápticas através do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT), uma proteína transmembrana de doze domínios (**FIGURA 8**). O VACHT faz parte de uma superfamília de proteínas de transporte, que inclui os transportadores vesiculares de monoaminas VMAT 1 e 2, que possuem um alto grau de similaridade com os segmentos transmembrana do VACHT (PARSONS, 2000; VARDY et al., 2004; PRADO et al., 2013) (**FIGURA 8**). Para a internalização das moléculas de ACh provenientes do citoplasma do terminal nervoso para dentro das vesículas sinápticas, o VACHT utiliza um gradiente eletroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) gerado por uma bomba, a H^+ -ATPase do tipo vacuolar (V- H^+ -ATPase), que troca dois prótons por uma molécula de acetilcolina (NGUYEN; COX; PARSONS, 1998; revisado por PRADO et al., 2002) (**FIGURA 8**). Essas bombas são bastante semelhantes, estrutural e funcionalmente, às bombas que sintetizam ATP, localizadas nas mitocôndrias e que regem a produção de energia. As V- H^+ -ATPases lançam mão da hidrólise do ATP para promover o transporte de H^+ para dentro das vesículas. Essas bombas não estão presentes apenas na membrana de vesículas sinápticas, mas também em endossomos, lisossomos e LDCVs (Large Dense Core Vesicles). O gradiente eletroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) é composto por um gradiente químico de pH (ΔpH) e também por um potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi$), gerado pela movimentação de cargas positivas para dentro da vesícula, podendo ser descrito pela seguinte equação: $\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\text{pH} + \Delta\psi$. Assim, o transporte de todos os neurotransmissores clássicos para dentro de vesículas sinápticas depende de ambos os componentes (HNASKO E EDWARDS, 2012). Assim sendo, fica claro que mecanismos que alterem a atividade e o tráfego do VACHT em terminais pré-sinápticos podem facilmente modificar a liberação de acetilcolina (PRADO et al., 2002).

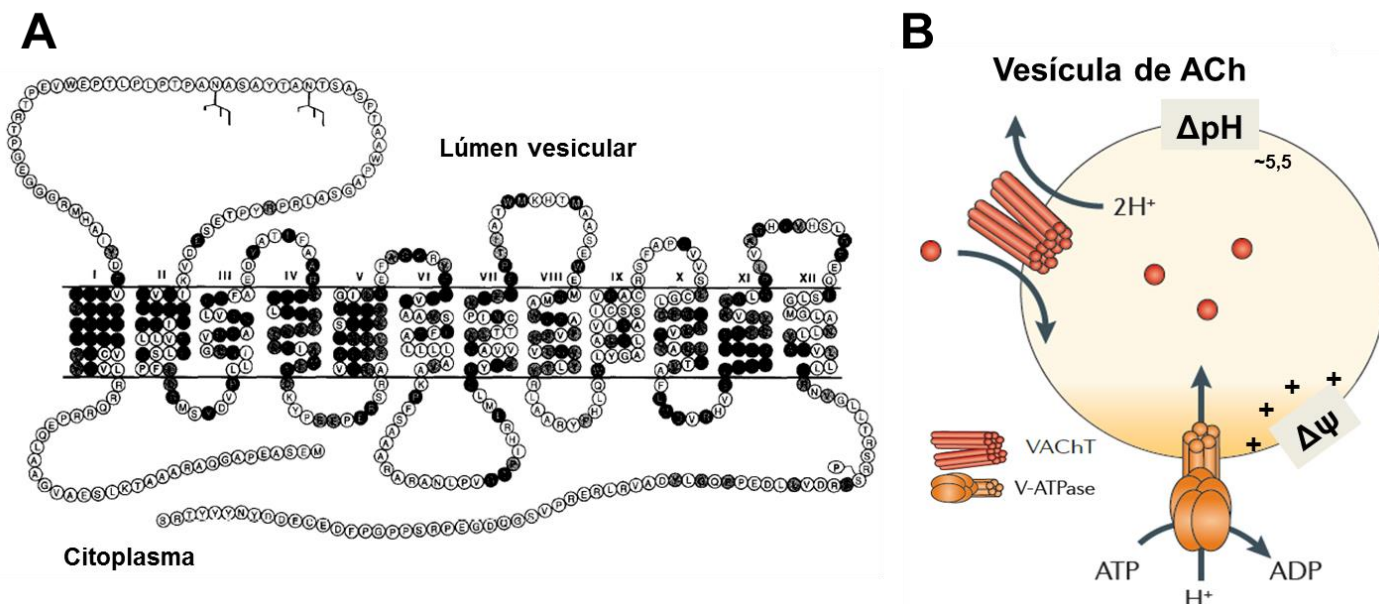


Figura 8: Sequência de aminoácidos com topologia prevista para o VACHT e Mecanismo de preenchimento das vesículas sinápticas com ACh via VACHT. (A). O VACHT humano possui 12 domínios transmembrana. Os símbolos em cinza indicam resíduos idênticos ao VACHT de *Caenorhabditis elegans*, rato e *torpedo*. Os símbolos em preto indicam os resíduos que são idênticos nos VMATs (USDIN *et al.*, 1995). **(B).** O preenchimento de vesículas sinápticas com ACh através do VACHT utiliza um gradiente eletroquímico ($\Delta\mu H^+$) gerado por uma V- H^+ -ATPase. Essa bomba acidifica o lúmen, criando um gradiente químico (ΔpH), e adiciona cargas positivas à membrana da vesícula, criando um potencial elétrico ($\Delta\psi$). Esse gradiente promove o movimento de dois íons H^+ para o citoplasma do terminal e a entrada de uma molécula de ACh (Adaptado de MESTIKAWY *et al.*, 2011).

A despolarização do terminal pré-sináptico leva à liberação da acetilcolina na fenda sináptica e ligação a receptores nicotínicos, desencadeando uma resposta pós-sináptica. Assim, a acetilcolina que foi liberada via exocitose de vesículas, após um curto intervalo de tempo, é rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Essa hidrólise promoverá a dissociação da colina do acetato, sendo a colina recaptada para o terminal pré-sináptico por meio de transporte ativo, para ser utilizada na síntese de novas moléculas de acetilcolina (**FIGURA 9**).

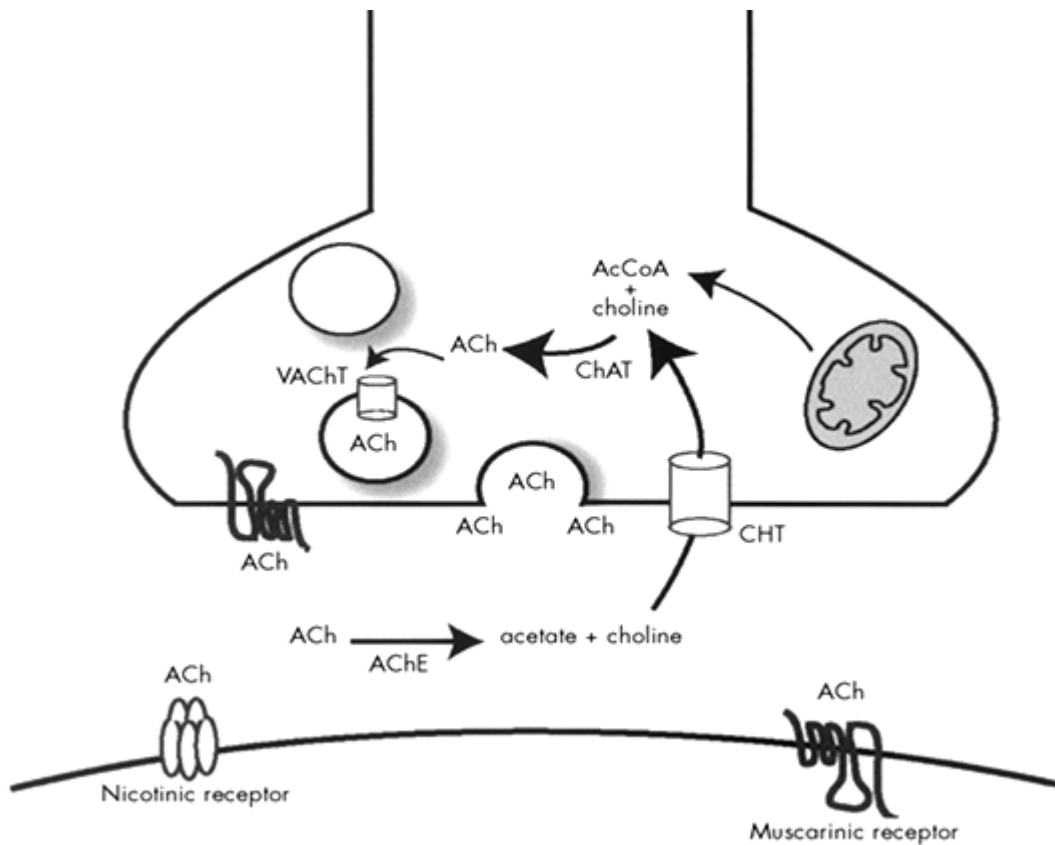


Figura 9: Síntese, armazenamento e liberação de acetilcolina. A acetilcolina é sintetizada no citoplasma do terminal nervoso, através da colina e da Acetil-CoA, este derivado do metabolismo mitocondrial. A reação de síntese da acetilcolina é promovida pela enzima Colina Acetiltransferase (ChAT). Após sua formação, a ACh é transportada para dentro de vesículas sinápticas através do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VAcHT). Após a despolarização do terminal nervoso e consequente liberação e exocitose de ACh, este neurotransmissor se ligará a receptores específicos na membrana pós-sináptica, desencadeando por exemplo, a contração muscular esquelética. Após sua ação, a ACh é degradada pela acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina. A colina por sua vez é recaptada para o interior do terminal nervoso através de seu transportador de colina de alta afinidade (CHT) sendo reutilizada na síntese de novas moléculas de ACh (*The American Psychiatric Publishing – Textbook of Psychopharmacology, fourth edition. Edited by Alan F. Schatzberg and Charles B. Nemeroff, 2009*).

Portanto, como um dos pontos mais críticos na neurotransmissão colinérgica reside, como já descrito, na internalização da acetilcolina via VACHT, para avaliar a participação e a importância funcional do VACHT na neurotransmissão colinérgica foi desenvolvida uma linhagem de camundongos que apresenta expressão reduzida (knockdown) do gene do transportador vesicular da acetilcolina (PRADO *et al.*, 2006). Análises por imunoblot revelaram uma redução de 40% na expressão do VACHT em camundongos heterozigotos enquanto nos homozigotos a redução foi de 70%. A menor expressão de VACHT não levou à morte dos animais geneticamente modificados, permitindo que os camundongos atingissem a idade adulta e possibilitando inclusive a realização de análise comportamental desses animais. Camundongos VACHT KD^{HOM}, em testes de força muscular, apresentaram significativa redução na resistência e força muscular quando comparados aos VACHT WT. A mesma equipe gerou também uma linhagem de camundongos com total remoção do gene do VACHT. Os camundongos knockout (deleção total do gene) para o transportador vesicular de acetilcolina morrem logo após o nascimento indicando que a liberação de acetilcolina armazenada em vesículas sinápticas pelo VACHT é essencial à sobrevivência (PRADO *et al.*, 2006).

Assim sendo, esse trabalho utilizará essa linhagem de camundongos para entender os possíveis efeitos causados pela menor liberação de ACh na morfologia de fibras musculares de contração lenta e rápida desses animais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar análise morfológica dos músculos Sóleo (SOL) e Extensor Longo dos Dedos (EDL) de camundongos adultos que apresentam uma redução na expressão do transportador vesicular de acetilcolina.

2.2. Objetivos Específicos

1) Realizar análise qualitativa das fibras musculares de contração rápida e lenta em camundongos VAcHT KD Heterozigotos, Homozigotos e VAcHT WT.

2) Realizar análise quantitativa de músculos de contração rápida e lenta através de morfometria, determinando o número total de fibras, a relação fibras/área, a área (CSA) e o perímetro de cada fibra em animais VAcHT KD Heterozigotos, Homozigotos e VAcHT WT.

3) Avaliar qualitativamente o padrão de expressão das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) em músculos de contração rápida e lenta em animais VAcHT KD Heterozigotos, Homozigotos e VAcHT WT.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População e amostra

A população foi constituída de camundongos machos, adultos (na idade de três meses) C57BL/6J selvagens (WT) e camundongos com alteração na expressão do VACHT (*knockdown*), gerados pela equipe do professor Marco Antônio Prado utilizando técnicas de recombinação homóloga baseadas no sistema Cre-LoxP (PRADO *et al.*, 2006; DE CASTRO *et al.*, 2009). Os camundongos foram obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, coordenado pela Profa. Silvia Guatimosim. A amostra foi constituída por no mínimo três animais para cada genótipo (3 animais WT e 3 animais VACHT KD^{HET} e 3 KD^{HOM}). Os animais foram genotipados através de PCR e eletroforese em gel de agarose. Os seguintes primers foram utilizados para seleção das regiões gênicas de interesse: P1 5' TCA TAG CCC CAA GTG GAG GGA GA 3'; P2 5' GGA ACT TCC TGA CTA GGG GAG GAG 3' e P3 5'GGT TCA TAT CCC CGA GCT CAG GAG 3' (FIGURA 10).

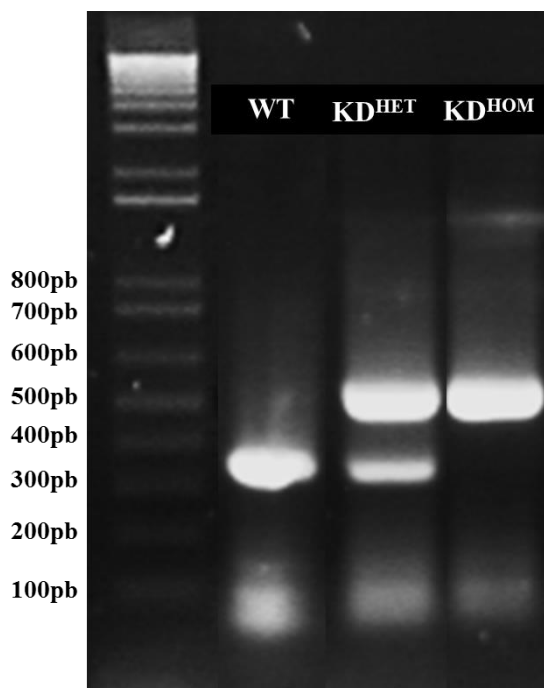


Figura 10: Imagem representativa do gel de agarose mostrando os genótipos utilizados neste trabalho. Os primers P1 e P3 amplificam as regiões de 336pb, que identificam os WTs. Os primers P1 e P2 amplificam a região de interesse que apresenta 495pb e seleciona os animais VACHT KD^{HOM}.

3.2 Obtenção dos músculos

Ao longo desse estudo, foram utilizados músculos diferentes que variam no padrão de expressão das isoformas da cadeia pesada de miosina, o que vai determinar a velocidade de contração das fibras musculares. Para o estudo em músculos de contração lenta (fibras tipo I) o músculo Sóleo (SOL) foi escolhido e, para avaliar os músculos de contração rápida (fibras tipo IIA, IIX e IIB), utilizamos o Extensor Longo dos Dedos (EDL). Ambos os músculos são extensivamente utilizados por diversos grupos de pesquisa que realizam esse tipo de trabalho. De acordo com a literatura, o SOL em camundongos apresenta uma porcentagem de fibras tipo I em torno de 40%, variando um pouco esse valor dependendo do estudo, e o EDL apresenta mais de 90% de fibras tipo II quando se soma as isoformas IIA, IIX e IIB (BLOEMBERG & QUADRILATERO., 2012).

Os camundongos foram sacrificados por dose letal de anestésico e os músculos de cada pata foram dissecados. Os músculos SOL e EDL de uma das patas foram fixados em solução de Glutaraldeído 4% diluído em tampão fosfato 0.1 M por 24 horas a 5°C, para histologia de rotina. Os músculos da pata contralateral foram coletados, posicionados em moldes plásticos e embebidos em solução criopreservante OCT (Sakura®), seguido de congelamento em freezer a -80°C até a criomicrotomia. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do CETEA-UFMG e estão registrados sob o protocolo número 073/03.

3.3 Histologia de rotina

Após a fixação, os músculos foram lavados 3x em solução PBS (0,1M). Em seguida, os músculos foram submetidos à desidratação em série ascendente de álcool (álcool 70%, 80%, 95% e mais um banho em 95%, 30 minutos cada). Após a desidratação, os músculos foram imersos em solução 1:1 de álcool 95% e resina glicol metacrilato (Leica HistoResin) por 24 horas a 5°C. Em seguida, as amostras foram infiltradas em resina pura (Leica HistoResin) para posterior inclusão. 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 nos moldes para 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). Cortes transversais dos músculos foram obtidos 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. 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 5 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.

3.4 Imunofluorescência

As amostras congeladas de tecido foram cortadas num criostato (Leica CM1850) localizado no laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental coordenado pela professora Rosa Esteves Arantes, do Departamento de Patologia, ICB, UFMG. Os cortes obtidos (10-20µm) foram transferidos para lâminas de vidro polarizadas (VWR®), as quais foram armazenadas em freezer a -20°C. Em cada lâmina, eram colocados no mínimo dois cortes tanto de WT quanto de VACHT KD^{HOM} e KD^{HET}, os quais foram marcados simultaneamente com os anticorpos primários. O controle negativo da técnica foi realizado através da omissão dos anticorpos primários em alguns cortes. As etapas seguintes do protocolo de marcação foram realizadas em câmara úmida. Os cortes passaram pela etapa de bloqueio de sítios inespecíficos com 3% BSA (Sigma), 5% soro de cabra (Sigma) e 0,1% Triton X-100 (Sigma) em PBS 1x por 30 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos anti-MyHC tipo I (Leica Novocastra na diluição 1:250 em 3% BSA e 5% soro de cabra) overnight a 4°C. As lâminas foram lavadas 3x em PBS 1x e então incubadas com o anticorpo secundário (Alexa 488 goat anti-mouse IgG1 - Invitrogen), na diluição 1:1000 em PBS/BSA 3% e soro de cabra 5%) por 1 hora em temperatura ambiente. Após nova lavagem 3x em PBS 1x os cortes foram montados em meio preservante da fluorescência (VectaShield).

3.5 Aquisição e análise das imagens

As imagens dos cortes de tecidos processados para histologia de rotina foram adquiridas utilizando um microscópio óptico Axioplan 2 Carl Zeiss (localizado no laboratório de Neurobiologia, Profa. Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB, UFMG) e Olympus BX61 (localizado no laboratório de Biologia das Interações Celulares, no Departamento de Morfologia do ICB, UFMG) acoplados a uma câmera CCD. Os cortes eram fotografados em sua totalidade utilizando uma objetiva de 20x. Para cada animal foram analisadas 2 a 3 seções por animal, o que gerava 6 a 9 cortes, considerando um N=3. Cada corte nos dava em torno de 7 imagens, dessa forma, por animal, analisávamos entre 14 e 21 imagens. Os cortes foram analisados utilizando os softwares Axiovision (Carl Zeiss) e Image J. Os seguintes dados morfométricos foram obtidos para cada músculo: número total de fibras, área de seção transversal (CSA) da fibras e perímetro da fibra. Os dados coletados foram armazenados no programa Microsoft Excel[®] e convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prisma 5.0. Utilizamos gráficos de dispersão para representação e a análise estatística foi realizada segundo Schertzer *et al.*, (2007)

As imagens de imunofluorescência foram obtidas em um microscópio de fluorescência Axioplan 2 Carl Zeiss (localizado no laboratório de Neurobiologia, Profa. Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB, UFMG) e Axio Imager A2 (localizado no Departamento de Farmacologia do ICB, UFMG) acoplado a uma câmera CCD. A fonte de luz utilizada para iluminar os cortes consistiu de lâmpada de mercúrio e para a coleta da luz emitida foi utilizado o filtro para FITC o qual seleciona o comprimento de onda adequado à excitação da sonda fluorescente acoplada ao anticorpo secundário Alexa 488 (Excitação/Emissão: 488/519) goat anti-mouse IgG1. Os cortes foram fotografados em objetiva de 20x (seca, com abertura numérica de 0,5) para a análise qualitativa.

3.6 Análise estatística

Segundo Schertzer *et al.*, (2007), as análises de Área de Seção Transversal (CSA) das fibras musculares podem ser mais bem representadas através de um gráfico de dispersão dos resultados. Normalmente, os valores de área para as fibras musculares apresentam uma grande variabilidade e, portanto não apresentam distribuição normal (não assumem uma distribuição Gaussiana), assim, seguindo esses autores, nós utilizamos a mediana dos valores para aplicar o teste estatístico que no caso foi o teste não paramétrico de mann-whitney. A análise

estatística do número de fibras musculares por músculo foi realizada pelo teste t-*Student* não pareado. As análises de fibras/área foram realizadas considerando os animais controle WT como sendo 100%, portanto, foi calculada a porcentagem dos outros genótipos em relação ao controle (% em relação ao controle) Os resultados foram considerados estaticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 As fibras musculares do Sóleo de animais VACHT KD não apresentam alterações em relação ao número de fibras totais, porém, os animais VACHT KD^{HOM} apresentam um menor número de fibras por área

Com o objetivo de avaliar se a redução na expressão do VACHT seria capaz de promover alguma mudança nas fibras musculares do Sóleo, nós realizamos análises qualitativas e quantitativas nesse músculo, tanto nos animais VACHT KD^{HET} quanto nos KD^{HOM}, os quais apresentam ~40% e ~65% de redução na expressão do VACHT, respectivamente (PRADO *et al.*, 2006). As análises eram sempre comparadas ao controle (WT). A **FIGURA 11 (A-C)** mostra imagens representativas de cortes transversais do músculo Sóleo dos três genótipos. Através de uma análise qualitativa já podemos perceber que as fibras musculares dos animais VACHT KD^{HET} apresentam maior tamanho em relação às do controle WT. Quando avaliamos as fibras musculares dos animais KD^{HOM} percebemos fibras ainda maiores. Qualitativamente, o músculo Sóleo dos animais WT parece apresentar mais fibras musculares em relação aos VACHT KD, porém, a quantificação do número de fibras musculares nos três genótipos não mostrou diferença estatística (**FIGURA 12A E B**). No entanto, os animais KD^{HOM} apresentaram uma menor relação de fibras musculares por área analisada ($p=0,005$) (**FIGURA 12D**). Os animais KD^{HET} não apresentam diferença estatística no número de fibras/área (Figura 12C). A tabela 3 sumariza esses achados.

VACHT	Número de Fibras Musculares	Relação Fibras/área (% do Controle)
WT	758,8±28,47	100
KD ^{HET}	815±36,50	93,67±8,59
KD ^{HOM}	754,3±43,90	76,19±3,31 ^a

Tabela 3: Resultado da análise quantitativa do músculo Sóleo. ^a diferença estatística em relação ao controle WT.

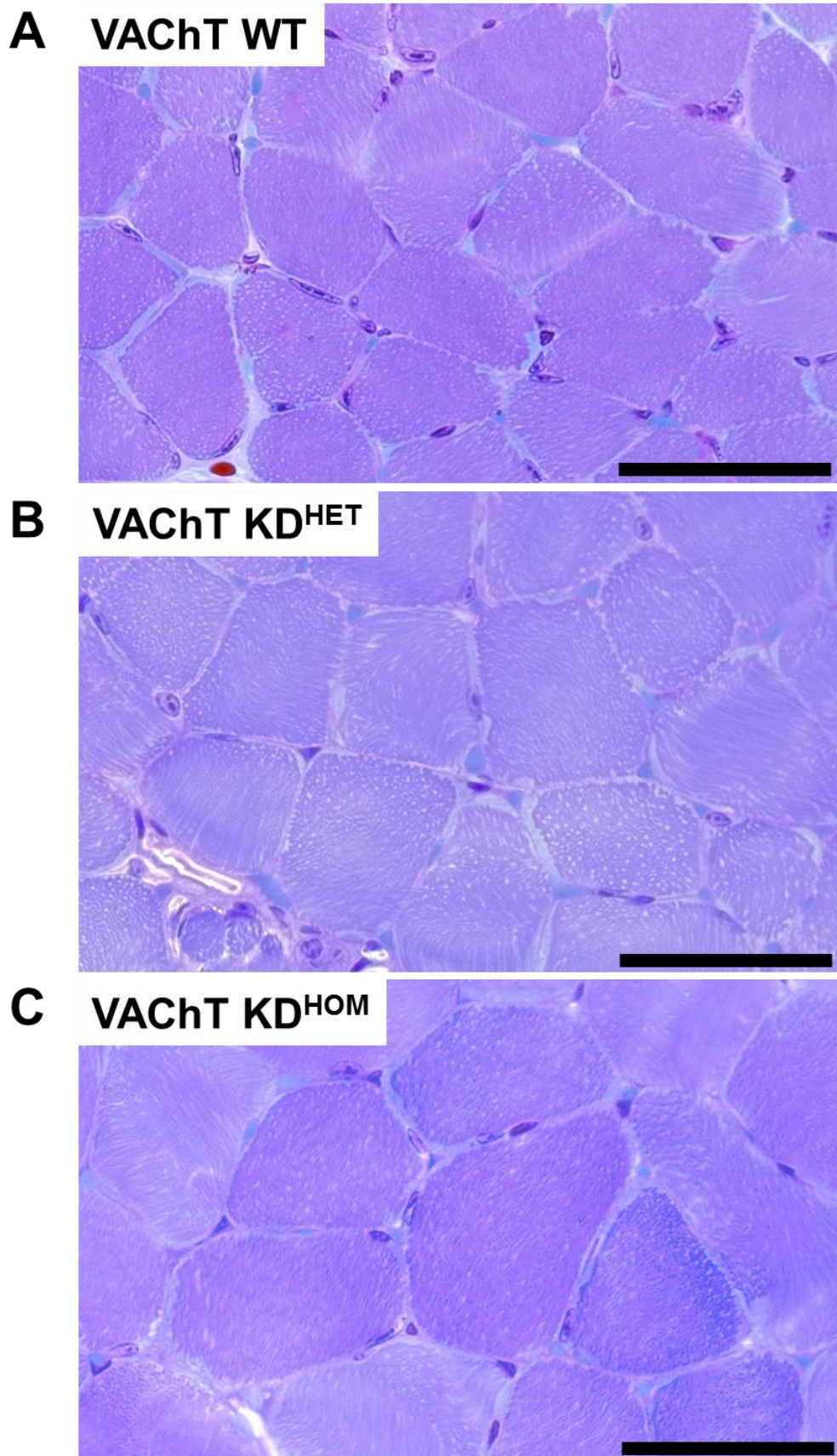


Figura 11: Imagens representativas de cortes transversais do músculo Sóleo de animais VACHT WT (A), KD^{HET} (B) e KD^{HOM} (C). Barra de escala: 100µm. Azul de toluidina. Aumento: 40x.

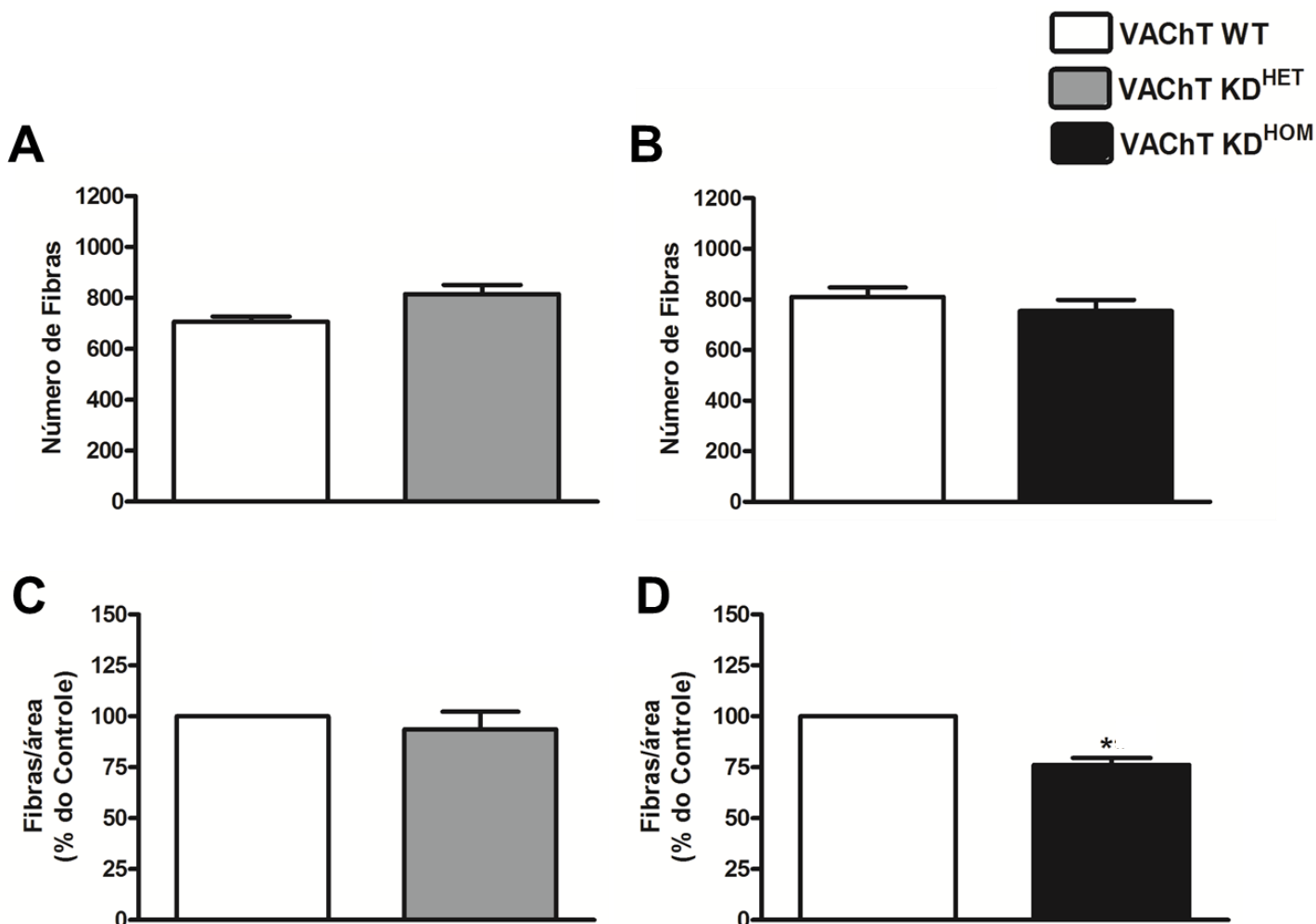


Figura 12: Os animais VACht KD^{HOM} apresentam alterações na análise quantitativa das fibras musculares no músculo Sóleo. (A e C). O número de fibras musculares bem como a relação de fibras/área dos animais KD^{HET} não apresentam diferenças estatísticas em relação ao controle WT. (B e D). Nos animais KD^{HOM} o número de fibras musculares não apresenta diferença estatística em relação ao controle. Entretanto, a relação fibras/área mostrou-se significativamente menor nos camundongos KD^{HOM}. [(Nós analisamos de 2-3 cortes por genótipo, N=3 animais por grupo experimental). Os resultados aqui apresentados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) *p<0,05].

4.2 O músculo Sóleo de camundongos VChT KD apresentam fibras musculares com maior área de secção transversa (CSA) e perímetro quando comparado aos camundongos controles WT

Uma vez que no item 4.1 nós mostramos que a redução na expressão do VChT nos animais VChT KD^{HOM} foi capaz de alterar a relação fibras/área no músculo SOL, nosso próximo passo foi realizar a análise da área de secção transversa (CSA) individual das fibras musculares e perímetro em animais KD^{HET} e KD^{HOM}, comparando sempre com os animais controles WT. Nossos resultados mostram que a média da área das fibras musculares dos animais KD^{HET} (% do controle), não é diferente da dos animais WT (**FIGURA 13A**), no entanto, quando se faz análise dos resultados de CSA por dispersão e do perímetro das fibras musculares nesses animais, observa-se um maior número de fibras musculares com maior CSA em relação ao músculo dos animais controles WT (**FIGURA 13B E C**). Por sua vez, ao analisar a média da área das fibras musculares dos animais KD^{HOM} (% do controle), verifica-se que esses animais apresentam fibras musculares ainda maiores em relação aos KD^{HET} apesar da diferença entre WTxKD^{HET} não ser estatisticamente significativa ($p=0,4652$). Entretanto, ao se fazer a análise por dispersão, a CSA das fibras do KD^{HOM} é significativamente diferente da CSA do músculo dos controles WT ($p= 0,0139$) (**FIGURA 13A**). A dispersão dos resultados de CSA e perímetro e a mediana desses valores mostra um grande número de fibras significativamente maiores que aos controles WT (**FIGURA 13B E C**). A tabela a seguir, sumariza os resultados encontrados.

VChT	Média da área (% em relação ao Controle)	Mediana da CSA (μm^2)	Mediana do Perímetro (μm)
WT	100	749,8	103,8
KD ^{HET}	108,2 \pm 9,15	792,2 ^a	107,2 ^a
KD ^{HOM}	132,3 \pm 6,22 ^a	979 ^a	125,4 ^a

Tabela 4: Resultado da análise da área e perímetro das fibras musculares do Sóleo nos três genótipos. A mediana para CSA e perímetro foi aqui representada, uma vez que esta é a medida mais adequada para representação de valores de fibras musculares que apresentam grande variabilidade. ^a diferença estatística em relação ao controle WT.

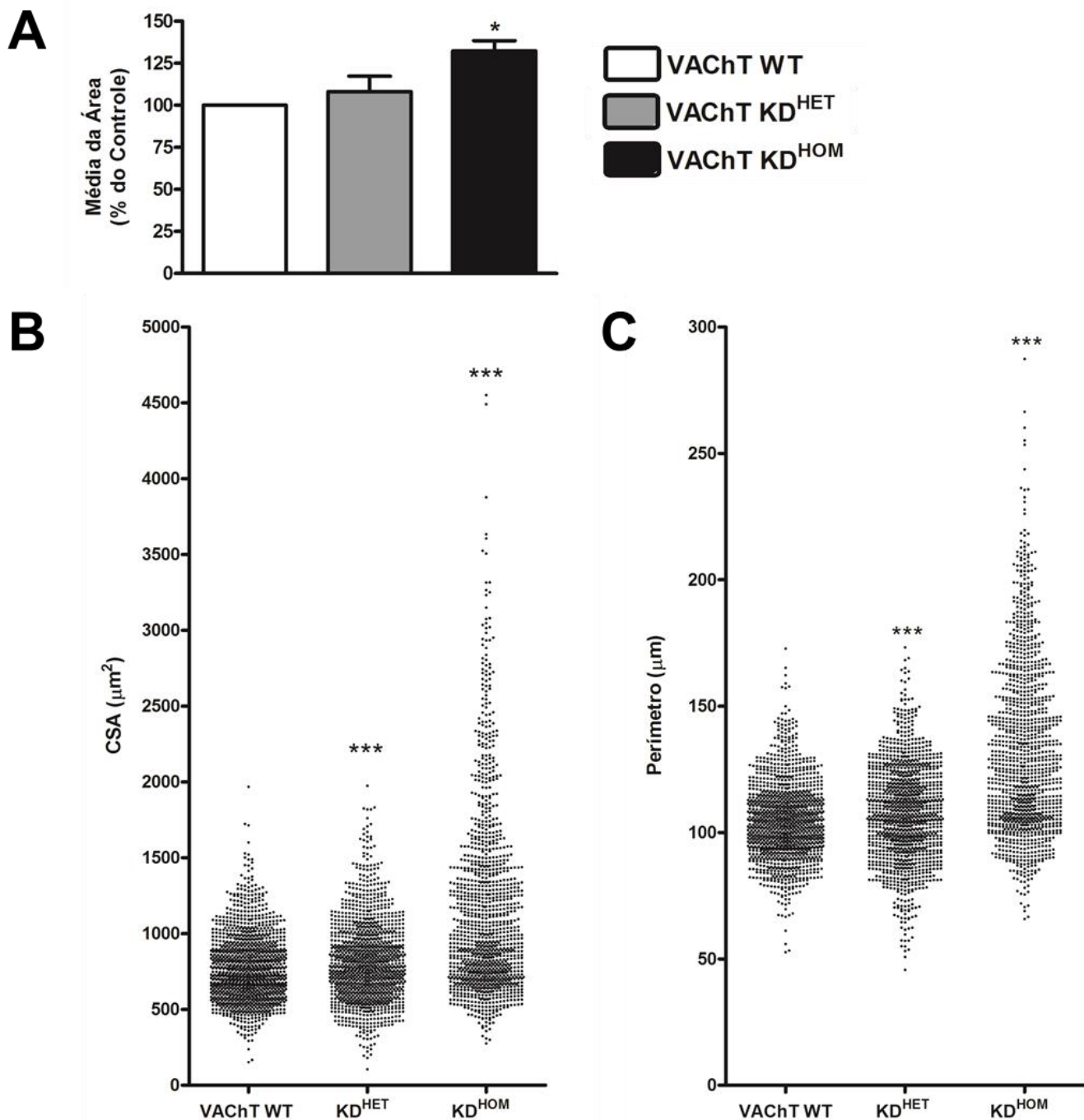


Figura 13: O músculo Sóleo dos animais VACHT KD apresenta fibras musculares com maiores CSA e perímetro. (A). Gráfico de barras mostrando que a média da área (calculada em % em relação ao controle) dos animais KD^{HOM} é significativamente maior que as fibras musculares dos animais WT. A dispersão dos resultados (B e C) para a CSA e perímetro dos KD^{HOM} mostram fibras com maior tamanho em relação ao controle. Analisando as fibras dos animais KD^{HET}, percebem-se também fibras maiores em relação ao controle. (Para esta representação, foram analisadas 1187 fibras musculares para os três genótipos, N=3 animais por grupo experimental. *p<0,05 e ***p<0,0001).

4.3 O músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL) de animais KD^{HOM} apresenta um maior número de fibras musculares quando comparado ao de animais VACHT WT.

Os resultados anteriores mostram que as fibras musculares do Sóleo sofrem alteração em virtude da redução na expressão do VACHT nos camundongos KD^{HOM} . É importante lembrar que, em camundongos, o músculo Sóleo, sendo postural, apresenta a grande maioria de suas fibras de contração lenta (tipo I), sendo, portanto, um músculo muito requisitado na manutenção postural. Entretanto, o músculo Extensor longo dos Dedos é apenas recrutado em situações específicas, em que existe a necessidade de um movimento rápido e de explosão. Assim, esse músculo é composto em sua grande maioria por fibras de contração rápida (tipo II).

Em relação a esse músculo, apenas por uma análise qualitativa já podemos perceber que as fibras musculares dos animais KD^{HOM} apresentam-se visivelmente menores quando comparado às do seu controle WT (**FIGURA 14**). Quando realizamos a quantificação do número de fibras e a relação fibras/área (% em relação ao controle), não foi observada nos animais KD^{HET} diferença estatística nessas duas análises, entretanto, os animais KD^{HOM} apresentaram um maior número de fibras musculares em relação ao controle WT que alcançou significância estatística ($p=0,039$) (**FIGURA 15**). Observamos ainda uma tendência, porém sem significância estatística dos animais KD^{HOM} , em apresentarem maior número de fibras/área em relação ao controle (**FIGURA 15**). A tabela 5 sumariza essas observações.

VACHT	Número de Fibras Musculares	Relação Fibras/área (% do Controle)
WT	563,1±41,15	100
KD^{HET}	620,8±46,46	93,53±9,74
KD^{HOM}	715,8±29,40 ^a	146±15,92

Tabela 5: Resultado da análise quantitativa do músculo EDL. ^a diferença estatística em relação ao controle WT.

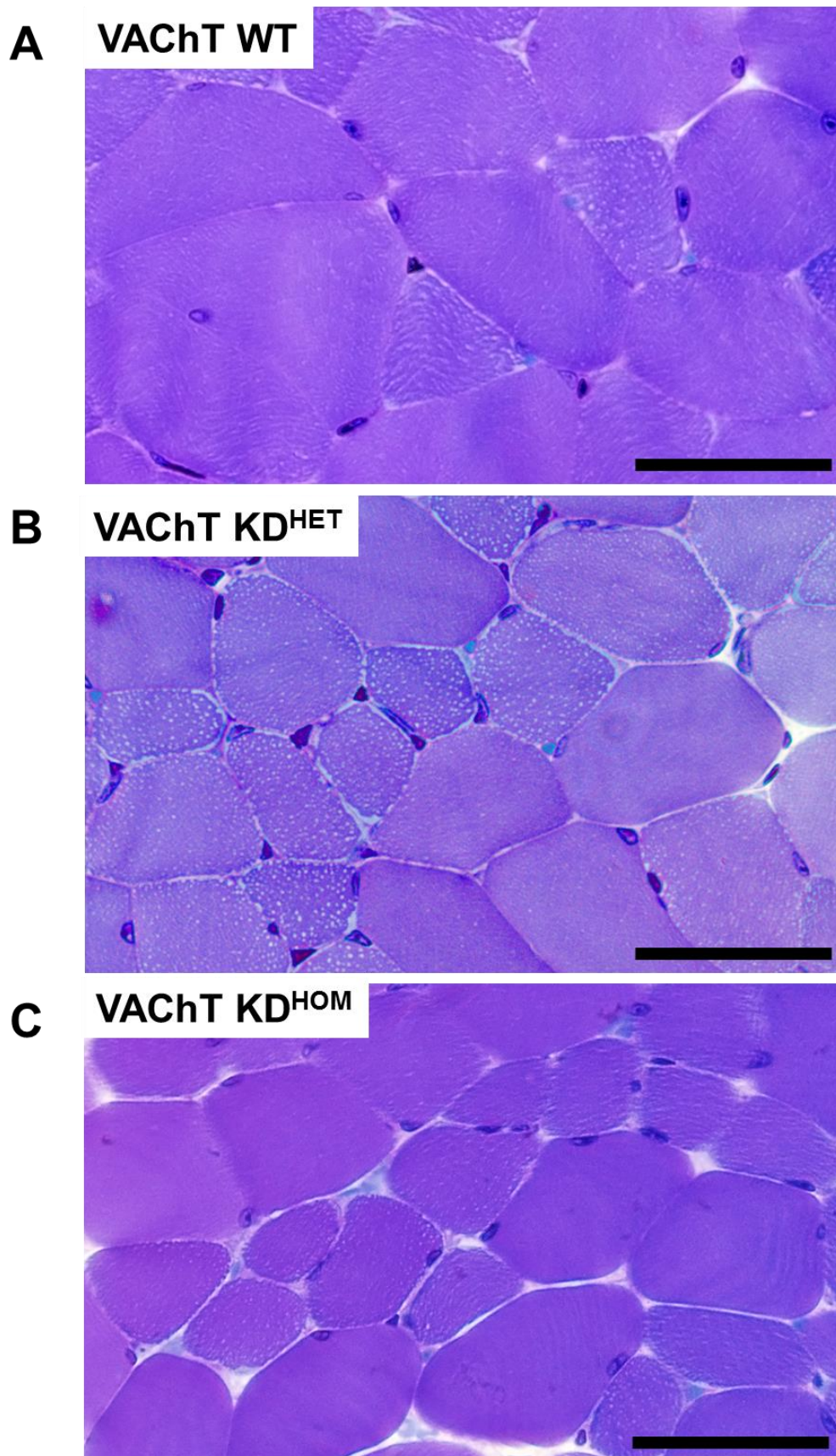


Figura 14: Imagens representativas de cortes transversais do músculo EDL de animais VACHT WT (A), KD^{HET} (B) e KD^{HOM} (C). Barra de escala: 100µm. Azul de toluidina. Aumento: 40x.

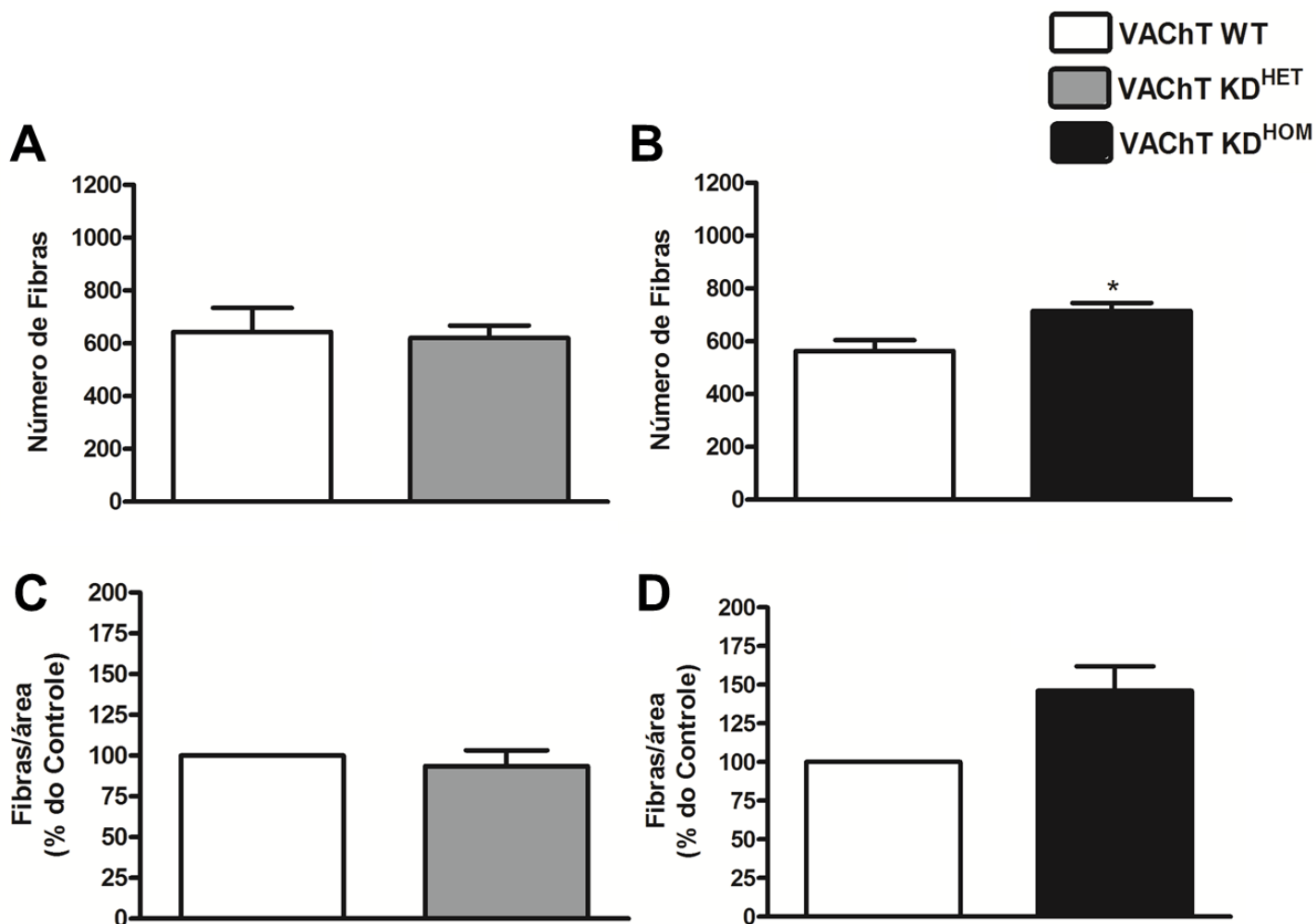


Figura 15: A análise quantitativa do músculo EDL nos animais VACht KD^{HOM} mostra um impacto na musculatura pela menor liberação de acetilcolina. (A e C). O número de fibras musculares bem como a relação de fibras/área dos animais KD^{HET} não apresentam diferença estatística em relação ao controle WT. (B e D). Nos animais KD^{HOM} o número de fibras musculares encontra-se aumentado em relação ao controle. A relação fibras/área mostrou uma tendência de estar aumentada nos camundongos KD^{HOM}, porém, sem significância estatística. [(Nós analisamos de 2-3 cortes por genótipo, N=3 animais por grupo experimental). Os resultados aqui apresentados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) * $p < 0,05$].

4.4 O músculo EDL de camundongos VChT KD apresentam fibras musculares com menor área de secção transversal (CSA) e perímetro quando comparado aos de camundongos controles WT

Uma vez demonstrado acima que nos animais KD^{HOM} o músculo EDL apresenta um maior número de fibras quando comparado ao seu controle, nós nos perguntamos se esse aumento seria acompanhado por alterações na CSA e perímetro. A fim de responder essa pergunta, nós medimos as fibras musculares em secções transversais do músculo EDL em ambos os genótipos. Nós observamos que o músculo EDL dos animais KD^{HOM} apresenta fibras com menores áreas, CSA e perímetro em relação às do controle WT (**FIGURA 16**). Ambas as análises da média da área (% em relação ao controle) e CSA e Perímetro alcançaram significância estatística, com $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ respectivamente. O músculo EDL dos animais KD^{HET} não apresentou diferença estatística em ambas as análises (**FIGURA 16 B e C**).

A tabela 6 sumariza os resultados encontrados.

VChT	Média da área (% em relação ao Controle)	Mediana da CSA (μm^2)	Mediana do Perímetro (μm)
WT	100	885	109
KD^{HET}	108,6 \pm 11,30	934	116
KD^{HOM}	68,03 \pm 6,48 ^a	699 ^a	101 ^a

Tabela 6: Resultado da análise da área e perímetro das fibras musculares do EDL nos três genótipos. A mediana para CSA e perímetro foi aqui representada, uma vez que esta é a medida mais adequada para representação de valores de fibras musculares que apresentam grande variabilidade. ^a diferença estatística em relação ao controle WT.

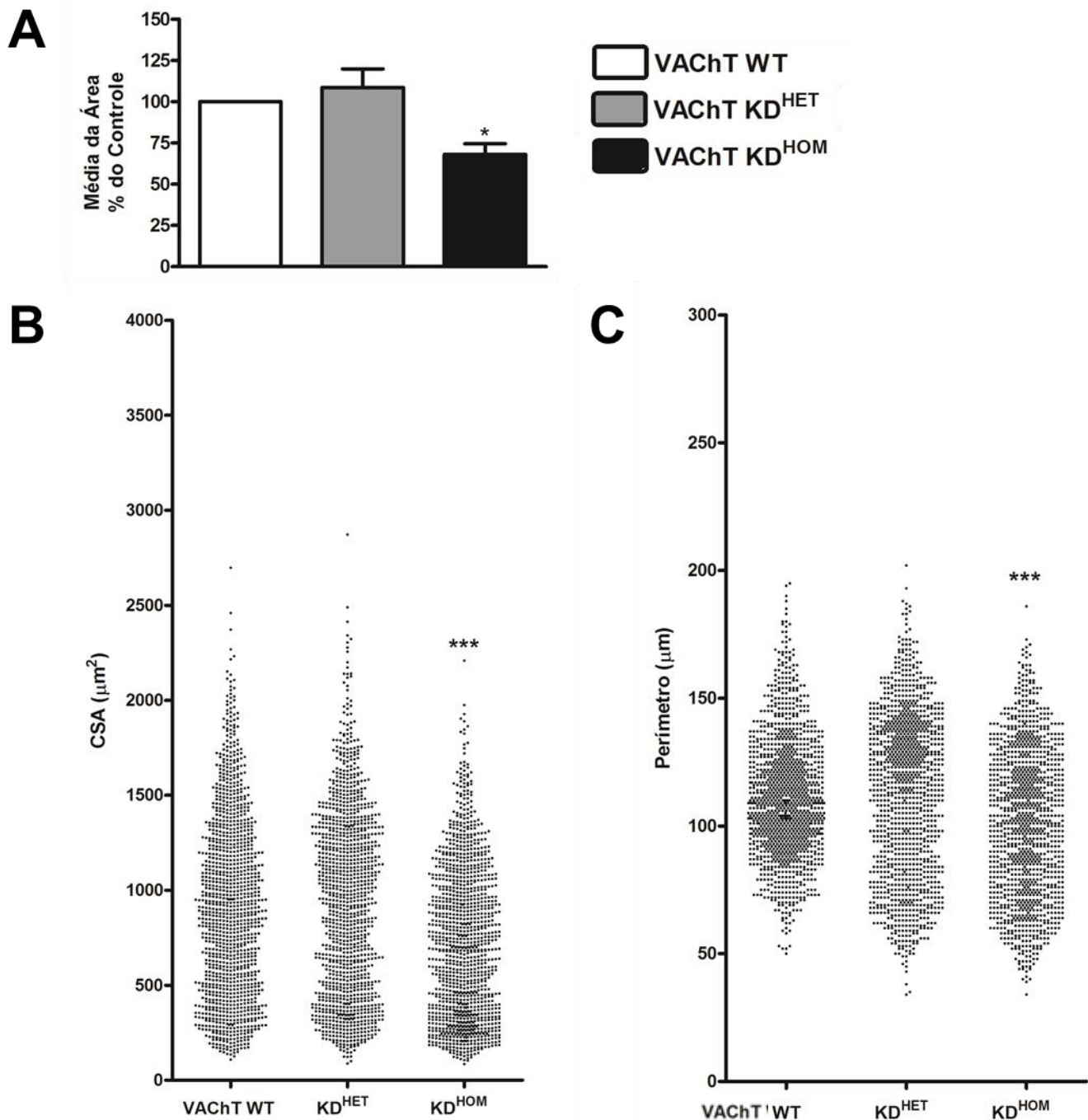


Figura 16: O músculo EDL dos animais VACHT KD apresenta fibras musculares com menores CSA e perímetro. (A). Gráfico de barras mostrando que a média da área (calculada em % em relação ao controle) dos animais KD^{HOM} é significativamente menor que as fibras musculares dos animais WT. A dispersão dos resultados **(B e C)** para a CSA e perímetro dos KD^{HOM} mostram fibras com menor tamanho em relação ao controle. As fibras dos animais KD^{HET} não apresentam diferença em relação ao controle WT. (Aqui estão representadas as análises de 1183 fibras musculares para os três genótipos, N=3 animais por grupo experimental. *p<0,05 e ***p<0,0001).

4.5 Avaliação qualitativa das fibras musculares do Sóleo e Extensor Longo dos Dedos (EDL) de animais VAcHT WT, KD^{HET} e KD^{HOM}, marcadas com anticorpo anti- MyHC tipo I.

Uma vez que nós demonstramos que a redução na expressão do VAcHT foi capaz de alterar a morfologia das fibras musculares do Sóleo e EDL nos camundongos VAcHT KD^{HOM}, nosso próximo objetivo foi avaliar se essa redução na neurotransmissão colinérgica poderia alterar o padrão de expressão das isoformas da MyHC e assim modificar as características bioquímicas e fisiológicas das fibras musculares.

Durante as primeiras semanas do desenvolvimento pós-natal, a grande maioria dos músculos esqueléticos (mesmo aqueles que expressarão de forma predominante a isoforma do tipo II) expressam a isoforma do tipo I, sendo esta, portanto, uma isoforma inicial. É importante ressaltar que a atividade motora neuronal exerce uma grande influência na determinação final das isoformas que serão expressas (AGBULUT, 2003, CONDON *et al.*, 1990). Levando-se em conta então esse fato, será que nesses animais que apresentam significativa diminuição do VAcHT (KD^{HET} e KD^{HOM}) e conseqüentemente liberam menos ACh, ocorreria uma alteração no padrão de expressão das isoformas? A diminuição na expressão do VAcHT levaria a um aumento da expressão da isoforma lenta tipo I, semelhante ao que ocorre com as fibras no início do desenvolvimento pós-natal? Para responder a essa pergunta nós realizamos experimentos de imunofluorescência em cortes transversais do músculo Sóleo e EDL de animais VAcHT WT, KD^{HET} e KD^{HOM} utilizando um anticorpo específico para a isoforma tipo I. A **FIGURA 17** mostra cortes transversais do músculo SOL dos diferentes genótipos. A **FIGURA 17A** mostra um corte do SOL onde foi omitido o anticorpo primário, funcionando como controle negativo da técnica. As **FIGURAS 17 B, C e D** mostram respectivamente cortes transversais do SOL de camundongos WT, KD^{HET} e KD^{HOM}, marcados com o anticorpo tipo I. A **FIGURA 18A** mostra um corte transversal em que foi omitido o anticorpo primário. A **FIGURA 18 B, C e D** mostra respectivamente cortes transversais do EDL dos camundongos WT, KD^{HET} e KD^{HOM}, marcados com o anticorpo Leica Novocastra NCL anti-MyHC tipo I. Avaliando algumas imagens do músculo EDL nos animais KD^{HOM}, parece haver mais fibras musculares marcadas com o anticorpo tipo I, porém, uma análise mais extensa, utilizando maior número de secções por animal, será necessária a fim de responder este questionamento.

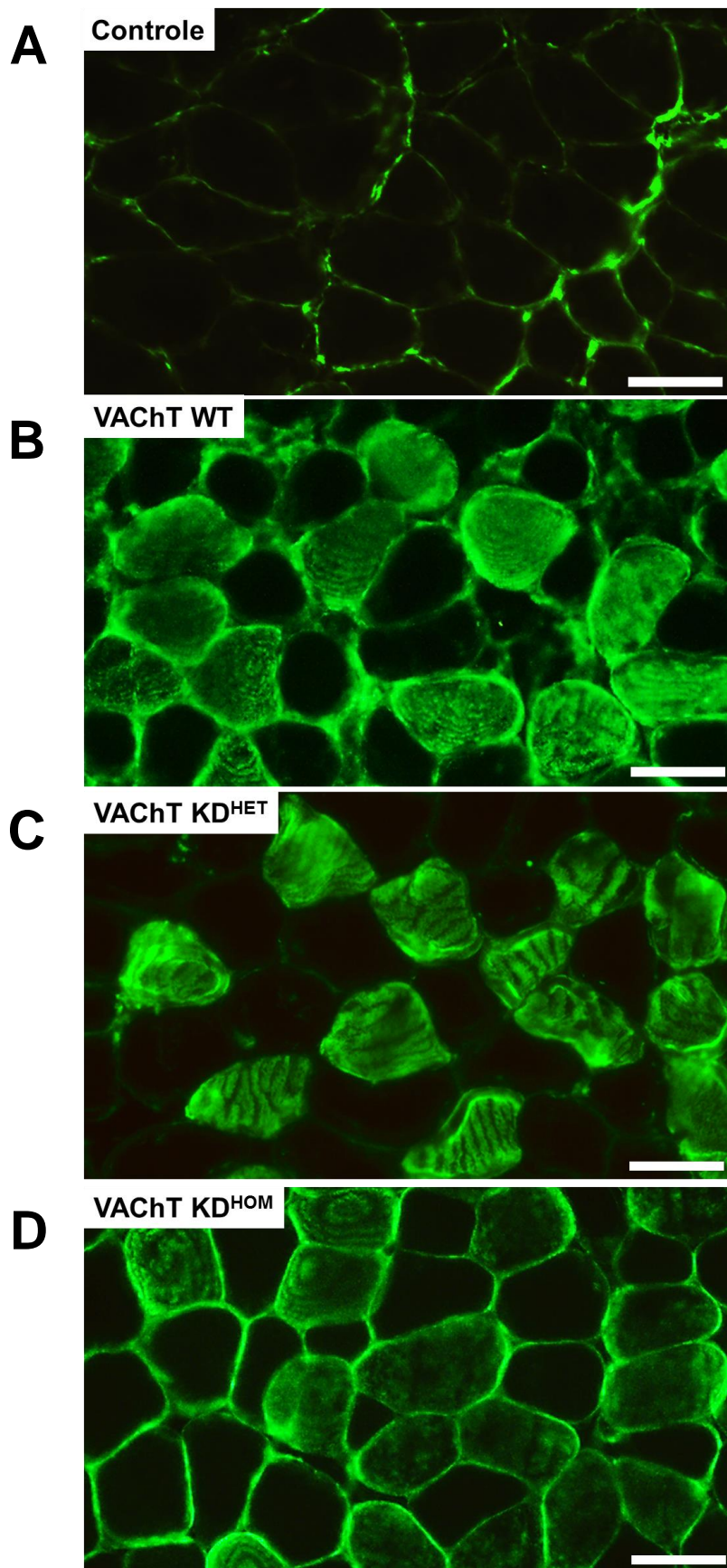


Figura 17: Imagens representativas da marcação do músculo Sóleo de animais VAcHt WT, KD^{HET} e KD^{HOM} com anticorpo anti-MyHC tipo I. A primeira imagem é um controle negativo em que o anticorpo primário foi omitido. Barra de escala: 50µm. Aumento: 20x

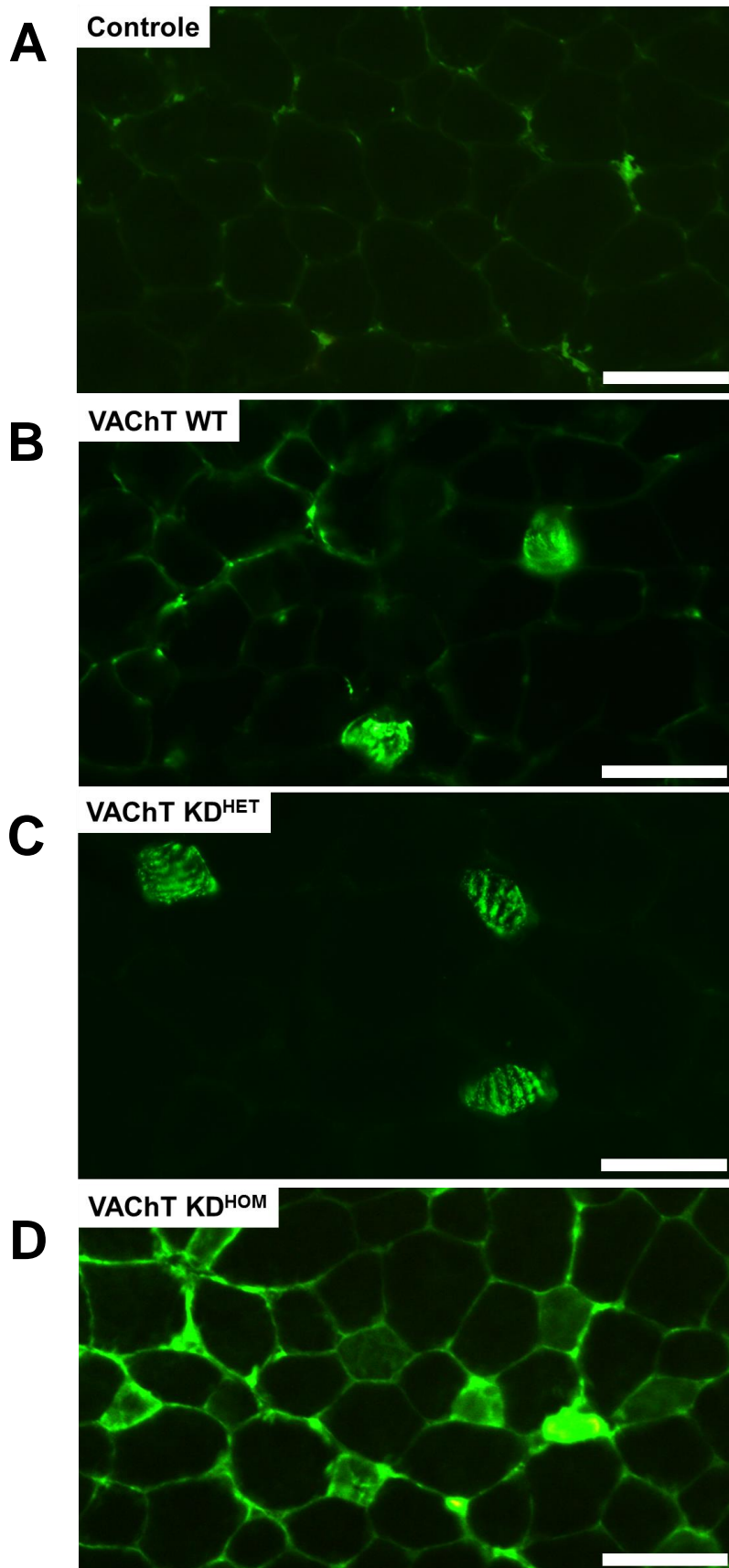


Figura 18: Imagens representativas da marcação do músculo EDL de animais VACHT WT, KD^{HET} e KD^{HOM} com anticorpo anti-MyHC tipo I. A primeira imagem é um controle negativo em que o anticorpo primário foi omitido. Barra de escala: 50µm. Aumento: 20x

5. DISCUSSÃO

As fibras musculares são altamente heterogêneas e essa característica agrega grande flexibilidade ao músculo, permitindo que um mesmo músculo possa ser utilizado para várias tarefas, incluindo atividades contínuas de baixa intensidade (controle postural), contrações musculares submáximas em repetição (locomoção) e contrações musculares fortes e rápidas (corridas, saltos e chutes). Além dessa característica, as fibras musculares são capazes de alterar suas propriedades estruturais e funcionais em resposta a vários estímulos (fisiológicos ou patológicos), sendo que essas alterações em conjunto determinam o fenótipo das fibras (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). Dentre esses fatores, podemos citar: (A) alterações na carga aplicada ao músculo, incluindo suspensão de membro posterior, tenotomia (secção de tendão), imobilização muscular em condições de encurtamento ou extensão e remoção de músculo agonista; (B) atividade e inatividade, incluindo treinamento de resistência, ausência de treinamento, desuso, repouso, suspensão unilateral de membros, microgravidade e voos espaciais e hibernação; (C) regulação hormonal, incluindo os hormônios da tireoide, glicocorticoides, testosterona e agonistas beta adrenérgicos; (D) oxigênio e disponibilidade de substratos, incluindo jejum, diabetes, dieta com alta concentração de lipídeos e hipóxia; (E) por último, porém de grande relevância para o estabelecimento e manutenção do fenótipo muscular, temos fatores relacionados ao padrão de disparo dos motoneurônios ou estimulação elétrica, assim nesse grupo, temos as seguintes condições: reinervação cruzada, padrão neural de estimulação, desnervação e transecção da medula espinhal. Essas propriedades conferem plasticidade à musculatura esquelética (BLAAUW, SCHIAFFINO, REGIANNI, 2013).

Com relação ao componente nervoso, temos que alterações no músculo são capazes de modificar a distribuição dos diferentes tipos de fibras e induzir adaptações estruturais e funcionais na JNM (JIN; WERNING; WITZEMANN, 2008). De fato, Chakkalakal e colaboradores (2010) confirmaram essa observação ao mostrar a influência retrógrada das fibras musculares, alterando o padrão de inervação de motoneurônios. Ainda fortalecendo essa hipótese, foi demonstrado que modificações no padrão de estimulação elétrica nas fibras musculares de diferentes músculos (rápidos ou lentos) são capazes de induzir modificações na expressão da MyHC e ainda modificar as características de disparo dos motoneurônios (BEWICK, 2003; CICILIOT & SCHIAFFINO, 2010).

A transmissão sináptica muscular só é possível quando o neurotransmissor ACh é liberado na fenda sináptica, se liga a receptores nicotínicos e desencadeia a contração muscular. A ACh foi a primeira substância química a ser identificada como neurotransmissor,

e vários trabalhos na literatura já relataram modelos animais que apresentam abolição de uma enzima necessária a síntese de ACh, a ChAT. Nesses modelos foi possível observar claramente que essa enzima exerce um papel crucial no desenvolvimento da JNM bem como de suas conexões. Além disso, esses modelos mostraram modificações na estrutura da célula muscular, apresentando diminuição no diâmetro dos miotubos e aumento na contagem de núcleos centrais, fatores esses capazes de alterar o fenótipo das fibras musculares (BRANDON et al., 2003; MISGELD et al., 2002; PRADO et al., 2013).

Outro fator que pode alterar a neurotransmissão colinérgica reside na interferência do VACHT, uma proteína de transporte que reside na membrana das vesículas sinápticas e é responsável por armazenar a ACh dentro das mesmas. A diminuição do VACHT já foi reportada em várias doenças, como Alzheimer, doença de Huntington, sepse e hipertensão. Assim sendo, vários modelos de animais geneticamente modificados que interferem com o VACHT foram gerados, o que trouxe novas maneiras de se entender como mudanças nessa proteína afeta a liberação de neurotransmissores (PRADO et al., 2013).

Dessa forma, este trabalho de forma inédita visa entender o que ocorre com as fibras musculares (componente pós-sináptico), num modelo animal em que há redução crônica na liberação de ACh via menor expressão do VACHT. Prado e colaboradores (2006) criaram a ferramenta que possibilitou que esse estudo fosse realizado, bem como de outros trabalhos. Esses pesquisadores geraram através de recombinação homóloga uma linhagem de camundongos que apresentam uma redução em torno de 40% (VACHT KD^{HET}) e 70% (VACHT KD^{HOM}) na expressão dessa proteína. Os resultados desse trabalho mostraram que esses animais são miastênicos e apresentam déficit cognitivo e social. Porém, um resultado desse trabalho foi de grande interesse para nós, uma vez que foi demonstrado que esses animais (VACHT KD^{HOM}), quando submetidos a testes de resistência física e força, mostraram uma importante diminuição na função muscular. Esses mesmos animais, quando tratados com uma droga (piridostigmina) que não atravessa a barreira hemato-encefálica e que inibe a AChE, demonstraram uma reversão do déficit muscular, indicando portanto, que as alterações musculares observadas eram devidas realmente a um comprometimento na transmissão sináptica periférica (PRADO *et al.*, 2006).

Baseado nos dados descritos acima, neste trabalho nós avaliamos os efeitos da liberação reduzida de ACh induzida pela redução na expressão do VACHT (animais VACHT KD^{HET} e KD^{HOM}), na morfologia das fibras musculares pertencentes a músculos exclusivos de contração lenta (Sóleo) e rápida (Extensor Longo dos Dedos). Para tanto, nós lançamos mão das técnicas de histologia de rotina e imunofluorescência para entender possíveis alterações

que poderiam ocorrer com a musculatura esquelética desses animais. De Catro *et al.* (2009), utilizando um modelo animal em que o gene do VACHT foi eliminado (VACHT^{del/del}), mostraram a perda da arquitetura normal das fibras musculares do músculo gastrocnêmio, indicando o que poderíamos encontrar nos animais VACHT KD. É importante ressaltar que o estudo pós-natal desses animais (VACHT^{del/del}) é inviabilizado, pelo fato dos mesmos morrerem logo após o nascimento devido a paralização do músculo diafragma, o que torna esse modelo *Knockdown* (KD) para o VACHT de grande interesse. Outros resultados importantes a partir do nosso grupo de pesquisa, mostraram que a menor expressão do VACHT é capaz de interferir com a morfologia, bem como com a distribuição de vesículas sinápticas e que a redução no conteúdo de ACh é importante para manter a forma das mesmas em terminais motores do músculo diafragma (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Dessa forma, utilizando camundongos machos na idade adulta (3 meses) nós coletamos os músculos SOL e EDL para a realização desse estudo.

Considerando que o músculo SOL, de contração lenta, é constantemente recrutado para manutenção postural, nós nos perguntamos: quais seriam as consequências para este músculo quando submetido a uma condição onde ocorre menor liberação de ACh? Inicialmente nós investigamos se a menor expressão do VACHT nesse músculo em animais (VACHT KD^{HET} e KD^{HOM}) seria capaz de alterar o número total de fibras e da relação fibras/área em cortes transversais do músculo SOL. Como mostrado na figura 12 A e B, o número total de fibras musculares dos animais KD^{HET} e KD^{HOM} mostrou-se semelhante em ambos os genótipos, porém, de forma interessante a redução em torno de 70% na expressão do VACHT nos animais KD^{HOM} levou a uma redução na relação fibras/área em relação ao controle na ordem de 25% (figura 12C). Os animais KD^{HET} por sua vez não apresentaram diferença significativa em relação aos WT (figura 12B). Isso significa uma possível redução na área total de circunferência do músculo.

Em seguida, avaliamos os mesmos parâmetros no músculo EDL, que por sua vez, apresenta mais de 90% de suas fibras do tipo II (BLOEMBERG & QUADRILATERO, 2012) e é raramente recrutado. É apenas utilizado quando existe a necessidade de geração de força, o que ocorre em atividades como corrida, por exemplo. Ao analisarmos os parâmetros de número total de fibras e distribuição de fibras/área nós encontramos que o número de fibras do músculo EDL de camundongos VACHT KD^{HOM} encontrava-se significativamente superior aos animais WT (figura 15B). A distribuição de fibras/área mostrou uma forte tendência a um aumento nessa relação (figura 15D) nos animais KD^{HOM}. Esses dados mostram dessa forma, que os animais KD^{HOM} apresentam mais fibras musculares, sugerindo, portanto um processo

de hiperplasia. Uma análise posterior, com marcadores para proliferação celular, pode ser sugerida.

Ao analisarmos qualitativamente as fibras musculares do SOL (figura 11), bem como as fibras do EDL (figura 14) nesses animais (KD^{HET} e KD^{HOM}) percebemos fibras maiores ($SOL\ KD^{HET}\ KD^{HOM}$) e menores ($EDL\ KD^{HOM}$) em relação ao controle, sendo as fibras do SOL nos animais KD^{HOM} ainda maiores que os KD^{HET} . Uma vez que verificamos que o SOL apresentou redução na distribuição de fibras/área e no EDL ocorreu um aumento na contagem de fibras, nós nos perguntamos se as alterações aqui observadas em relação à quantificação das fibras em ambos os músculos, seriam acompanhadas também por alterações na área e perímetro das fibras destes músculos nos animais VChT KD. Essas análises poderiam adicionalmente, indicar sinais de hipertrofia ou atrofia.

Dessa forma, nós realizamos uma análise por meio de morfometria e mensuramos a CSA e perímetro das fibras musculares do SOL e do EDL em ambos os genótipos. Trabalhos na literatura mostram que no músculo SOL, quando submetido a um processo de desnervação, as fibras musculares de forma geral entram em processo atrofico, com redução da CSA, assim como durante o envelhecimento, em condições patológicas como na SMA (Atrofia Muscular Espinhal), ALS e em condições em que o membro posterior é suspenso, o que promove diminuição na carga aplicada (SCHMALBRUICH, AL-AMOOD, LEWIS. 1990; MACPHERSON, WANG, GOLDMAN, 2011; PURVES-SMITH et al., 2012; KYPAROS et al., 2005; LEE et al., 2011; AGBULUT et al., 2009; DEFORGES et al., 2009). No entanto, os resultados das análises confirmaram nossa observação de que realmente as fibras musculares desse músculo nos animais KD^{HET} E KD^{HOM} tinham maiores CSA e perímetro (figura 13A, B e C) quando comparado aos animais WT. As fibras musculares dos animais KD^{HOM} mostraram valores ainda maiores de CSA e perímetro. Apesar desse resultado ir de encontro a vários trabalhos na literatura, existem trabalhos que relatam hipertrofia muscular como um evento que ocorre pouco tempo depois ao processo de desnervação. Por exemplo, Miledi e Slater (1969) e Kernell (2006) relataram esse evento em músculos diafragma de ratos. Kernell (2006) discute que esse fenômeno foi reportado em hemidiafragma desnervado, sendo que o processo hipertrófico aconteceu pelo fato da outra parte do músculo encontrar-se inervada, gerando um processo hipertrófico nas fibras musculares da parte desnervada. No entanto, um artigo recente escrito por Sieck e Mnatilla (2013), refuta que a hipertrofia observada tenha sido causada pela contração do hemidiafragma ainda inervado, uma vez que foi medida a contração em várias regiões do músculo e esses autores observaram que a contração apresentada por estas regiões não seriam suficientes para induzir aumento da carga na parte

desnervada. Miledi e Slater (1969) utilizando MET relataram hipertrofia das fibras musculares do diafragma 9 dias após o processo de desnervação. Além disso, inspecionando elétrôn-micrografias do músculo, esses autores observaram um aumento no número de miofibrilas dessas fibras que era quase duas vezes superior a do controle. Estes autores mostraram que a área ocupada pelas miofibrilas nesses animais era 160% da dos animais controles.

Jimena *et al.* (1998) em outro trabalho que utilizou uma abordagem experimental diferente, propunham avaliar se extratos de músculo SOL desnervados e injetados intraperitonealmente em ratos normais seriam capazes de provocar efeitos miotróficos. Esses autores comprovaram que os ratos que receberam extratos de musculo SOL 2 e 4 dias pós-desnervação, apresentaram aumento significativo da CSA e diâmetro das fibras musculares. Esses autores ainda discutem que vários fatores reguladores do músculo podem contribuir para este resultado e que interessantemente o músculo SOL apresenta grande quantidade de Miogenina, sendo que esta poderia contribuir para os efeitos observados. Esse mesmo fenômeno de hipertrofia pós-desnervação já foi relatado em humanos, e os autores mostraram hipertrofia de fibras IIA e IIB pertencentes ao músculo gastrocnêmio que se encontrava parcialmente desnervado (BERNAT e OCHOA, 1978).

Zhan e Sieck (1992) publicaram um trabalho que tratava das adaptações que ocorriam nos músculos diafragma e gastrocnêmio medial (MG) de hamsters adultos pós-inatividade muscular. Nesse artigo, os autores induziram desnervação e ainda utilizaram uma toxina (tetrodotoxina-TTX) que bloqueia os canais para sódio sensíveis a voltagem, impedindo assim a transmissão dos impulsos nervosos. Um dos resultados deste trabalho que foi de particular interesse para nós, foi a observação de que as fibras do tipo I (de contração lenta) no diafragma, assim como no gastrocnêmio, apresentaram hipertrofia, com maiores valores de CSA, o que corrobora os achados deste trabalho em relação ao aumento quantificado da CSA e perímetro do músculo SOL pertencente aos animais VACHT KD.

Interessantemente e de igual importância para nosso trabalho, foi o fato destes autores terem observado nesse mesmo experimento, que as fibras do tipo II do diafragma haviam sofrido atrofia, o que corrobora nossos achados com relação ao músculo EDL dos animais KD^{HOM}, que apresentaram valores menores de CSA e perímetro quando comparado aos de animais controles. Considerando que o EDL possui predominantemente esse tipo de fibra, podemos assumir que a atrofia aqui observada ocorreu primariamente nesses tipos musculares (ZHAN e SIECK, 1992; MYATA *et al.*, 1995; ARAVAMUDAN *et al.*, 2006). Em outro trabalho, Audouard *et al.* (2012), utilizando um modelo animal mutante para a proteína HNF-

6 que regula nos motoneurônios a formação da JNM, mostraram que esses animais apresentavam fraqueza muscular e locomoção anormal. Analisando diferentes músculos esqueléticos, eles observaram, no músculo tibial anterior (contração rápida), um maior número de fibras musculares que se apresentavam menores em relação ao controle.

Zhan e Sieck, (1992); Myata *et al.*, (1995) e Aravamudan *et al.*, (2006) sugerem que esses resultados podem ser explicados pelas características de recrutamento das unidades motoras (UMs) de ambos os tipos de fibras. As UMs de fibras de contração lenta são, segundo eles, primeiramente recrutadas e, portanto, as forças geradas no músculo diafragma em eupneia, podem ser acompanhadas primariamente pelo recrutamento de UMs lentas. O mesmo poderia ser concluído a respeito do músculo gastrocnêmio, o qual contribui para atividades como caminhadas e manutenção postural (ficar em pé). Sendo assim, as UMs lentas são as primeiras a serem recrutadas e as UMs de contração rápida são raramente utilizadas, a não ser em atividades que exigem geração de força. Os autores concluem que as diferenças observadas em relação aos diferentes tipos de fibras em inatividade podem ser relacionadas às características das UMs destes dois tipos de fibras (ZHAN e SIECK, 1992; MYATA *et al.*, 1995; ARAVAMUDAN *et al.*, 2006). Seria interessante, pois, caracterizar as UMs dos músculos SOL e EDL no nosso modelo experimental.

Considerando, portanto, que os animais VACHT KD apresentam menor liberação de acetilcolina, podemos entender esses animais como um modelo de desnervação parcial. Uma vez que já nascem com esse déficit, pode ser que a liberação reduzida de ACh ao longo do desenvolvimento induza transformações compensatórias nas fibras musculares do SOL desses animais, propiciando assim os efeitos observados em relação a CSA e perímetro e semelhante ao relatado pelos autores acima. Em relação ao EDL, sendo um músculo pouco recrutado nas atividades diárias, a menor liberação de ACh nesses animais poderia ser mais prejudicial a este músculo e ter menor impacto sobre o SOL, se analisado as características de recrutamento de ambas as musculaturas.

Através de análises morfométricas nós mostramos que o músculo SOL assim como o EDL são afetados de alguma forma quando a neurotransmissão colinérgica é reduzida. Como o músculo SOL e EDL apresentam diferenças drásticas no nível de expressão da MyHC (BLOEMBERG & QUADRILATERO., 2012), nós decidimos avaliar se a menor liberação de ACh traria alguma mudança no padrão de expressão dessas isoformas. Utilizando anticorpo específico para a isoforma tipo I, nós realizamos uma análise qualitativa da marcação de músculos SOL e EDL em ambos os genótipos. As imagens da marcação mostram que com relação ao músculo SOL (figura 17) parece não haver mudanças no padrão

de expressão da isoforma tipo I nos animais VChT KD quando comparado ao controle WT. No entanto, de forma interessante, o músculo EDL (figura 18) parece apresentar mais fibras marcadas com o anticorpo tipo I. Michel *et al.* (1996) mostraram em seu trabalho que o músculo EDL de ratos submetidos a desnervação e bloqueio da transmissão nervosa via TTX, apresentou significativa redução das isoformas IIX e IIB e um aumento na expressão da isoforma IIA, com uma tendência ao aumento da isoforma lenta (tipo I). Outro trabalho publicado por Bobinac *et al.* (2000), em que foi induzida desnervação do EDL, mostrou também a mudança no padrão de expressão das isoformas, com redução de IIB e IIX e aumento de IIA e I.

Assim, esses dados relativos a expressão da MyHC podem indicar que no músculo EDL nos animais com déficit colinérgico, essa menor liberação de ACh pode induzir um shift, com aumento da isoforma tipo I. Esse aumento pode estar relacionado, como citado por Zhan e Sieck (1992); Myata *et al.* (1995) e Aravamudan *et al.* (2006), com uma maior ativação de UMs lentas. Além disso, devemos considerar também a possibilidade desse aumento indicar um retorno desse músculo aos momentos iniciais de seu desenvolvimento, uma vez que, como demonstrado por Agbulut *et al.* (2003), a isoforma tipo I é a primeira a ser expressa na quase maioria dos músculos. Portanto, a ativação nervosa pode ser importante para manter o padrão de expressão das MyHC.

De forma inédita, nós mostramos aqui que a atividade nervosa é importante para manter a morfologia normal das fibras musculares de diferentes grupos de músculos. O estudo de músculos que variam drasticamente no nível de expressão da MyHC mostra como é complexo o campo e como que cada tipo de fibra responde de maneira totalmente diferente, em termos de atrofia ou hipertrofia e também com relação a expressão da MyHC. Nosso grupo de pesquisa, ao estudar o VChT, mostrou como essa proteína exerce um papel fundamental na manutenção da neurotransmissão colinérgica, e que sua abolição é incompatível com a vida (DE CASTRO *et al.*, 2009).

Os resultados aqui apresentados mostram a necessidade de se avaliar ultraestruturalmente as fibras musculares de músculos SOL e EDL, a fim de verificar a integridade das estruturas sarcoméricas, bem como de outros componentes celulares. Se faz também necessário o estudo mais aprofundando das isoformas da MyHC, realizando uma análise quantitativa da expressão das mesmas. A avaliação dos níveis de expressão de fatores miotróficos, como exemplo a miogenina, pode ajudar a entender melhor as alterações observadas.

Assim, esse campo de estudo não é somente confinado a ciência básica, mas sua implicação é bastante ampla, indo da ciência esportiva à medicina e, considerando que a atividade muscular se torna benéfica na prevenção de várias doenças crônicas, seu entendimento é muito importante a fim de se identificar possíveis alvos terapêuticos (SCHIAFFINO & REGGIANI., 2011).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou como a ativação nervosa exerce um importante papel na manutenção da morfologia muscular. Mostramos aqui um modelo animal que apresenta um déficit na expressão do VAcHT, uma proteína vesicular de fundamental importância para a neurotransmissão colinérgica. Nossos resultados mostram que a interferência nessa proteína é capaz de provocar alterações na estrutura de músculos esqueléticos e que estas mudanças são dependentes das características de ativação nervosa de cada unidade motora. Assim, fibras musculares de contração lenta respondem ao déficit colinérgico de maneira oposta a fibras musculares de contração rápida. O conjunto desses resultados ajudará a entender melhor o papel da acetilcolina na manutenção da estrutura muscular. Considerando a ACh como um importante neurotransmissor tanto para o SNC como para o SNP, esses estudos se tornam muito importantes a fim de propiciar a criação de estratégias que visam auxiliar na cura ou pelo menos tratamento de doenças como o mal de Alzheimer, doença de Huntington, Esclerose Lateral Amiotrófica e outras desordens neurodegenerativas, trazendo dessa forma melhor qualidade de vida aos pacientes acometidos.

7. REFERÊNCIAS

AGBULUT, O., et al. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. **Biology of the Cell**, v.95, p.399-406, 2003.

AGBULUT, O., et al. Slow myosin heavy chain expression in the absence of muscle activity. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v.296, p.205-214, 2009.

ARAVAMUDAN, B., et al. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. **Journal of Applied Physiology**, v.100, p.1617-1622, 2006.

AUDOARD, E., et al. The Onecut Transcription Factor HNF-6 Regulates in Motor Neurons the Formation of the Neuromuscular Junctions. **PLoS ONE**, v.7(12), p.1-14, 2012.

BERNAT, J.L; UCHOA, J.L. Muscle hypertrophy after partial denervation: a human case. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.41, p.719-725, 1978.

BEWICK, G. S., et al. Activity-dependent plasticity of transmitter release from nerve terminals in rat fast and slow muscles. **The Journal of Neuroscience**, v.23(28), p.9340-9348, 2003.

BLAAUW, B; SCHIAFFINO, S; REGGIANI, C. Mechanisms Modulating Skeletal Muscle Phenotype. **Comprehensive Physiology**, v.3, p.1645-1687, 2013.

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.

BOBINAC, D., et al. Muscle Fiber Type Composition and Morphometric Properties of Denervated Rat Extensor Digitorum Longus Muscle. **Croatian Medical Journal**, v.41(3), p.294-297, 2000.

BRANDON, E.P., et al. Aberrant Patterning of Neuromuscular Synapses in Choline acetyltransferase-Deficient Mice. **The Journal of Neuroscience**, v.23(2), p.539-549, 2003.

CHAKKALAKAL, J. V., et al. Mouse transgenic lines that selectively label type I, type IIA and types IIX+B skeletal muscle fibers. **Genesis**, v.137, p.3489-3499, 2011.

CHAKKALAKAL, J. V., et al. Retrograde influence of muscle fibers on their innervations revealed by a novel marker for slow motoneurons. **Development**, v.137, p.3489-3499, 2010.

CHAPMAN, E. R. Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis?. **Molecular Cell Biology**, v.3, p.1-11, 2002.

CICILIOT, S., et al. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. The **International Journal of Biochemistry&Cell Biology**, v.45, p.2191-2199, 2013.

CICILIOT, S; SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: Basic mechanisms and clinical implications. **Current Pharmaceutical Design**, v.16, p.906-914, 2010.

CLOSE, R. Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. **Journal of Physiology**, v.173, p.74-95, 1964.

CONDON, K., et al. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. **Developmental Biology**. v.138, p.256-274, 1990.

DE CASTRO, B. M., et al. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. **Molecular and Cellular Biology**, v.29, n.19 p.5238-5250, 2009.

DEFORGES, S., et al. Motoneuron survival is promoted by specific exercise in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Physiology**, v.587.14, p. 3561-3571, 2009.

DEVECI, D; EGGINTON, S. Differing mechanisms of cold-induced changes in capillary supply in m. tibialis anterior of rats and hamsters. **The Journal of Experimental Biology**, v.205, p.829-840, 2002.

GOLLNICK, P.D., et al. Muscular enlargement and number of fibers in skeletal muscle of rats. **J. Applied Physiology**, v.50, p.936-943, 1981.

GREFTE, S., et al. Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem Cells and Development** , v.16, p.857-868, 2007.

HERZORG, W; KAMAL, S; CLARKE, H.D. Myofilament lengths of cat skeletal muscle: theoretical considerations and functional implications. **J. of Biomechanics**, v.25, p.945-948, 1992.

HNASKO, T.S; EDWARDS, R.H. Neurotransmitter Corelease: Mechanism and Physiological Role. **The Annual Reviews of Physiology**, v.74, p.225-243, 2012.

IZUMO, S; NADAL-GINARD, B; MAHDAVI, V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in highly tissue-specific manner. **Science**, v.231, p.597-600, 1986.

JASPERS, R. T., et al. The muscle fiber type–fiber size paradox: hypertrophy or oxidative metabolism? **Eur J Appl Physiol.**, v.110, p.665-694, 2010.

JIMENA, I., et al. Myotrophic effects of muscle extracts obtained at different intervals after denervation. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.24, p.217-223, 1998.

JIN, Tae-Eun; WERNIG, A.; WITZEMANN, V. Changes in acetylcholine receptor function induce shifts in muscle fiber type composition. **Febs Journal**. 275, p.2042-2054, 2008.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, José; **Histologia Básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H.; JESSEL, Thomas M. **Princípios de Neurociências**. 4. ed. São Paulo: Manole, 2003. 1412p.

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

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

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, fev.2006.

KYPAROS, A., et al. Mechanical stimulation of the plantar foot surface attenuates soleus muscle atrophy induced by hindlimb unloading in rats. **Journal of Applied Physiology**, v.99, p.739-746, 2005.

- LEE, Y.I., et al. Muscles in a mouse model of spinal muscular atrophy show profound defects in neuromuscular development even in the absence of failure in neuromuscular transmission or loss of motor neurons. **Developmental Biology**, v.356, p.432-44, 2011.
- MACPHERSON, P.C.D; WANG, X; GOLDMAN, D. Myogenin regulates denervation-dependent muscle atrophy in mouse soleus muscle. **Journal of Cell Biochemistry**, v.112(8), p.2149-2159, 2011.
- MANTILLA, C.B., et al. Synaptic vesicle pools at diaphragm neuromuscular junctions vary with motoneuron soma, not axon terminal, inactivity. **Neuroscience**, v.146, p.178-189, 2007.
- MENDLER, L., et al. Regeneration of Reinnervated Rat Soleus Muscle Is Accompanied by Fiber Transition Toward a Faster Phenotype. **Journal of histochemistry & Cytochemistry**. v. 56(2), p.111-123, 2008.
- MESTIKAWT, S. E., et al. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. **Nature Reviews/Neuroscience**, v.12, p. 204-216, 2011.
- MICHEL, R.N; PARRY, D.J; DUNN, S.E. Regulation of myosin heavy chain expression in adult rat hindlimb muscles during short-term paralysis: comparison of denervation and tetrodotoxin-induced neural inactivation. **FEBS Letters**, v.391, p.39-44, 1996.
- MILEDI, R; SLATER, C.R. Electron-microscopic structure of denervated skeletal muscle. **Proceedings of the Royal Society London**, v.174, p.253-269, 1969.
- MISGELD, T., et al. Roles of Neurotransmitter in Synapse Formation: Development of Neuromuscular Junctions Lacking Choline Acetyltransferase. **Neuron**, v.36, p.635–648, nov.2002.
- MURTHY, Venkatesh N.; DE CAMILLI, Pietro. Cell Biology of the presynaptic terminal. **Annual Review of Neuroscience**, v.26, p.701- 728, 2003.
- MYATA, H., et al. Myoneural interactions affect diaphragm muscle adaptations to inactivity. **Journal of Applied Physiology**, v.79, p.1640-1649, 1995.
- NGUYEN, M. L.; COX, G. D.; PARSONS, S. M. Kinetic Parameters of the Vesicular Acetylcholine Transporter: Two Protons are exchanged for One Acetylcholine. **Biochemistry**, v. 37, p. 13400-13410, set. 1998.

PARSONS, R. L.; CALUPCA, M. A.; MERRIAM, L. A.; PRIOR, C.; PARSONS, S. M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. **FASEB Journal** v.14, n.15, p.2423–2434, 2000.

PRADO V. F., et al. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron** 51, 601–612, set. 2006.

PRADO, M.A., et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem. Int.** 41, 291–299, 2002.

PRADO, V.F., et al. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. **Biochemistry J**, v.450, p.265-274, 2013.

PURVES_SMITH, F.M., et al. Severe atrophy of slow myofibers in aging muscle is concealed by myosin heavy chain co-expression. **Experimental Gerontology**, v.47, p.913-918, 2012.

PYLE, G.W; SOLARO, J.R. At the crossroads of myocardial signaling: The role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. **Circulatory Research**, v.94, p.295-305, 2004.

QUADRILATERO, J.. et al. Prolonged moderate-intensity aerobic exercise does not alter apoptotic signaling and DNA fragmentation in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.298, p.534-547, 2010.

REGGIANI, C., et al. Chemo-mechanical energy transduction in relation to myosin isoform composition in skeletal muscle fibres of the rat. **J. Physiol**, v.502.2, p.449-460, 1997.

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., et al. The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. **J. Neurochem.** 97, 1–12, 2006.

RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic vesicle pools. **Nature Reviews Neurosciences**, v.6, n.1, p.57–69, 2005.

RODRIGUES, H.A., et al. Reduced Expression of the Vesicular Acetylcholine Transporter and Neurotransmitter Content Affects Synaptic Vesicle Distribution and Shape in Mouse Neuromuscular Junction. **PLoS ONE**, v.8(11), p.1-11, 2013.

RODRIGUES, Hermann. A. **Avaliação do Ciclo de Vesículas Sinápticas Durante Estágios do Desenvolvimento Pós- Natal da Junção Neuromuscular de Camundongos**. 2010. 53f. (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction, **Annual Review of Neuroscience**, v.22, p.389–442, 1999.

SCHATZBERG, A.F; NEMEROFF, C.B. **Textbook of Psychopharmacology**, fourth edition, American Psychiatric Publishing, 2009. 1648p.

SCHERTZER, J.D., et al. Modulation of Insulin-like Growth Factor (IGF)-I and IGF-Binding Protein Interactions Enhances Skeletal Muscle Regeneration and Ameliorates the Dystrophic Pathology in mdx Mice. **The American Journal of Pathology**, v.171, n.4, p.1180-1188, 2007.

SCHIAFFINO, S. The Fibre types in skeletal muscle: a personal account. **Acta Physiol.**, v.199, p.451-463, 2010.

SCHIAFFINO, S; BORMIOLI, S. P. Adaptive changes in developing rat skeletal muscle in response to functional overload. **Experimental Neurology**, v.40, p.126-137, 1973.

SCHIAFFINO, S; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol Rev**, v.91, p.1447-1531, 2011.

SCHMALBRUCH, H; AL-MOOD, W.S; LEWIS, D.M. Morphology of long-term denervated rat soleus muscle and the effect of chronic electrical stimulation. **Journal of Physiology**, v.441, p.233-241, 1991.

SIECK, G; MANTILLA, C.B; CrossTalk opposing view: The diaphragm muscle does not atrophy as a result of inactivity. **Journal of Physiology**, v.591.21, p.5259-5262, 2013.

SÜDHOF, T. C. The Synaptic Vesicle Cycle. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.509-547, 2004.

TANG, J., et al. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. **Cell**, v.126, n.6, p.1175-1187, 2006.

USDIN, T. B.; EIDEN, L. E.; BONNER, T. I.; ERICKSON, J. D. Molecular biology of the vesicular ACh transporter. **Trends in Neuroscience**, v.18, n.5, p.218-224, 1995.

VALADÃO, Priscila, A. C. **O anestésico intravenoso etomidato estimula a exocitose de vesículas sinápticas em junção neuromuscular de camundongos**. 2013. 66f. (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

VARDY, E., et al. Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. **Protein Science**, v.13, p.1832-1840, 2004.

WANG, L.C; KERNELL, D. Proximo-distal organization and fibre type regionalization in rat hindlimb muscles. **Journal of Muscle Research and Cell Mobility**, v.21, p.587-598, 2000.

ZHAN, WZ; SIECK, G.C. Adaptation of diaphragm and medial gastrocnemius muscle to inactivity. **Journal of Applied Physiology**, v.72, p.1445-1453, 1992.