

Hermann Alecsandro Rodrigues

**Caracterização Ultraestrutural de Junções Neuromusculares de Diafragma de
Camundongos com Disfunção Colinérgica**

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

Belo Horizonte, 2014.

Hermann Alecsandro Rodrigues

**Caracterização Ultraestrutural de Junções Neuromusculares de Diafragma de
Camundongos com Disfunção Colinérgica**

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

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

Belo Horizonte, 2014.

APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado nos seguintes locais:

- Laboratório de Biologia da Neurotransmissão, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca;

- Laboratório de Eletrofisiologia Celular, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a colaboração da Profa. Dra. Lígia Araújo Naves Kushmerick e do discente Wallace Lúcio Camargo;

- Centro de Aquisição e Processamento de Imagens, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais;

- Centro de Microscopia da UFMG.

Recebemos 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).

Aos meus pais, Rutenberg e Maylde, aos meus irmãos, Harrison e Hudson,
e à minha esposa, Fernanda, com muito carinho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos em minha vida. Nada é possível sem Ele!

Aos meus pais, Rutemberg e Maylde, pelo amor e apoio incondicionais. Sem eles também não seria possível!

Aos meus irmãos, Harrison e Hudson, pela amizade e companheirismo constantes.

À minha esposa, Fernanda, pela paciência e cumplicidade.

A todos os meus familiares que, sinceramente, torceram por mim.

Aos meus queridos padrinhos Guilherme e Lúcia (*in memoriam*), José Carlos e Verinha, por terem se tornado minha família em Belo Horizonte e terem me adotado com tanta ternura.

Ao Flávio, por toda ajuda estatística.

Ao Marcos, por toda ponderação.

À Marina, por ter dividido responsabilidades.

À Roberta, por todos os momentos de alegria.

À Professora Cristina Guatimosim, por todos os ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia da Neurotransmissão: Bárbara, Carla, Fernanda, Jéssica, Luana, Marina, Matheus Fonseca, Matheus Proença, Priscila, Rayara, Rubens, pelos constantes momentos de alegria e aprendizado.

Ao querido amigo, Matheus Fonseca, por ter contribuído de forma direta neste trabalho, auxiliando nas análises das elétrón-micrografias.

Aos amigos Diogo Guimarães e Wallace Camargo, por toda ajuda com animais e experimentos.

Aos meus professores e amigos do curso de pós-graduação em Biologia Celular e do Departamento de Morfologia.

A todos os outros colegas e amigos da UFMG.

Aos professores sempre presentes: Lígia Naves, Patrícia Massara e Silvia Guatimosim.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

Ao corpo diretor do Centro de Microscopia da UFMG e do CAPI-ICB-UFMG.

A todos os amigos do Centro de Microscopia da UFMG e do CAPI.

Às secretárias da pós-graduação pelo carinho e competência constantes.

Aos amigos do Conselho Regional de Fisioterapia da 4ª Região.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	12
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 - INTRODUÇÃO.....	19
1.1 – Aspectos gerais da neurotransmissão.....	19
1.2 – Reciclagem de vesículas sinápticas.....	23
1.2.1. Exocitose de vesículas sinápticas.....	24
1.2.2. Endocitose de vesículas sinápticas.....	27
1.2.3. Aglomerados de vesículas sinápticas.....	32
1.3 – A neurotransmissão colinérgica.....	35
1.4 – Aspecto morfológico da junção neuromuscular.....	43
1.5 – A participação do VAcHT na neurotransmissão colinérgica.....	47
2 – OBJETIVOS.....	52
2.1 – Objetivo geral.....	52
2.2 – Objetivos específicos.....	52
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1 – Animais.....	54
3.2 – Registros eletrofisiológicos de MEPPs.....	54
3.3 – Marcação com FM1-43 fx e α -bungarotoxina.....	55

3.4 – Obtenção e análise de imagens através de microscopia confocal.....	58
3.5 – Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	59
3.6 – Obtenção e análise das elétron-micrografias de transmissão.....	62
4 – RESULTADOS.....	65
4.1 – As JNMs de diafragma de camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam aspecto morfológico normal, mas alteração na distribuição de VS na ausência de estimulação.....	65
4.2 – A expressão reduzida do VACHT altera a distribuição de VSs em JNMs estimuladas eletricamente.....	71
4.3 – As JNMs de diafragma de camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam alteração na reciclagem e distribuição de VSs após estimulação hipertônica.....	75
4.4 – O aspecto morfológico das VSs nas JNMs de diafragma de camundongos VACHT KD ^{HOM}	83
5 – DISCUSSÃO.....	90
5.1 – A expressão reduzida do VACHT não compromete a morfologia da JNM de diafragma nos camundongos VACHT KD ^{HOM}	91
5.2 – A expressão reduzida do VACHT altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma dos animais VACHT KD ^{HOM} após estimulação elétrica.....	92
5.3 – A expressão reduzida do VACHT compromete a reciclagem das VSs do RRP e altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma dos animais VACHT KD ^{HOM} após estimulação hipertônica.....	95
5.4 – O conteúdo quântico de ACh determina o aspecto morfológico das VSs, enquanto a expressão reduzida do VACHT afeta a distribuição vesicular em terminais nervosos de músculo diafragma.....	98
6 – CONCLUSÃO.....	104
7 – REFERÊNCIAS.....	106

8 – ANEXOS.....126

8.1 – ARTIGO 1: Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mice neuromuscular junction

8.2 – ARTIGO 2: Membrane cholesterol regulates different modes of synaptic vesicle release and retrieval at the frog neuromuscular junction

Lista de Abreviaturas

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AP	Proteína adaptadora
ATP	Trifosfato de Adenosina
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca ²⁺	Íon cálcio
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
CO ₂	Dióxido de carbono
DMP-30	<i>2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) phenol</i>
FM1-43	<i>N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(4(dibutylamino)-styryl)pyridinium dibromide</i>
FM2-10	<i>N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(diethylamino)styryl)pyridinium dibromide</i>
GABA	Ácido gama-amino-butírico
H ⁺	Íon hidrogênio
Hz	Hertz
JNM	Junção Neuromuscular
K ⁺	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
MEPPs	Potencial de placa motora em miniatura
Mg ²⁺	Íon magnésio
ms	Milisegundo
mV	milivolt
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MuSK	Kinase ou cinase músculo-específica
μM	Micromolar
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NH ₄ ⁺	Íon amônio
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
RP	<i>Recycling Pool</i>
RRP	<i>Readily Releasable Pool</i>
R _t P	<i>Resting Pool</i>
TRP	<i>Total Recycling Pool</i>
SM	Sec1/Munc18
SMC	Síndrome Miastênica Congênita
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
T-SNARE	<i>Target SNARE</i>
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
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato
VGAT	Transportador vesicular de GABA
VH ⁺ -ATPase	Bomba vesicular de íons hidrogênio
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
V-SNARE	<i>Vesicular SNARE</i>
VSs	Vesículas sinápticas
μm	Micrômetro

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 – Desenho esquemático mostrando a propagação do impulso nervoso no neurônio.....	20
Figura 2 – Desenho esquemático comparando sinapse elétrica e química.....	22
Figura 3 – Etapas básicas da neurotransmissão.....	23
Figura 4 – Participação do complexo SNARE na exocitose de VSs.....	26
Figura 5 – Modelo de endocitose de VSs via ação da proteína clatrina.....	28
Figura 6 – Endocitose de VS mediada por clatrina na JNM de camundongo.....	28
Figura 7 – Modelo de endocitose de VSs via mecanismo “kiss and run”.....	30
Figura 8 – Modelo de endocitose de VSs via invaginação de membrana e formação de cisternas.....	31
Figura 9 – Aglomerados de VSs na JNM de vertebrados.....	34
Figura 10 – Desenho esquemático mostrando a síntese, o armazenamento e a liberação de acetilcolina.....	37
Figura 11 – Desenho esquemático representando um receptor muscarínico para ACh..	38
Figura 12 – Desenho esquemático representando um receptor nicotínico para ACh.....	40
Figura 13 – Desenho esquemático de um contato sináptico de JNM.....	41
Figura 14 – O aspecto morfológico da junção neuromuscular de camundongo adulto..	43

Figura 15 – Desenho esquemático da JNM madura.....	46
Figura 16 – Sequência de aminoácidos e topologia propostas para o transportador vesicular de acetilcolina humano (hVACHT).....	47
Figura 17 – O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em terminais nervosos.....	57
Figura 18 – A junção neuromuscular de diafragma de camundongo adulto à microscopia de fluorescência confocal.....	58
Figura 19 – Esquema ilustrativo do modo de obtenção dos fragmentos de músculo diafragma fixado, para processamento para microscopia eletrônica de transmissão.....	60
Figura 20 – Localização de áreas no músculo diafragma com grande potencial para conter junções neuromusculares.....	61
Figura 21 – Esquemas ilustrativos das formas de análise das elétron-micrografias dos elementos sinápticos das junções neuromusculares.....	63
Figura 22 – Elétron-micrografias de transmissão do perfil de duas JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD ^{HOM} na ausência de estímulo.....	66
Figura 23 – A expressão reduzida do VACHT não induz alterações no aspecto morfológico geral das junções neuromusculares de diafragma nos camundongos VACHT KD ^{HOM}	67
Figura 24 – Os terminais motores de diafragma de camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam distribuição alterada de VSs próximas às zonas ativas na ausência de estimulação.....	69

Figura 25 – A distribuição de VSs em terminais motores de diafragma na ausência de estimulação.....	70
Figura 26 – A expressão reduzida do VACHT não compromete a reciclagem de VSs do TRP após estimulação elétrica.....	72
Figura 27 – A expressão reduzida do VACHT altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma após estimulação elétrica.....	73
Figura 28 – A distribuição de VSs em terminais motores de diafragma após estimulação elétrica.....	74
Figura 29 – A expressão reduzida do VACHT determina alterações na liberação de ACh induzida por estímulo hipertônico com sacarose.....	76
Figura 30 – Imagens representativas de elementos sinápticos de JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD ^{HOM} após estimulação com sacarose hipertônica, obtidas através de microscopia confocal.....	77
Figura 31 – Os animais VACHT KD ^{HOM} apresentam alteração na reciclagem de VSs do RRP induzida por estímulo hipertônico com sacarose.....	79
Figura 32 – A redução na expressão do VACHT compromete a reciclagem das VSs do RRP após aplicação de estímulo hipertônico com sacarose.....	81
Figura 33 – A redução na expressão do VACHT altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma após aplicação de estímulo hipertônico com sacarose.....	82
Figura 34 – Os terminais motores de JNMs de diafragma de camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam VSs com forma alterada.....	84
Figura 35 – A inibição farmacológica do VACHT não compromete a reciclagem de VSs nas JNMs de diafragma.....	85

Figura 36 – A distribuição das VSs nos terminais motores de diafragma de camundongos VACHT KD ^{HOM} é influenciada pelos níveis de expressão da proteína VACHT.....	87
Figura 37 – O aspecto morfológico das VSs nos terminais motores de diafragma de camundongos VACHT KD ^{HOM} é influenciado pelos níveis de ACh das VSs.....	88
Tabela 1 – Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, na ausência de estimulação.....	68
Tabela 2 – Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, após estimulação elétrica.....	71
Tabela 3 – Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, após estimulação com sacarose hipertônica.....	80
Tabela 4 – Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, após estimulação elétrica (VACHT KD ^{HOM} não tratado e WT tratado com vesamicol).....	86

Resumo

Um dos pontos mais críticos do processo de neurotransmissão colinérgica envolve o evento de armazenamento da acetilcolina (ACh) nas vesículas sinápticas (VSs) via transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Para avaliar a participação e a importância funcional do VACHT na neurotransmissão colinérgica, Prado e colaboradores (2006) geraram uma linhagem de camundongos que apresenta expressão reduzida (*knockdown*) do gene do VACHT. A redução da expressão do VACHT afeta a neurotransmissão em junções neuromusculares (JNM), implicando em importante déficit de força muscular e redução do desempenho motor. No entanto, as características estruturais das JNM destes animais ainda não foram descritas. O objetivo deste estudo consistiu em avaliar as possíveis alterações morfofuncionais dos elementos sinápticos de JNM de diafragma de camundongos com disfunção colinérgica (*knockdown* para o gene do VACHT) sob diferentes paradigmas de estimulação. Utilizando estimulação hipertônica com sacarose (500 mM) nós registramos potenciais de placa motora em miniatura (MEPPs) em fibras musculares do diafragma de camundongos VACHT WT and VACHT KD^{HOM} e observamos que a frequência e amplitude dos MEPPs foi menor para os animais KD^{HOM}. Em seguida, as JNMs foram estimuladas com sacarose hipertônica na presença da sonda FM1-43 fx, para monitorar a reciclagem das VSs a partir do aglomerado de vesículas disponíveis para liberação rápida (*Readily Releasable Pool - RRP*). Nós observamos que os terminais nervosos dos camundongos KD^{HOM} apresentaram menor sinal fluorescente que os do WT. Para a realização de estudos ultraestruturais, as JNMs foram estimuladas com sacarose hipertônica, fixadas em solução de Karnovsky modificada e processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). Estes experimentos revelaram que os terminais nervosos de diafragma dos animais KD^{HOM} apresentavam uma redução no número total de VSs/ μm^2 de perfil de terminal e também uma alteração na distribuição das VSs. Ainda utilizando a MET, nós avaliamos os terminais pré-sinápticos de JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM} após aplicação de estímulo elétrico e também na ausência de estimulação. Em ambas situações o número total de VS nos perfis de terminais foi igual entre os genótipos, no entanto, os terminais nervosos dos animais KD^{HOM} continuavam a apresentar uma alteração na distribuição das VSs. Durante as análises morfométricas das elétron-micrografias de JNMs dos animais KD^{HOM} nós observamos uma maior quantidade de VSs com aspecto morfológico irregular comparado ao WT. Então, utilizando a MET nós comparamos a circunferência, o formato e a distribuição das VSs de terminais nervosos de diafragmas de animais WT tratados com (\pm)-vesamicol (bloqueador do VACHT) com aquelas de VACHT WT e VACHT KD^{HOM} não tratados. Nós observamos que os terminais nervosos dos animais VACHT KD^{HOM} não tratados e dos WT tratados exibiam VSs achatadas e menores do que aquelas dos animais VACHT WT não tratados. No entanto, o tratamento com vesamicol não alterou a distribuição das VSs. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a expressão do VACHT é importante para a reciclagem das vesículas do RRP e distribuição de VSs, enquanto o conteúdo vesicular de ACh é importante para a manutenção da forma das VSs nos terminais nervosos de diafragma.

Abstract

One of the most critical processes of cholinergic transmission involves the event of storage of acetylcholine (ACh) in synaptic vesicles (SVs) through the vesicular acetylcholine transporter (VACHT). To assess the functional importance of the VACHT in the cholinergic transmission, Prado and colleagues (2006) generated a strain of mice knockdown for the VACHT gene and these animals have an important deficit of muscle strength and motor performance. However, the structural characteristics of neuromuscular synapses of these animals have not been described. The aim of this study is to evaluate the morphofunctional changes of synaptic elements of neuromuscular junctions (NMJ) of diaphragm from adult mice with cholinergic dysfunction (knockdown for the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) gene) under different stimuli paradigm. Using hypertonic stimulation paradigm (500 mM sucrose solution) we recorded miniature endplates potentials (MEPPs) in NMJ of diaphragm from VACHT WT and VACHT KD^{HOM} mice. We observed that the MEPPs frequency was lower in KD^{HOM} compared to WT. For optical analysis, NMJ were stimulated with hypertonic sucrose in the presence the dye FM1-43fx to stain synaptic vesicles recycling from readily releasable pool (RRP). We observed that nerve terminals of KD^{HOM} diaphragm presented less fluorescence. For ultrastructural studies, the NMJ were stimulated with hypertonic sucrose, fixed in modified Karnovsky and processed for transmission electron microscopy (TEM). We observed a reduction in the total number of SVs/ μm^2 of terminal and an altered distribution of SVs in nerve terminals of KD^{HOM} mice. Using electrical stimulation paradigm (20 Hz/5 min) the NMJ were stimulated, fixed and processed for TEM. We observed an altered distribution of SVs in nerve terminals of KD^{HOM} mice. Additionally, we conducted an ultrastructural study in non-stimulated NMJ and also observed altered distribution of SVs in nerve terminals of KD^{HOM} mice. Finally, using TEM we compared the circumference, shape and distribution of SVs of electrically stimulated nerve terminals from VACHT WT and VACHT KD^{HOM} mice untreated and WT treated with (\pm)-vesamicol (a VACHT blocker). We observed that the nerve terminals of VACHT KD^{HOM} untreated and WT treated with vesamicol exhibited flattened and smaller SVs in relation to VACHT WT untreated. However, treatment with vesamicol did not alter the distribution of VSs. In conclusion, our results suggest that expression of VACHT is important for the vesicle recycling from RRP and distribution of VSs, while vesicular ACh content is important for maintaining the morphology of VSs from diaphragm nerve terminals.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Aspectos gerais da neurotransmissão

Um grande progresso científico sobre o entendimento do sistema nervoso foi alcançado nos dois últimos séculos. Páginas importantes desse progresso foram escritas por Santiago Ramón y Cajal, que propôs a histologia básica do sistema nervoso central (SNC), e destacou a zona especializada de contato entre os neurônios, que mais tarde, Charles Sherrington, veio a denominá-la sinapse. O sistema nervoso possui bilhões de neurônios e cada um deles pode se comunicar diretamente com milhares de outros neurônios através das sinapses. O funcionamento orquestrado dessas comunicações neuronais é a base de processos complexos, como movimento, percepção sensorial, aprendizado, memória e emoções. A transmissão sináptica ou neurotransmissão é o processo básico de toda esta atividade (Farsad and De Camilli, 2002).

Os sinais ou impulsos nervosos são transmitidos por potenciais de ação, que são variações rápidas do potencial de membrana neuronal. Um impulso nervoso é a transmissão de uma alteração elétrica ao longo da membrana do neurônio a partir do ponto em que ele foi estimulado. No neurônio não estimulado, a superfície interna da membrana plasmática tem uma grande quantidade de cargas negativas, quando comparada com o fluido tecidual adjacente. Proteínas negativamente carregadas e outras moléculas grandes contribuem para as cargas negativas relativas ao lado interno da membrana plasmática neuronal. Esse estado elétrico corresponde ao potencial de repouso da membrana. Durante essa fase diz-se que a membrana está polarizada. O potencial de membrana ou potencial de repouso de um neurônio é de cerca de -70 milivolts [mV] (Kandel *et al.*, 2003).

Para iniciar um potencial de ação em uma célula excitável é necessário um estímulo. Qualquer estímulo (químico, elétrico ou mecânico) que faça o neurônio ficar mais permeável aos íons sódio e potássio, pode mudar o potencial de repouso. O aumento da permeabilidade a estes íons é determinado pela abertura de canais iônicos, formados por proteínas transmembrana, que permite o transito de sódio (canais para sódio) ou de potássio (canais para potássio) entre o meio intra e extracelular. Quando ocorre a passagem de Na^+ para dentro da célula produz-se um potencial de membrana menos negativo, que é conhecido como despolarização. Esta despolarização causa um fluxo de corrente elétrica. Se a despolarização da membrana for de 15mV (o que

significa uma alteração do potencial de repouso para -55mV), a despolarização será apenas local. Quando a despolarização ultrapassa -55mV , a membrana alcança um ponto crítico chamado "nível de disparo", o que resulta em uma onda de despolarização, que se espalha ao longo do axônio. Quando o nível de disparo é alcançado, um potencial de ação explosivo ocorre e a membrana do neurônio rapidamente alcança o potencial "zero" e sobe para $+35\text{mV}$. Ocorre uma "inversão" momentânea da polaridade, ou seja, o lado interno da membrana passa a apresentar uma carga positiva, comparada ao meio adjacente. À medida que a onda de despolarização se desloca ao longo do axônio, o estado de polarização de repouso é rapidamente restabelecido ou a membrana é repolarizada nos segmentos anteriores. Os canais para Na^+ se fecham e não há mais entrada deste íon na célula até a repolarização da membrana. Simultaneamente ao fechamento dos canais para sódio ocorre a abertura dos canais para potássio, resultando na saída deste íon da célula. Há então uma redução de íons positivos dentro da célula o que resulta em sua repolarização. O potencial de repouso só será alcançado com o auxílio da bomba de sódio e potássio, que transporta ativamente o excesso de sódio para fora do neurônio (Nicholls, 1994; Kandel *et al.*, 2003). (**Figura 1**).

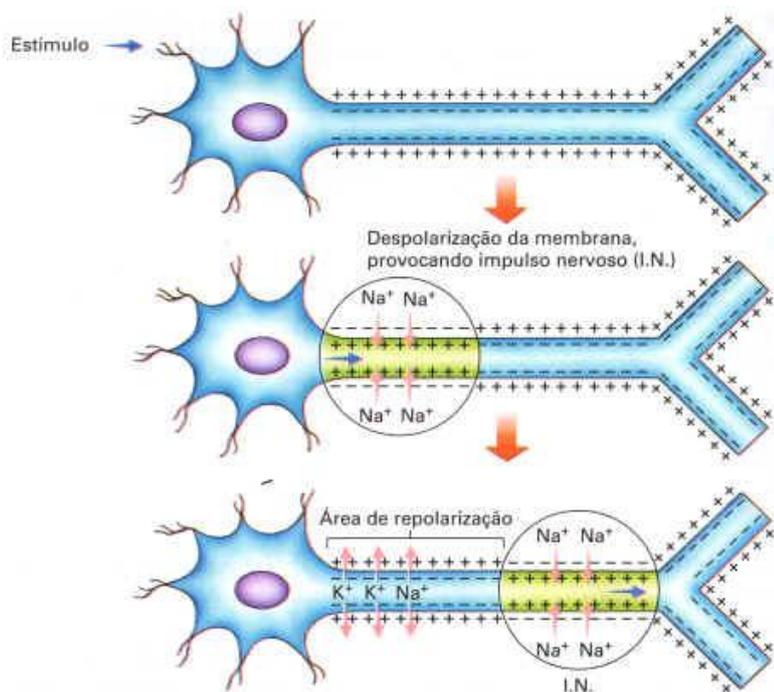


Figura 1. Desenho esquemático mostrando a propagação do impulso nervoso no neurônio. O potencial de ação que se estabelece na área da membrana estimulada perturba a área vizinha, levando à sua despolarização. O estímulo provoca, assim, uma onda de despolarizações e repolarizações que se propaga ao longo da membrana plasmática do neurônio. A propagação do sinal nervoso se dá, basicamente, pela alteração na permeabilidade da membrana aos íons sódio e potássio e se propaga em um único sentido. (<http://www.sobiologia.com.br>).

Potenciais de ação são iniciados em uma região especializada do axônio neuronal, chamada de cone de implantação, a partir daí os potenciais são conduzidos até a terminação axonal, a qual estabelece sinapses com a célula adjacente. Em um contato sináptico, a célula que transmite um sinal é chamada de célula pré-sináptica; já a que recebe o sinal é chamada de célula pós-sináptica. A célula pré-sináptica transmite os sinais a partir de dilatações terminais de seu axônio ramificado, chamadas de terminais pré-sinápticos. Contudo, a célula pré-sináptica não toca ou comunica anatomicamente com a célula pós-sináptica; ambas são separadas por um espaço conhecido por fenda sináptica. Os neurônios pré-sinápticos, mediante os seus axônios, passam sinais para pontos alvos pós-sinápticos, que podem ser os dendritos, o axônio ou o corpo celular de outro neurônio, células musculares ou células glandulares, através das sinapses, as quais podem ser de dois tipos: elétricas e químicas (Gundelfinger *et al.*, 2003).

Os neurônios que se comunicam mediante sinapses elétricas são conectados por junções comunicantes (*gap junction*) através das quais os impulsos elétricos passam diretamente da célula pré-sináptica para a pós-sináptica. A vantagem das sinapses elétricas é a velocidade, já que o impulso direto evita a demora ao redor de 0,5 ms, característica das sinapses químicas. A sinapse química, base funcional do sistema nervoso, é uma estrutura especializada e autorregulada. É integrada por um terminal pré-sináptico, que contém vesículas sinápticas (VSS), as quais armazenam neurotransmissores, e uma área correspondente da célula pós-sináptica, que contém receptores específicos para os neurotransmissores. As sinapses químicas podem ser excitatórias ou inibitórias. Nas excitatórias, o neurotransmissor liberado pela célula pré-sináptica produz uma mudança localizada na membrana da célula pós-sináptica que a leva a se despolarizar, promovendo a geração de um potencial elétrico. Nas sinapses inibitórias, o neurotransmissor causa uma mudança na permeabilidade de íons, que tende a bloquear o potencial da célula pós-sináptica por hiperpolarização de suas membranas (Purves *et al.*, 2001). (**Figura 2**).

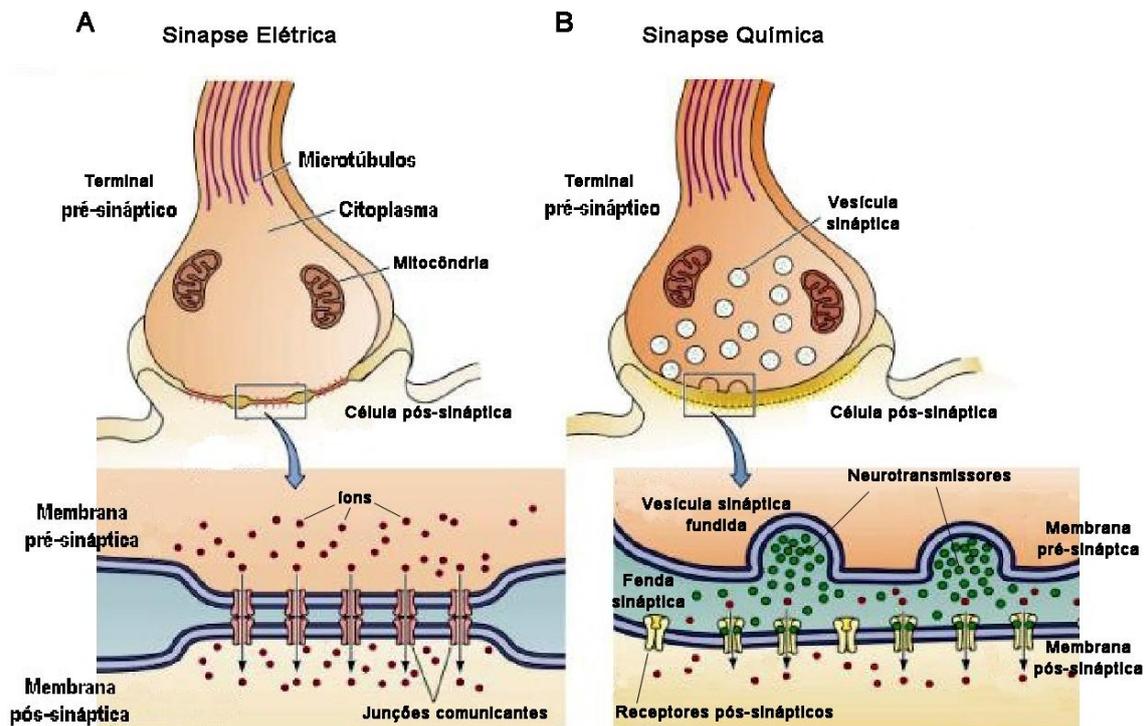


Figura 2. Desenho esquemático comparando sinapse elétrica e química. As sinapses elétricas (A) e químicas (B) diferem fundamentalmente em seus mecanismos de transmissão. Nas sinapses elétricas, junções comunicantes entre as membranas pré e pós-sinápticas, unem-nas e permitem o fluxo iônico passivo entre as células. Nas sinapses químicas não existe continuidade intercelular; a célula pré-sináptica libera neurotransmissores que se ligarão a receptores na membrana da célula pós-sináptica e desencadearão uma resposta. Adaptado a partir de Purves *et al*, 2001.

Apesar da existência de dois tipos de sinapses, a química e a elétrica, as sinapses químicas estão presentes em maior número do que as elétricas, constituindo a principal forma de comunicação entre neurônios no SNC. Através das sinapses químicas, a exocitose de uma única vesícula sináptica pode desencadear a abertura de milhares de canais iônicos pós-sinápticos, o que caracteriza a propriedade de amplificação do sinal pré-sináptico nas sinapses químicas e ainda, devido a alterações na frequência e intensidade de uso dessas sinapses, elas se alteram respondendo de forma diferenciada a novos estímulos, caracterizando a plasticidade sináptica (Jessell and Kandel, 1993).

1.2. Reciclagem de vesículas sinápticas

De uma maneira geral, a transmissão sináptica envolve a reciclagem de VSs, liberação de neurotransmissores a partir do terminal nervoso e ativação de receptores pós-sinápticos (Heuser and Reese, 1973; revisado por Südhof and Rizo, 2011). Todas as funções pré-sinápticas, direta ou indiretamente, envolvem VSs, que se submetem a um tráfego cíclico, conhecido como ciclo de vesículas sinápticas, o qual pode ser dividido em dois grandes eventos: exocitose e endocitose de VSs, os quais são regidos por diversas e importantes interações entre proteínas presentes na membrana das VSs e na membrana plasmática do terminal nervoso. (**Figura 3**)

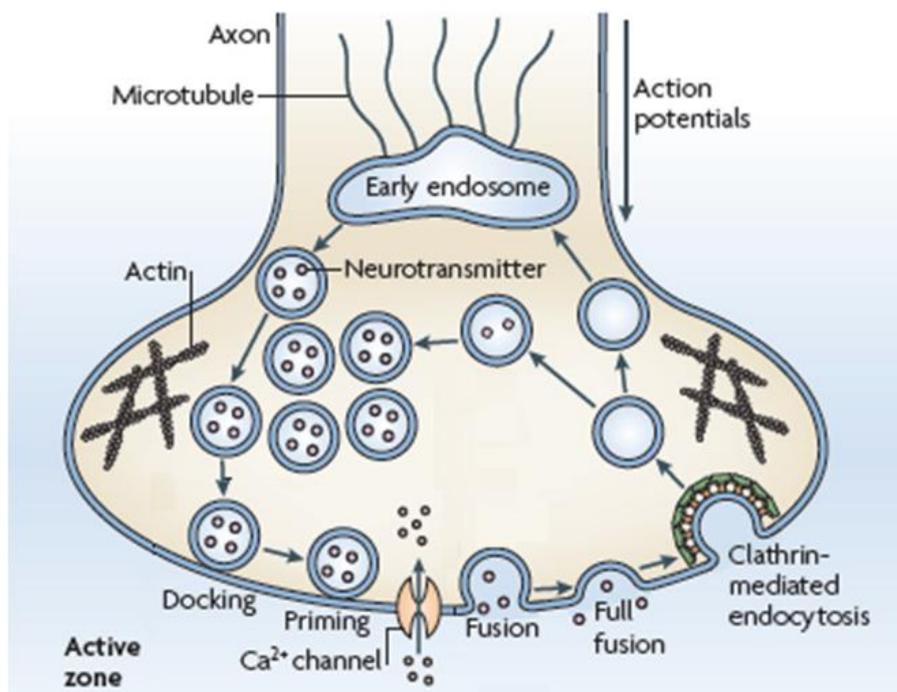


Figura 3: Etapas básicas da neurotransmissão. Com a chegada de um potencial de ação (*action potential*) no terminal pré-sináptico ocorre a abertura de canais para cálcio sensíveis à voltagem (Ca^{2+} channel) e consequente influxo deste íon para o terminal, levando a um aumento da concentração intraterminal deste cátion. Vesículas sinápticas contendo neurotransmissores se acumulam nas adjacências das zonas ativas (*active zone*), sítios subcelulares da liberação vesicular. As vesículas que se ancoram na zona ativa (*docking*) sofrem uma reação de amadurecimento (*priming*) que as tornam competentes para a abertura de um poro de fusão (*fusion*), coalescência com a membrana plasmática do terminal (*full fusion*) e exocitose dos neurotransmissores. Após a exocitose, as VSs são reconstituídas por meio de endocitose compensatória (*clathrin-mediated endocytosis*) (Adaptado a partir de de Saint Basile *et al.*, 2010).

1.2.1. Exocitose de vesículas sinápticas

A liberação de neurotransmissores a partir de um terminal pré-sináptico é realizada através da exocitose de VSs, a qual é precedida por alguns eventos importantes: a) os neurotransmissores são ativamente transportados para dentro das VSs; (b) as vesículas agrupam-se em frente à zona ativa; (c) ancoram-se nesta; (d) amadurecem e então; (e) tornam-se competentes para a fusão e consequente exocitose disparada por cálcio (Südhof, 2004).

A captação dos neurotransmissores para dentro das vesículas é mediada por sete diferentes transportadores, específicos para cada um dos neurotransmissores. O glutamato é captado por três deles: VGLUT-1 (neurônios glutamatérgicos do hipocampo e córtex), VGLUT-2 (neurônios glutamatérgicos do tálamo e tronco encefálico) e VGLUT-3 (neurônios dispersos, frequentemente não associados com liberação de glutamato) (Fremeau *et al.*, 2004 b; Blakely and Edwards, 2012). As monoaminas por outros dois: VMAT-1 (células não neuronais, como as células cromafins) e VMAT-2 (neurônios) (Erickson *et al.*, 1996). Um único transportador foi identificado para GABA e glicina: VGAT (neurônios inibitórios do cérebro [predominantemente GABAérgicos] e neurônios inibitórios glicinérgicos e GABAérgicos do tronco encefálico e medula espinhal) (Wojcik *et al.*, 2006). Um outro transportador para acetilcolina: VACHT (neurônios colinérgicos do SNC e junção neuromuscular [JNM]) (Parsons *et al.*, 1993; Prado *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2013).

Todas as etapas seguintes ao preenchimento vesicular requerem interação proteica e fusão da membrana da VS com a membrana do terminal neuronal. Os eventos de interação de proteínas e fusão de membranas que culminam com a exocitose vesicular são orquestrados por uma maquinaria proteica que inclui dois grupos principais de proteínas: o complexo SNARE e as proteínas SM (Südhof and Rizo, 2011).

O complexo SNARE é formado pela proteína sinaptobrevina/VAMP, localizada na membrana das VSs e também chamada de v-SNARE (*vesicular SNARE*) e, pelas proteínas syntaxina 1 e SNAP-25, situadas na membrana plasmática do terminal pré-sináptico e também chamadas de t-SNARE (*target SNARE*) (Söllner *et al.*, 1993). O complexo proteico que aproxima as duas membranas é formado pelo motivo R-SNARE da sinaptobrevina, pelo motivo Qa-SNARE da syntaxina 1, e pelos motivos Qb- e Qc-SNARE da SNAP-25. O complexo SNARE apenas aproxima as vesículas da

membrana, sendo incapaz de abrir o poro de fusão (Südhof, 2004; Südhof and Rizo, 2011). O processo de fusão das membranas vesicular e pré-sináptica se inicia com a proteína sinaptotagmina 1, uma proteína integral da membrana das VSs que funciona como um sensor de cálcio ligando-se a este íon (por meio de seus domínios C2A e C2B), às proteínas SNAREs e a fosfolípidos da membrana plasmática (Murthy and De Camilli, 2003; Chapman, 2008). Ela é fundamental para a ancoragem, fusão e reciclagem das VSs. A sinaptotagmina pode se ligar ao complexo SNARE na ausência de cálcio, mas precisa deste íon para fundir-se com a membrana fosfolipídica. O domínio C2A da sinaptotagmina é capaz de se ligar a 3 íons cálcio e o C2B a 2 íons. O domínio C2A está diretamente relacionado à fusão das vesículas. A ligação deste domínio da sinaptotagmina à membrana pré-sináptica resulta na inserção parcial de aminoácidos hidrofóbicos nesta última, resultando em um estresse mecânico que desestabiliza a membrana e provoca a abertura de um poro e posterior inserção dos componentes de membrana das vesículas na membrana plasmática (Chapman, 2008; Südhof and Rizo, 2011). (**Figura 4**).

Todos os tipos de fusão de membrana intracelular que são controladas por SNAREs também dependem de um grupo de proteínas, chamadas de proteínas SM. A formação do complexo SNARE na sinapse e outras funções intracelulares são controladas por proteínas SM (Südhof and Rothman, 2009; Rizo and Südhof, 2012). Este grupo de proteínas interage com o complexo SNARE de diferentes formas, mas principalmente como “grampos de ligação” tanto com v-SNAREs quanto t-SNAREs. Dentre as SM, duas subfamílias tem papel de destaque no ciclo de VSs: Sec 1/Munc 18 que age durante a exocitose e Vps 45 que atua na endocitose (Carr and Rizo, 2010). Embora permaneça obscuro o motivo pelo qual as proteínas SNAREs requeiram as SM para fusão, a estrutura destas últimas sugere que elas podem se envolver em torno do complexo SNARE, mantendo-o reunido. Esta interação pode organizar espacialmente este complexo, mantendo-o do lado interno das membranas em fusão e promovendo agregação do complexo SNARE. Além disso, as proteínas SM podem catalisar fosfolípidos durante a fusão, provavelmente alterando a curvatura da membrana (Carr and Rizo, 2010).

Durante a exocitose as VSs ancoram e fundem em regiões especializadas do terminal nervoso, chamadas de zonas ativas, que contém proteínas chaves para o ciclo de VSs, as quais estão presentes em todos os tipos de sinapses. As zonas ativas têm, no mínimo, três funções muito importantes: 1) elas unem, fisicamente, VSs, canais para

cálcio e outros componentes pré-sinápticos em um único complexo, garantindo assim uma colocação eficiente dos elementos, o que possibilitam uma transmissão sináptica rápida; 2) elas organizam receptores pré-sinápticos para permitir modulação da liberação de neurotransmissores e; 3) elas mediam várias formas de plasticidade pré-sináptica de curto e longo prazo. Todas estas três funções são cruciais para a transmissão sináptica (Südhof and Rizo, 2011).

Diversas outras proteínas têm participação importante durante a exocitose de VSs, no entanto, não constitui escopo deste trabalho uma descrição detalhada de todas as proteínas envolvidas nesta etapa do ciclo de VS; o que pode ser encontrado em excelentes revisões disponibilizadas na literatura.

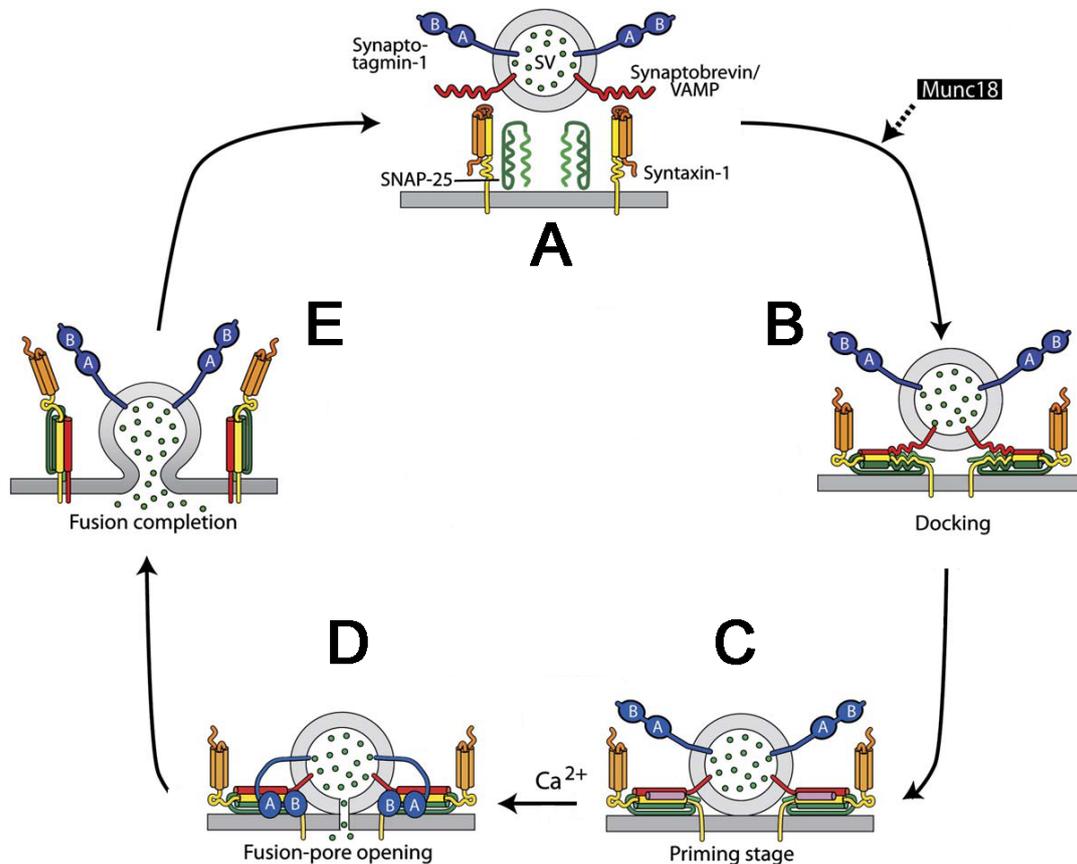


Figura 4. Participação do complexo SNARE na exocitose de VSs: as VSs se aproximam das zonas ativas (A) e então ocorre a interação entre as proteínas dos complexos v- e t-SNARE (B), o que envolve a participação de outras proteínas, dentre elas a Munc-18, da família das proteínas SM, resultando no ancoramento das VSs (*docking*). O entrelaçamento progressivo das proteínas SNARE promove a aproximação das membranas vesicular e plasmática, caracterizando um dos muitos estágios de amadurecimento das VSs (*priming stage*) (C). O influxo de cálcio para o terminal nervoso promove a fusão das membranas e abertura inicial de um poro de fusão (*fusion-pore opening*). Esta etapa é mediada pela ação da proteína sinaptotagmina (D). Posteriormente a membrana das VSs se funde completamente com a do terminal (*fusion completion*) e ocorre a liberação maciça dos neurotransmissores (E). Todas essas etapas compõem o evento de exocitose das VSs, após a qual ocorrerá a endocitose e reciclagem das VSs, que serão disponibilizadas para um novo ciclo. Adaptado a partir de Tang *et al*, 2006.

1.2.2. Endocitose de vesículas sinápticas

Os neurônios podem manter altas frequências de transmissão sináptica sem exaurir o suprimento de VSs presente nas terminações nervosas. Esta capacidade se deve à existência de mecanismos de endocitose eficientes que recapturam e reutilizam membrana plasmática das VSs após a fusão destas com a membrana plasmática do terminal (Saheki and De Camilli, 2012).

Após a exocitose, as VSs são endocitadas e recicladas por uma de três vias alternativas: (a) endocitose mediada por capa de clatrina (Heuser and Reese, 1973); (b) endocitose chamada “*Kiss and Run*” (Ceccarelli *et al.*, 1973) e; (c) endocitose via invaginação de membrana e formação de cisternas, das quais podem brotar vesículas revestidas por clatrina (Richards *et al.*, 2000).

A endocitose de VSs mediada via ação da proteína clatrina, foi pioneiramente descrita por Heuser and Reese (1973). Neste modelo de endocitose, após a completa fusão e coalescência da vesícula com a membrana plasmática do terminal, forma-se uma capa de clatrina sobre a membrana de VSs, que foi inserida na membrana pré-sináptica. Regiões revestidas por clatrina são tipicamente observadas nas margens externas das zonas ativas (Heuser and Reese, 1973). Estas áreas especializadas para a endocitose formam uma região bioquímica e anatomicamente distinta, chamada de região endocítica ou zona periativa (Wan *et al.*, 2000). A nucleação da clatrina começa com a interação de adaptadores de clatrina com os lipídios e proteínas, obrigatoriamente intrínsecos da membrana vesicular que agora estão imersos na membrana plasmática neuronal. Subsequentemente, as interações dos adaptadores uns com os outros, dos adaptadores com outros fatores acessórios e com a clatrina levam ao rápido crescimento de uma cobertura sobre a membrana. Em seguida, é formado um broto invaginado, revestido de clatrina, o qual possui um “colo” estreito. A fissão deste colo através de uma reação que requer a participação da proteína dinamina (uma GTPase) leva à formação de uma vesícula que rapidamente perde seu revestimento de clatrina (Takei *et al.*, 1996; Ferguson and De Camilli, 2012). Após a perda do revestimento de clatrina, as VSs também podem fundir-se com endossomas e VSs autênticas podem brotar a partir desse endossoma (Murthy and De Camilli, 2003).

A endocitose via clatrina consiste em um mecanismo extremamente importante de recuperação dos componentes lipídicos e proteicos próprios da membrana vesicular, resgatando a identidade das VSs que se fundiram completamente com a membrana do

terminal. Apesar do conhecimento sobre as vias endocíticas, acredita-se que a via mediada por clatrina seja a mais comum, apesar do longo tempo requerido para a reciclagem por esta via, comparado ao tempo de 1 milissegundo da liberação sináptica. Porém se a atividade de qualquer uma das proteínas envolvidas na via da clatrina for perturbada, a transmissão sináptica torna-se prejudicada (Südhof, 2004). (**Figuras 5 e 6**).

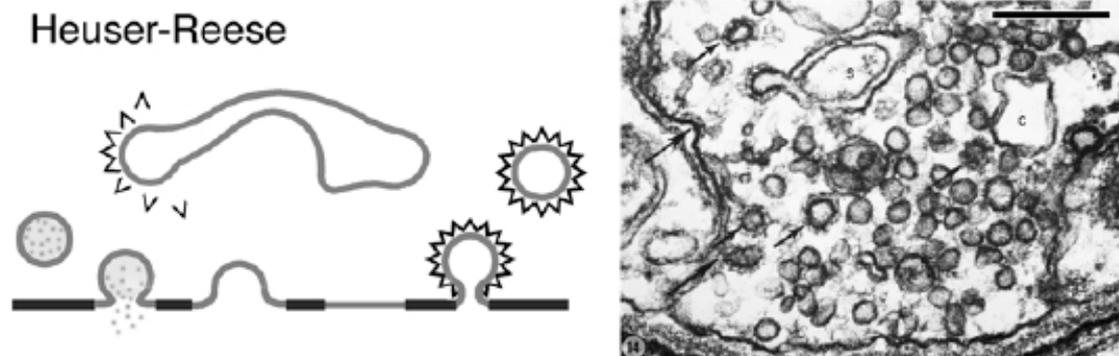


Figura 5. Modelo de endocitose de VSs via ação da proteína clatrina. À esquerda - Modelo de Heuser and Reese no qual as VSs são completamente integradas à membrana da zona ativa durante a exocitose e são recicladas por meio de endocitose mediada por capa de clatrina. Vesículas cobertas podem também brotar a partir de grandes endossomas (diagrama à esquerda). À direita - Micrografia eletrônica mostrando a presença de depressões de membrana e vesículas cobertas por capa de clatrina (setas) em terminação motora submetida a estímulo elétrico. É possível observar também a presença de endossomas (c). (Heuser and Reese, 1973; revisado por Royle and Lagnado, 2003).

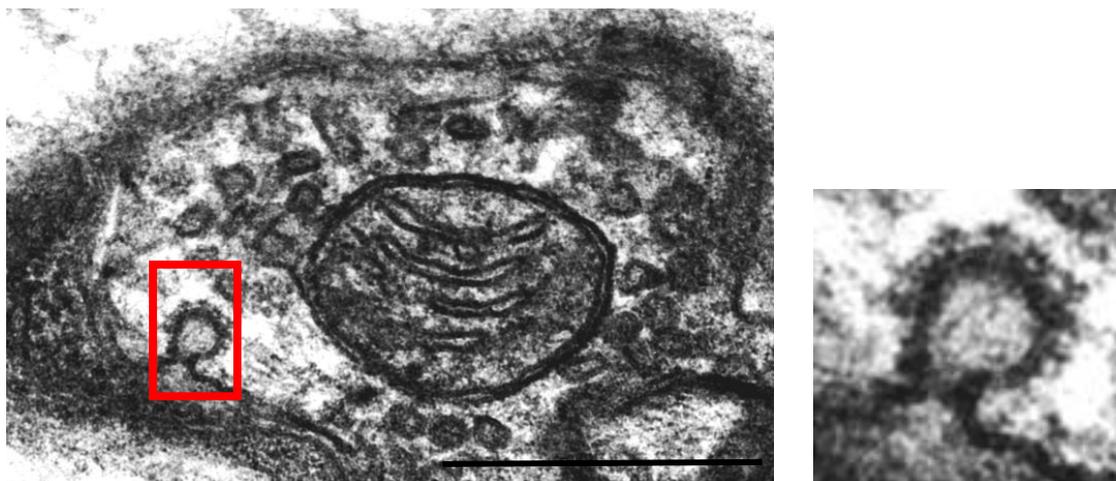


Figura 6. Endocitose de VS mediada por clatrina na JNM de camundongo. À esquerda - É possível observarmos o perfil de um terminal pré-sináptico de JNM de camundongo, contendo diversas VSs e uma mitocôndria. À direita - observamos em detalhe a área destacada pelo retângulo vermelho na imagem da esquerda, na qual podemos observar o processo de endocitose de uma VS mediado por capa de clatrina. (Barra de escala: 500 nm). (Hermann A. Rodrigues).

Outra forma de endocitose é o chamado mecanismo “*kiss and run*”. A potencial existência deste modelo de endocitose de VSs foi inicialmente aventada por Cecarelli *et al.* (1973) através de estudos pioneiros sobre reciclagem de VSs utilizando a JNM de rã. Contudo, esse termo foi empregado a partir da década de 1990 por Fesce e colaboradores (1994). Neste modelo, as vesículas liberam os neurotransmissores via um poro de fusão transiente e então são recapturadas, podendo permanecer no local, ser novamente preenchidas com neurotransmissor e submeter-se a um novo ciclo de exocitose ou, alternativamente, podendo não ancorar e permitir que outras vesículas ocupem seu lugar (Murthy and De Camilli, 2003; Südhof, 2004). Neste modelo, como não há coalescência da membrana das VSs com a membrana do terminal após a fusão, as VSs retém sua identidade molecular.

A principal linha de evidência para a existência da via “*kiss and run*” vem do emprego de sondas fluorescentes, atividade-dependente, tais como o FM1-43, que são utilizadas para monitorar os eventos de exo e endocitose de VSs (Betz *et al.*, 1992; Gaffield and Betz, 2006). Durante a exocitose de VSs previamente marcadas com sondas fluorescentes, tem sido observado que o corante pode se difundir lateralmente e se misturar na membrana plasmática do terminal nervoso e/ou pode ser liberado para a solução que contém a preparação estudada. Estudos utilizando sondas fluorescentes com diferentes cinéticas de liberação têm indicado que a exocitose ocorre de uma maneira que as VSs retém uma quantidade significativa da sonda. Estes resultados têm sido interpretados como o reflexo de uma endocitose rápida, sem fusão completa de membranas, o que então leva a retenção do corante (Pyle *et al.*, 2000; Stevens and Williams, 2000).

Não obstante, a ocorrência de eventos de “*kiss and run*” e seus mecanismos subjacentes permanecem em aberto, com questões importantes que precisam ser respondida, como por exemplo: quais são os fatores que evitam a fusão completa das membranas? (Murthy and De Camilli, 2003; Saheki and De Camilli, 2012). (**Figura 7**).

Ceccarelli

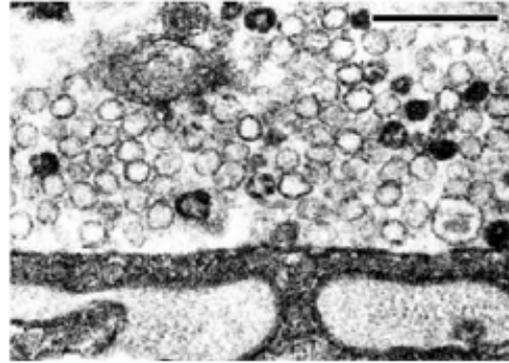
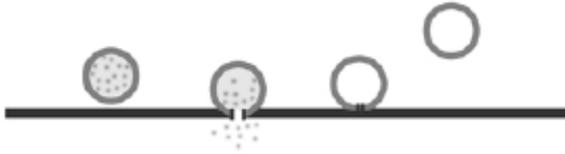


Figura 7. Modelo de endocitose de VSs via mecanismo “Kiss and run”. À esquerda - Diagrama representando o modelo de “*kiss and run*”, no qual, durante a liberação de neurotransmissores, as vesículas abrem um poro de fusão transitório, mas não se fundem completamente com a membrana pré-sináptica, sendo recicladas localmente. À direita - Micrografia eletrônica de uma terminação motora submetida a estímulo elétrico de baixa frequência por duas horas. Destaca-se a ausência de vesículas cobertas por capa de clatrina e de endossomas. (Ceccarelli *et al.*, 1973; revisado por Royle and Lagnado, 2003).

O terceiro mecanismo de endocitose de VSs consiste na formação de grandes invaginações de membrana plasmática do terminal, a qual já foi observada em uma ampla variedade de sinapses, incluindo a JNM de rã (Richards *et al.*, 2000), terminais motores de cobra (Teng *et al.*, 1999; Teng and Wilkinson, 2000) e neurônios hipocâmpais de rato (Takei *et al.*, 1996). Estas grandes invaginações ocorrem distantes do sítio de fusão das VSs e acredita-se que sua formação não envolva diretamente a participação da clatrina (Royle and Lagnado, 2003). As invaginações podem ser destacadas a partir da superfície da membrana, formando intermediários semelhantes à endossomas, ou podem permanecer conectadas com a membrana plasmática (Heuser and Reese, 1973; Takei *et al.*, 1996). Acredita-se que estas invaginações não sejam formadas pela coalescência de vesículas internalizadas revestidas por clatrina; ao invés disso, VSs podem ser formadas por endocitose mediada por clatrina a partir dessas invaginações (Teng and Wilkinson, 2000). A fissão das cisternas invaginadas a partir da membrana plasmática requer um mecanismo ativo, que parece ser independente de dinamina, porque alguns estudos relatam a sua ocorrência mesmo na ausência desta proteína, ao passo que a endocitose mediada por clatrina torna-se severamente prejudicada (Ferguson *et al.*, 2007; Saheki and De Camilli, 2012).

Esta forma de endocitose de VSs ocorre mais abundantemente sob forte condição estimulatória, quando um grande número de VSs funde-se com a membrana plasmática do terminal em um curto intervalo de tempo (Saheki and De Camilli, 2012). A internalização de membrana, mediada por esta forma de endocitose, pode evitar uma

expansão excessiva da superfície celular sob condições nas quais a endocitose mediada por clatrina torna-se limitada (Murthy and De Camilli, 2003). Este processo é um mecanismo não seletivo de recaptção de membrana. Contudo, os intermediários resultantes, semelhantes à endossomas, podem ser ricos em proteínas da membrana próprias das VSs, dada a abundância destas proteínas na membrana plasmática pré-sináptica em resposta a uma massiva exocitose de VSs (Heuser and Reese, 1973; Saheki and De Camilli, 2012). Entretanto, os mecanismos moleculares subjacentes a endocitose via invaginação de membrana permanecem amplamente desconhecidos (Saheki and De Camilli, 2012). (**Figura 8**).

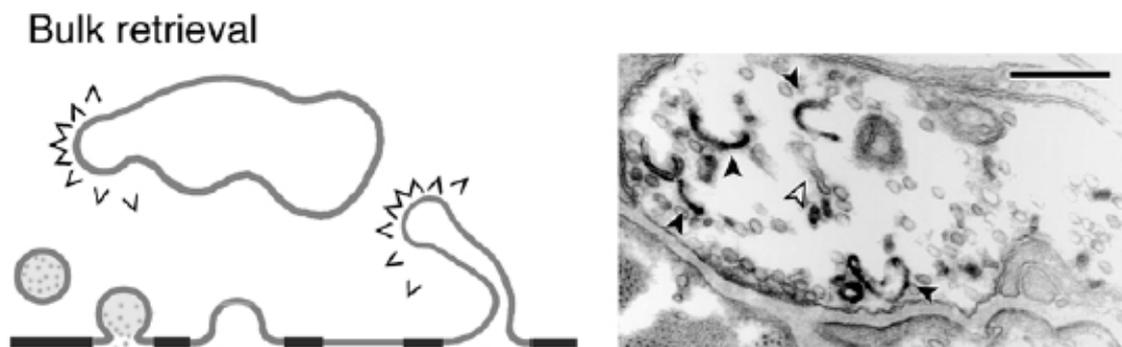


Figura 8. Modelo de endocitose de VSs via invaginação de membrana e formação de cisternas. À esquerda - Diagrama representando a endocitose via grandes invaginações de membrana após a liberação vesicular. À direita - Micrografia eletrônica mostrando a presença de invaginações de membrana contendo FM1-43 fotoconvertido (setas pretas) ou desprovidas do marcador (seta clara). (Richards *et al.*, 2000; revisado por Royle and Lagnado, 2003).

Independente do mecanismo de endocitose, as VSs recicladas serão reacidificadas e repreenchidas diretamente ou após passar por um endossoma intermediário (Heuser and Reese, 1973; Murthy and De Camilli, 2003), possibilitando o recomeço do ciclo de VSs. É importante mencionar que diversas outras proteínas acessórias são necessárias para acelerar e otimizar os processos de endocitose de VSs (Rizo and Sudhof, 2002), mas a descrição detalhada de todas elas não constituiu objetivo deste trabalho e pode ser estudada através de uma vasta quantidade de estudos referentes ao tema e disponibilizados na literatura.

1.2.3. Aglomerados de vesículas sinápticas

O terminal nervoso pré-sináptico, especialmente na JNM madura, contém algumas mitocôndrias e muitas VSs, que ciclam continuamente, conforme descrito anteriormente, o que permite a utilização repetida destas durante a atividade neuronal sustentada. À microscopia eletrônica de transmissão as VSs são todas parecidas morfológicamente, apesar de uma evidente diferença de localização espacial (Rizzoli and Betz, 2005; Alabi and Tsien, 2012).

Nos terminais nervosos as VSs estão dispostas em um dos três grupos ou aglomerados vesiculares funcionalmente definidos: 1) o aglomerado prontamente liberável (*Readily Releasable Pool - RRP*); 2) o aglomerado de reciclagem (*Recycling Pool - RP*) e; 3) o aglomerado de repouso (*Resting Pool - R_iP*). Apesar desta divisão didática, os aglomerados vesiculares de um terminal nervoso não são morfológicamente separados (Rizzoli and Betz, 2005; Alabi and Tsien, 2012). (**Figura 9**).

O aglomerado prontamente liberável (*RRP*) é formado pelas vesículas ancoradas nas zonas ativas dos terminais pré-sinápticos. Na JNM de vertebrados este aglomerado é formado por cerca de 10.000 VSs (Rizzoli and Betz, 2005). Este grupo está apto para a exocitose imediata e pode ser mobilizado mediante aplicação de solução hipertônica de sacarose (Rosenmund and Stevens, 1996). Embora a utilização de sacarose hipertônica no estudo de eventos sinápticos remonte ao início dos anos de 1950 (Fatt and Katz, 1952), seu mecanismo de ação preciso ainda não foi compreendido completamente, apesar do conhecimento de que a resposta ao estímulo hipertônico é independente de cálcio (Rosenmund and Stevens; Sara *et al.*, 2002).

O aglomerado de reciclagem (*RP*) consiste das vesículas próximas à membrana pré-sináptica, mas não ancoradas nas zonas ativas. O número de VSs deste grupo é estimado em cerca de 75.000 na JNM de vertebrados (Rizzoli and Betz, 2005). Este aglomerado, junto com o prontamente liberável, forma o aglomerado de reciclagem total (*Total Recycling Pool - TRP*), definido como o conjunto de vesículas que mantém a liberação de neurotransmissores em estimulação fisiológica moderada e que podem ser marcadas com sondas lipofílicas como o FM1-43 (Richards *et al.*, 2000 e 2003). As VSs do RP podem repovoar o RRP, sendo que a cinética desta transição impacta sobre a neurotransmissão e oferece um ponto de controle potencial para regular a eficiência da liberação (Alabi and Tsien, 2012).

O aglomerado de repouso (R_tP) é composto pelas vesículas mais distantes das zonas ativas pré-sinápticas. Sua população de VSs, para a JNM de vertebrados é de aproximadamente 400.000 (Rizzoli and Betz, 2005). Este aglomerado consiste em um depósito de VSs, sobre o qual os mecanismos de recrutamento encontram-se sob intenso debate na literatura (Fredj and Burrone, 2009; Hua *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2012). No entanto, o R_tP pode ter importantes funções fisiológicas, tais como: ele pode ser dinamicamente trocado entre botões sinápticos do SNC de mamíferos, como membros de um “superaglomerado” de VSs (Fernandez-Alfonso and Ryan, 2008) e; o R_tP também pode servir como um reservatório para a captura e suprimento de proteínas utilizadas na reciclagem de VSs (Denker *et al.*, 2011).

As VSs são agrupadas mediante ação da proteína sinapsina, a qual age como uma “cola” unido-as. As sinapsinas são fosfoproteínas associadas com VSs que participam da regulação do agrupamento vesicular e liberação de neurotransmissores (Coleman *et al.*, 2008). Diversos estudos têm indicado que as sinapsinas são responsáveis por manter o aglomerado de repouso (Samigullin *et al.*, 2004; Coleman and Bykhovskaia, 2010; Akbergenova and Bykhovskaia, 2010). No entanto, as sinapsinas estão envolvidas também em eventos relacionados com o ancoramento ou pós-ancoramento de VSs na membrana dos terminais nervosos (Tao-Cheng, 2006; Coleman *et al.*, 2008).

Atualmente, muitas pesquisas têm sido conduzidas em todo o mundo, na tentativa de se isolar componentes moleculares que identifiquem separadamente cada aglomerado vesicular. No entanto, nenhum modelo definitivo de diferenciação bioquímica tem sido proposto, apesar da identificação de algumas proteínas inerentes a grupos particulares de VSs (Hua *et al.*, 2011; Ramirez *et al.*, 2012). É provável que a união de evidências morfológicas, biofísicas e bioquímicas seja o melhor caminho para se esclarecer as questões que ainda permanecem em aberto com relação ao entendimento mais amplo sobre os aglomerados vesiculares de terminais nervosos.

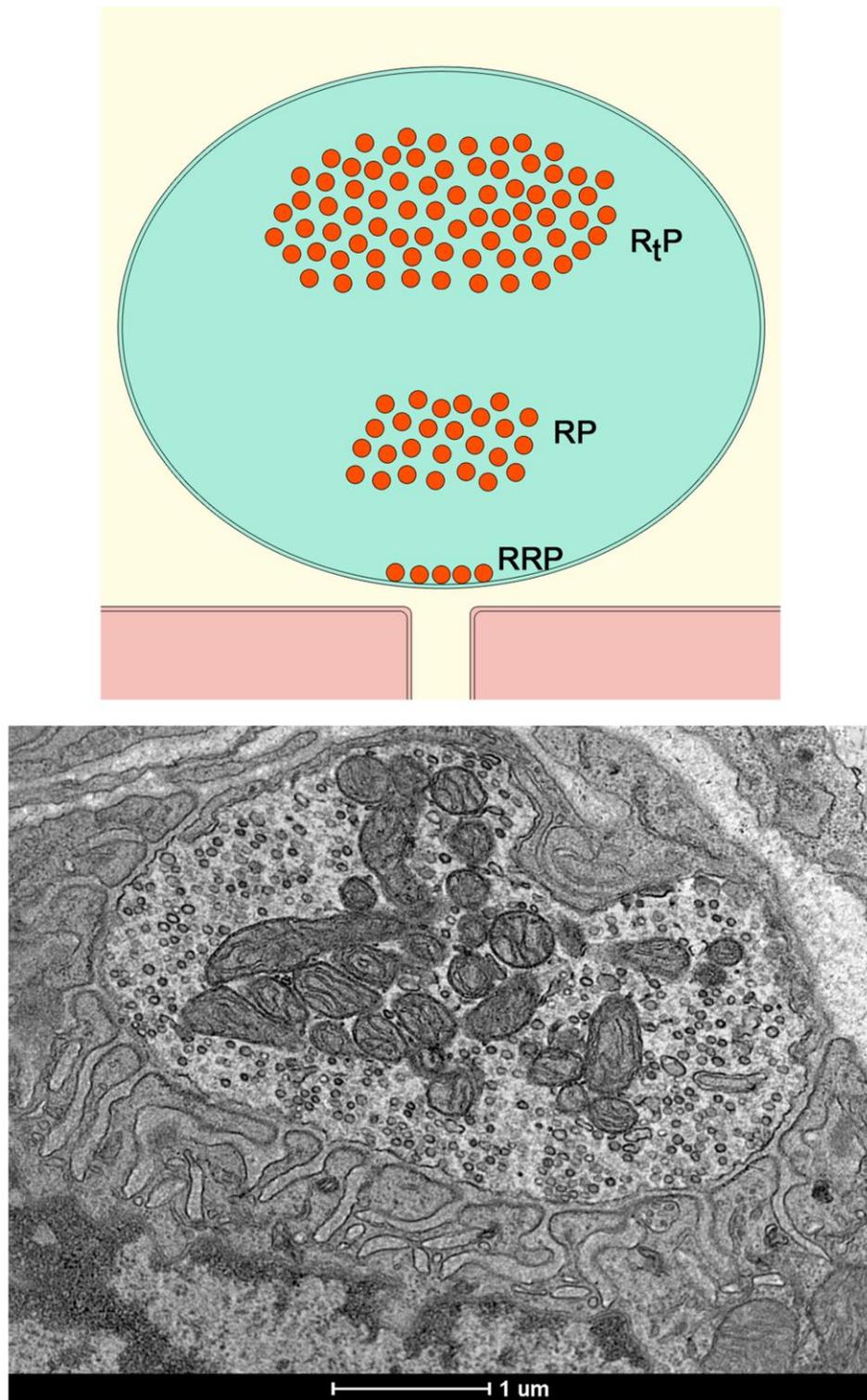


Figura 9. Aglomerados de VSs na JNM de vertebrados. Painel superior – Esquema representativo, meramente didático, dos aglomerados de VSs (esferas de cor laranja) presentes em um terminal nervoso (círculo verde) e dispostas em relação à zona ativa pré-sináptica, ou seja, em aposição a uma dobra de membrana muscular pós-sináptica (retângulos rosa). Desenho adaptado a partir de Rizzoli and Betz, 2005. **Painel inferior** – Elétron-micrografia de transmissão mostrando o perfil de um terminal pré-sináptico de JNM de camundongo, contendo numerosas VSs, que não são anatomicamente separadas, conforme mostrado didaticamente no painel superior. Barra de escala: 1 μ m. Aumento: 18.500 x. (Hermann A. Rodrigues).

1.3. A neurotransmissão colinérgica

Como vimos anteriormente, 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 se propaga pela terminação nervosa, induz a abertura de canais para cálcio e o aumento transiente da concentração intracelular deste íon estimula a exocitose de VSs e liberação dos neurotransmissores para a fenda sináptica (Katz, 1966). Após a exocitose, as VSs submetem-se à endocitose, reciclagem e reenchimento com neurotransmissores para permitir um novo ciclo vesicular (Katz and Miledi, 1965; Katz and Miledi, 1969; revisado por Murthy and De Camilli, 2003; Südhof, 2004).

Os neurotransmissores podem ser divididos em três categorias: 1) aqueles que são aminoácidos simples, tais como o glutamato, o ácido gama-amino-butírico (GABA) e a glicina; os quais participam da transmissão em cerca de mais de 90% de todas as sinapses do SNC e são responsáveis por uma transferência de informação mais rápida; 2) aqueles que abrangem uma grande variedade de neuropeptídeos, os quais agem predominantemente como neuromoduladores, controlando a atividade de receptores difusos em vez de apenas nos sítios sinápticos; 3) aqueles que são transmissores clássicos, tais como a acetilcolina (ACh), as catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina) e a 5-hidroxitriptamina (5-HT ou serotonina). Estes têm ação predominantemente lenta e papel modulatório no SNC (Nicholls, 1994). Os neurotransmissores clássicos são sintetizados na própria terminação nervosa, sendo posteriormente armazenados no interior das VSs e liberados na fenda sináptica, próximo aos seus receptores, como é o caso da ACh, o neurotransmissor da JNM de vertebrados e que constitui assunto importante deste trabalho (Ceccarelli *et al.*, 1973; Couteaux, 1974).

No SNC a ACh é encontrada principalmente em interneurônios; projeções colinérgicas do núcleo basal de Meynert para o hipocampo, córtex cerebral e complexo amigdalóide; projeções do septo medial para estruturas límbicas e; áreas subcorticais inervadas por neurônios originados de regiões ponto-mesencefálicas (Mesulam, 2004). No sistema nervoso autônomo este neurotransmissor está presente em todas as sinapses pré-ganglionares simpáticas e parassimpáticas; todas as sinapses pós-ganglionares parassimpáticas e; sinapses pós-ganglionares simpáticas de glândulas sudoríparas e músculo erector dos pêlos. No sistema nervoso periférico (SNP), a ACh é o

neurotransmissor da JNM de vertebrados, estabelecida entre nervo motor e músculo estriado esquelético (Nicholls, 1994; Hammond, 2008).

A ACh, é sintetizada no terminal pré-sináptico pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), a partir da colina e do acetil-CoA, este último proveniente da respiração mitocondrial. Após sua síntese, a ACh é armazenada no interior das VSs através do seu transportador vesicular, o VAcHT (transportador vesicular de acetilcolina), uma proteína com 12 domínios transmembrana. Para transportar ACh, o VAcHT utiliza um gradiente eletroquímico gerado por bombas de prótons presentes na membrana vesicular, as VH^+ -ATPases (Nguyen *et al.*, 1998; revisado por Prado *et al.*, 2002; Bravo and Parsons, 2002). Essas VH^+ -ATPases, por meio da hidrólise do ATP, translocam prótons H^+ para o interior das VSs, estabelecendo duas condições: primeira, o pH no interior da vesícula torna-se mais ácido, gerando um gradiente químico de pH (ΔpH) através da membrana vesicular; segunda, o interior da vesícula torna-se abundante em cargas positivas, criando um potencial elétrico transmembrana ($\Delta\Psi$). O somatório dessas duas condições corresponde ao gradiente eletroquímico, representado pela equação $\Delta\mu H^+ = \Delta pH + \Delta\Psi$ (revisado por Liu and Edwards, 1997; Ozkan and Ueda, 1997). O VAcHT realiza, então, a troca de dois íons H^+ por uma molécula de ACh, preenchendo o interior das vesículas com cerca de 5.000 a 10.000 moléculas deste neurotransmissor (Nguyen and Parsons, 1995; Nguyen *et al.*, 1998; Nogajski *et al.*, 2009). Após a exocitose das VSs a ACh difunde-se pela fenda sináptica, liga-se aos seus receptores na membrana pós-sinápticas e promove alterações na permeabilidade iônica desta, que irão desencadear a resposta da célula inervada. Adicionalmente, a ACh também é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, gerando colina e acetato. A colina é recaptada para o interior da terminação nervosa por meio de seu transportador (CHT), podendo ser novamente utilizada para a síntese de nova ACh (Birks and MacIntosh, 1961; revisado por Ribeiro *et al.*, 2006 e Prado *et al.*, 2013) (**Figura 10**).

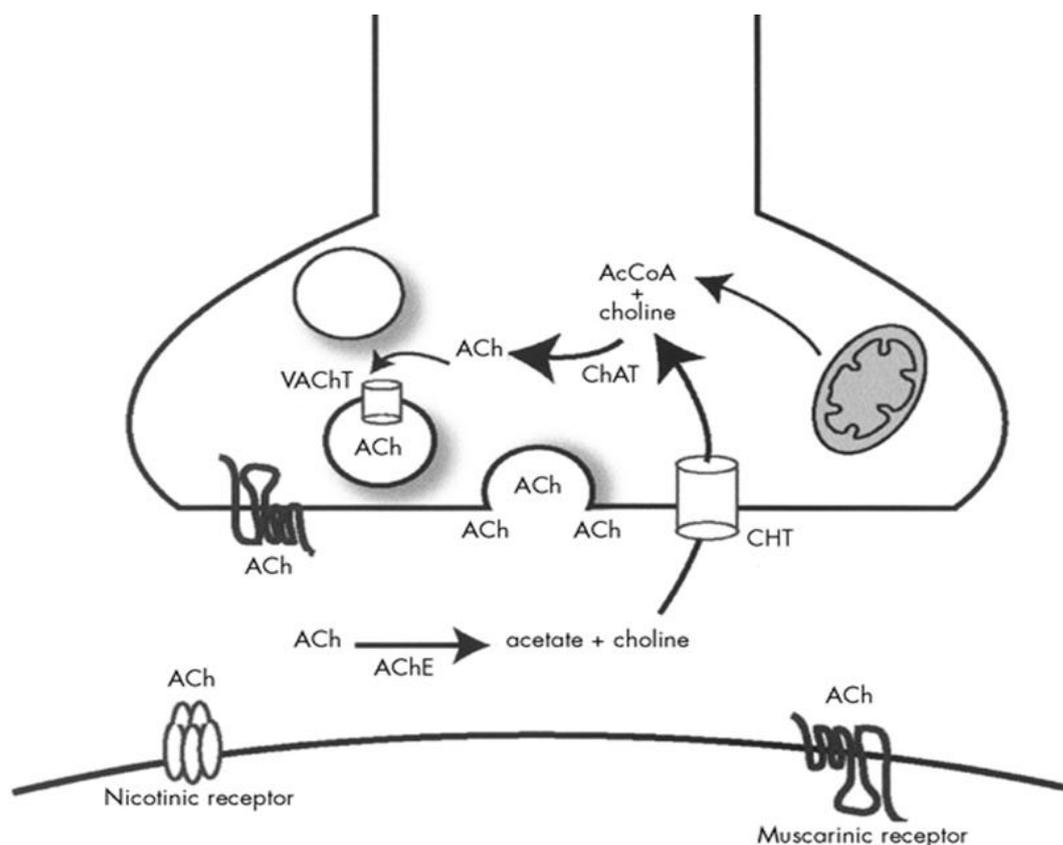


Figura 10: Desenho esquemático mostrando a síntese, o armazenamento e a liberação de acetilcolina. A acetilcolina (ACh) é sintetizada no terminal pré-sináptico pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir da colina e do acetil-CoA, advindo da respiração mitocondrial. Após sua síntese, a acetilcolina é armazenada no interior das vesículas sinápticas através do seu transportador vesicular, o VAcHT. Seguente à exocitose e ativação dos receptores pós-sinápticos, a acetilcolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, gerando colina e acetato. A colina é recaptada para o interior da terminação nervosa por meio de seu transportador de membrana (CHT), podendo ser utilizada para a síntese de nova acetilcolina (*The American Psychiatric Publishing – Textbook of Psychopharmacology, fourth edition. Edited by Alan F. Schatzberg and Charles B. Nemeroff, 2009*).

Os receptores pós-sinápticos para ACh podem ser de dois tipos: muscarínicos ou nicotínicos. Os receptores muscarínicos para ACh (mAChR) são do tipo metabotrópicos, ou seja, acoplados à proteínas G e consistem de uma única cadeia polipeptídica que apresenta sete domínios transmembrana. (**Figura 11**). Eles agem ativando segundos mensageiros intracelulares e estão presentes nos neurônios das vias colinérgicas do SNC e periférico, inclusive no terminal pré-sináptico da JNM; musculatura cardíaca e lisa e outros tipos celulares e teciduais, como algumas glândulas (Mesulam, 2004; Nathanson, 2008). Existem cinco tipos reconhecidos destes receptores, identificados como M1 a M5, produzidos por genes distintos. Em geral, M1, M3 e M5 geram suas respostas pós-sinápticas por ativarem a via da enzima fosfolipase C, através da ação de proteínas G da família Gq; enquanto M2 e M4 agem através da inibição da

enzima adenilato ciclase, também por ação de proteínas G, mas da família Gi/Go (Nicholls, 1994; Nathanson, 2008). Os receptores muscarínicos para ACh são diferencialmente distribuídos em neurônios, sendo que o subtipo M1 é o receptor pós-sináptico mais comum, embora não o único (Mesulam, 2004; Nathanson, 2008). Na JNM de vertebrados, o subtipo M2 age como autorreceptor pré-sináptico inibitório nos terminais nervosos dos neurônios motores (Parnas *et al.*, 2005). Embora esta forma de receptores para ACh esteja envolvida em importantes funções fisiológicas, nós não a abordaremos mais profundamente, pois ela não consiste em assunto deste trabalho. Daremos uma ênfase melhor sobre a classe nicotínica dos receptores para ACh.

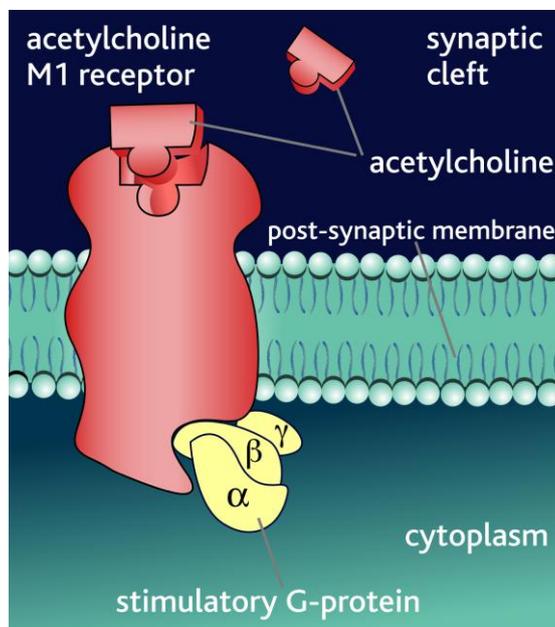


Figura 11. Desenho esquemático representando um receptor muscarínico para ACh. Este tipo de receptor está acoplado a uma proteína G, responsável por ativar segundos mensageiros, os quais atuarão em alvos moleculares específicos e desencadearão a resposta pós-sináptica. Fonte: <http://www.cnsforum.com>

Os receptores nicotínicos para ACh (nAChR) são do tipo ionotrópico, ou seja, associados a canais iônicos e controlados por ligantes. (**Figura 12**). Os nAChR são compostos por cinco subunidades (α , β , δ , γ / ϵ , com α e β podendo se repetir dentro da estrutura) que delimitam um poro aquoso central, permitindo o influxo de cátions. As cadeias polipeptídicas das subunidades contêm quatro segmentos transmembrana (Hammond, 2008). A função dos receptores nicotínicos é garantir uma transmissão

sináptica rápida, a qual é alcançada após a ligação de duas moléculas de ACh, o que gera um rápido e transiente aumento na permeabilidade catiônica, graças à alteração conformacional do canal central, saindo de um estado fechado para aberto. A duração do estado aberto depende do tempo de ocupação da ACh no seu sítio de ligação. Os nAChR ainda apresentam topograficamente sítios de ligação alostérica distintos do sítio de ligação da ACh, sobre os quais agem uma grande variedade de agentes farmacológicos e ligantes fisiológicos, que então podem modular sua abertura ou fechamento (D'hoedt and Bertrand, 2009; Albuquerque *et al.*, 2009).

Os nAChR neuronais são amplamente distribuídos no SNC e se apresentam sob a forma pentamérica típica, a qual pode ter uma combinação homomérica ou heteromérica de subunidades α e β . Eles estão principalmente localizados em sítios pré-sinápticos, onde modulam a liberação de neurotransmissores e, por vezes, podem ser encontrados em pericários ou dendritos, onde mediam efeitos pós-sinápticos (Dajas-Bailador and Wonnacott). Os nAChR neuronais formam uma família heterogênea de subtipos derivados das cinco subunidades codificadas por nove genes α ($\alpha 2 - \alpha 10$) e três genes β ($\beta 2 - \beta 4$). Esta forma de nAChR está envolvida em importantes funções fisiológicas e também em sérias condições patológicas, como por exemplo a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, algumas formas de epilepsia, depressão, autismo e esquizofrenia (Gotti *et al.*, 2006).

O nAChR é o único tipo de receptor para ACh presente na membrana pós-sináptica da JNM de mamíferos. Também apresentado sob a forma pentamérica, o nAChR muscular é formado por subunidades heteroméricas: $2\alpha 1$, $\beta 1$, δ e ou γ , ou ϵ , que juntas formam o canal iônico do receptor que é ativado pela ligação de ACh nas duas subunidades α . Ao longo do desenvolvimento a subunidade γ é substituída pela ϵ na transição entre uma forma de nAChR embrionária ou desnervada ($2\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ), para uma forma adulta ($2\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ), presente na fibra muscular inervada (Lee, 1998).

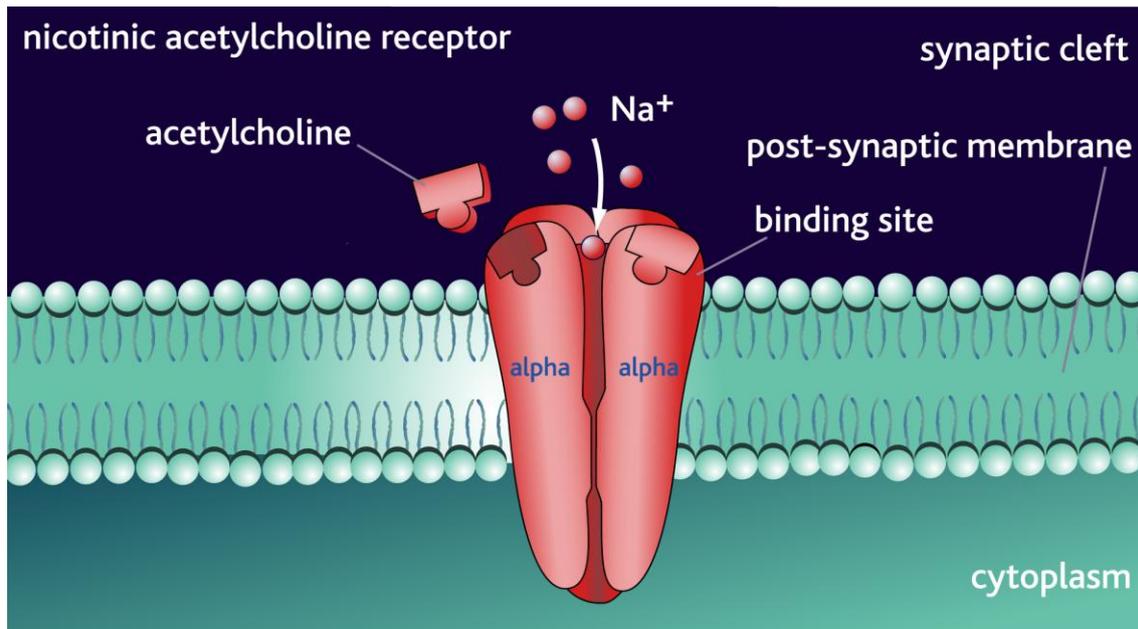


Figura 12. Desenho esquemático representando um receptor nicotínico para ACh. Uma das subunidades do receptor não está representada para que o canal interno pudesse ser visualizado. Este receptor ativa diretamente o canal iônico ao qual está acoplado. Fonte: <http://www.cnsforum.com>

A formação de aglomerados de receptores nicotínicos para ACh durante o desenvolvimento neuromuscular não requer o contato anatômico entre nervo e músculo, mas a presença do nervo é necessária (Dahm and Landmesser, 1991). Durante o desenvolvimento, as subunidades do nAChR são distribuídas difusamente sobre a superfície muscular, mas com o estabelecimento do contato nervo-músculo, os nAChR ancoram-se sob os terminais nervosos e rapidamente concentram-se nestes sítios mediante uma combinação de difusão lateral e, preferencialmente, síntese e inserção de subunidades sob a sinapse em formação (Lee, 1998; Sanes and Lichtman, 1999). O nervo promove a liberação de moléculas sinalizadoras que regulam a diferenciação pós-sináptica, dentre elas a proteína agrina tem papel de destaque (Pun *et al.*, 2002). A agrina ativa um receptor acoplado à tirosina quinase específica do músculo, chamado MuSK, que via a ativação de uma proteína periférica da membrana da célula muscular, chamada rapsina (proteína associada ao receptor da sinapse), promove o agrupamento e estabilização das subunidades dos receptores para ACh na membrana sarcolemal pós-sináptica (Gautam *et al.*, 1995; DeChiara *et al.*, 1996).

Na JNM madura a membrana plasmática da célula muscular, ou sarcolema, apresenta numerosas pregas ou dobras juncionais, nas quais existem duas regiões molecularmente distintas: 1) o ápice, onde os nAChRs estão agrupados em uma densidade de aproximadamente 10^4 unidades/ μm^2 juntamente com outras proteínas como a rapsina, utrofina, α -distrobrevina-1 e; 2) o fundo, que contém os canais para Na^+ responsáveis pela geração do potencial de ação no sarcolema, bem como outras proteínas: α -dystrobrevina-2, distrofina e moléculas de adesão neuronal (N-CAM) (Hall and Sanes, 1993; Sanes and Lichtman, 1999). (**Figura 13**).

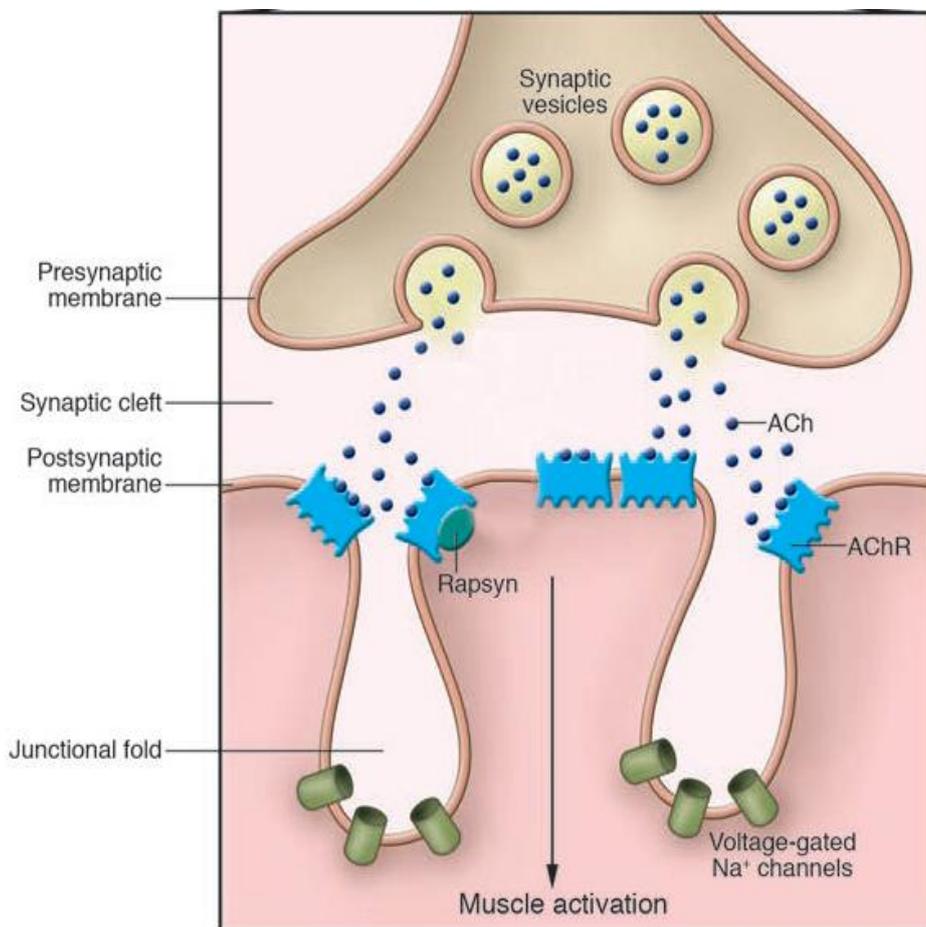


Figura 13. Desenho esquemático de um contato sináptico de JNM. No terminal pré-sináptico é possível observar a fusão de VSs, que estavam previamente ancoradas na membrana do terminal nervoso e a consequente liberação da ACh para a fenda sináptica. Na fenda, a ACh se difunde até os receptores nicotínicos, os quais estão concentrados nas cristas das dobras juncionais do sarcolema e são organizados pela proteína rapsina; enquanto os canais para sódio, sensíveis à voltagem, concentram-se no sulco das dobras. A ativação destes canais causará a despolarização da membrana muscular e ativará os mecanismos responsáveis por gerar a resposta pós-sináptica própria do miócito: a contração muscular. Adaptado a partir de Conti-Fine *et al.*, 2006.

A ativação dos nAChR musculares leva à despolarização da membrana plasmática muscular e culmina com a ativação dos mecanismos moleculares envolvidos com a contração muscular. Processos patológicos que acometem os nAChR têm consequências severas, porque comprometem a contração muscular e conseqüentemente podem causar a morte por falência da musculatura respiratória. Dentre as doenças que afetam os nAChR destacam-se os subtipos de síndrome miastênica congênita de acometimento pós-sináptico, que incluem: defeitos na cinética dos receptores, deficiência primária de receptores, deficiência de rapsina, alterações na MUSK, entre outros; além da forma auto-imune tradicionalmente conhecida da miastenia gravis. (Conti-Fine *et al.*, 2006; Palace and Beeson, 2008; Engel, 2012).

1.4. Aspecto morfológico da junção neuromuscular

A JNM de vertebrados é um dos modelos de sinapses mais estudados e melhor compreendidos devido ao seu grande tamanho, sua simplicidade estrutural e fácil acessibilidade (Kummer *et al.*, 2006). 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 contração (Katz, 1966). Particularmente, a JNM de mamíferos possui formato “arborizado” e, estruturalmente, apresenta três regiões bem distintas: 1) o terminal neuronal pré-sináptico, contendo VSs; 2) a membrana pós-sináptica da célula muscular, apresentando diversas dobras juncionais, nas cristas das quais se concentram aglomerados de receptores nicotínicos para acetilcolina e, entre estes dois elementos, 3) a fenda sináptica (**Figura 14**).

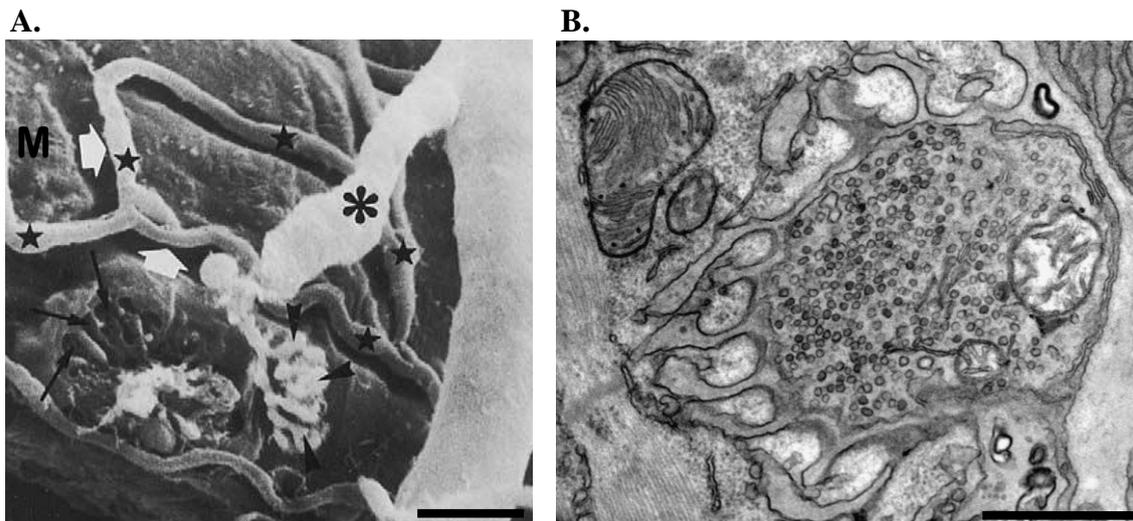


Figura 14: O aspecto morfológico da junção neuromuscular de camundongo adulto. **A** – Elétron-micrografia de varredura de junção neuromuscular de camundongo adulto. É possível observar um terminal axonal (cabeças de setas) disposto de forma circular sobre uma célula muscular estriada esquelética (M), que apresenta na membrana pós-sináptica diversas dobras juncionais, nas cristas das quais se concentram aglomerados de receptores para acetilcolina (setas pretas) (Barra de escala: 10 μ m) (Torrejais *et al.*, 2002). **B** – Elétron-micrografia de transmissão de junção neuromuscular de camundongo adulto na qual se observam os três componentes estruturais característicos: o componente pré-sináptico, que apresenta diversas vesículas sinápticas e algumas mitocôndrias; a célula muscular, pós-sináptica, que apresenta em sua membrana dobras juncionais e, uma estreita fenda sináptica separando os elementos pré e pós-sinápticos (Barra de escala: 1 μ m). (Hermann A. Rodrigues).

Na região pré-sináptica, o axônio motor próximo à fibra muscular, perde sua bainha de mielina e se ramifica de modo variável em botões sinápticos que se alojam em depressões localizadas na superfície da fibra (Hall and Sanes, 1993). Cada botão

sináptico é envolvido por processos das células de Schwann que o protege de lesões químicas e mecânicas, dentre outras funções. As VSs apresentam em média 50-60 nm de diâmetro, contém ACh, ATP e uma alta concentração de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (Sanes and Lichtman, 1999). O terminal nervoso pré-sináptico na JNM madura contém algumas mitocôndrias e muitas VSs, cerca de 400.000 para a JNM de vertebrado, as quais estão dispostas em um dos três grupos ou aglomerados vesiculares funcionalmente definidos, já apresentados no tópico introdução (Rizzoli and Betz, 2005; Alabi and Tsien, 2012). No plano ultraestrutural, é possível observar no interior dos terminais nervosos a presença de regiões elétron-densas específicas, denominadas zonas ativas, que marcam os sítios subcelulares da transmissão sináptica. Cada zona ativa pode ser identificada pela sua associação com aglomerados de VSs e por fazer aposição direta às invaginações da membrana muscular pós-sináptica. Composto o aparato pré-sináptico das zonas ativas estão presentes ainda diversas proteínas envolvidas em processos de ancoramento, amadurecimento, liberação e reciclagem de VSs, além de canais para cálcio sensíveis à voltagem, que se encontram bem próximos aos aglomerados vesiculares (Sugiura *et al.*, 1995; Teng *et al.*, 1999; Harlow *et al.*, 2001; Zhai and Bellen, 2004). Esta disposição garante um rápido pico na concentração intracelular de cálcio nos sítios de exocitose durante o disparo da liberação vesicular, conferindo sincronia ao processo (Robitaille *et al.*, 1990). Além de VSs e mitocôndrias, também é possível observar no interior dos terminais pré-sinápticos a presença de neurofilamentos, filamentos de actina, microtúbulos, retículo endoplasmático liso, endossomos, grânulos de glicogênio e estruturas lisossomais (Engel, 2008).

A região pós-sináptica é composta pelo sarcolema imediatamente justaposto ao terminal nervoso e pelo sarcoplasma juncional. O sarcolema pós-sináptico apresenta diversas dobras juncionais, que aumentam a superfície pós-sináptica e, portanto a eficácia da transmissão sináptica, ao longo das quais se distribuem os receptores nicotínicos para a ACh. Estes receptores não estão uniformemente distribuídos ao longo da região pós-sináptica, mas sim formando agrupamentos nas cristas das dobras da membrana pós-sináptica, atingindo nesses locais densidades que podem chegar a mais de 10.000 por μm^2 , sendo que nos sulcos das dobras sarcolemas essa concentração se reduz mais que 90% e, no sarcolema extra-sináptico existem menos que 10 receptores por μm^2 . Esse arranjo permite aos receptores detectar de forma rápida e eficiente a ACh liberada durante a exocitose das VSs (Hall and Sanes, 1993). O sarcoplasma juncional é caracterizado pela presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso,

complexo de Golgi, estruturas lisossomais, microtúbulos, grânulos de glicogênio e pela presença de núcleos celulares localizados na região sináptica, chamados núcleos sinápticos, que são morfologicamente diferentes dos não sinápticos (localizados em outras regiões da celular muscular), pois são maiores e seus genes transcrevem proteínas encontradas apenas na membrana sarcoplasmática sináptica, sendo responsáveis pela transcrição do RNAm das subunidades dos nAChRs (Engel, 2003; Hall and Sanes, 1993).

A fenda sináptica consiste num espaço de aproximadamente 50 nm entre os elementos pré e pós-sinápticos e é preenchida com matriz extracelular formando a lâmina basal sináptica, a qual se estende para os sulcos das dobras sarcolemas pós-sinápticas. A fenda sináptica se divide em duas regiões: 1) uma primária, limitada de um lado pelo terminal nervoso e de outro, pela fibra muscular; e 2) uma secundária, delimitada entre as dobras juncionais da membrana muscular pós-sináptica. Ambas são ocupadas pela lâmina basal sináptica, a qual é contínua com aquela que envolve a célula muscular e funde-se com a da célula de Schwann. Embora a lâmina basal sináptica seja morfologicamente indistinguível da extra-sináptica, ela é bioquimicamente especializada, pois contém componentes responsáveis por conferir forte adesão entre terminal nervoso e músculo; fatores que mediam interações durante o desenvolvimento da JNM; além da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual inativa a ACh (revisado por Hall, 1992; Hall and Sanes, 1993; Sanes, 1995; Sanes and Lichtman, 1999). A lâmina basal sináptica contém proteínas específicas, tais como: agrina, laminina-4, laminina-9, laminina-11, colágeno IV, colágeno III, proteoglicanos, heparan-sulfato e N-CAM. Todas essas proteínas e outras não listadas aqui tornam a lâmina basal sináptica especializada e importante para o desenvolvimento e função da JNM, além de serem responsáveis pela estabilidade e agregação dos receptores nicotínicos de acetilcolina no sarcolema da fibra muscular. (Engel, 2003). (**Figura 15**).

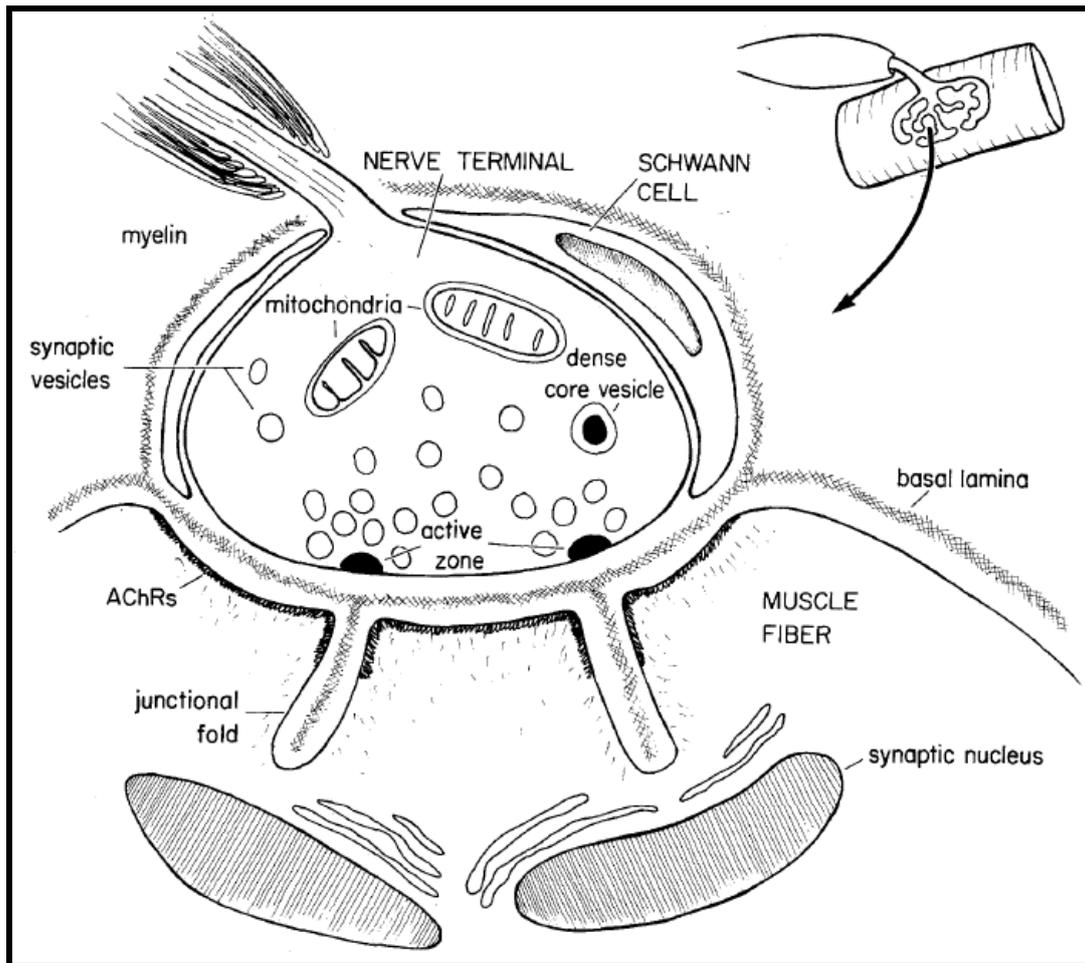


Figura 15. Desenho esquemático da JNM madura. O terminal nervoso perde a bainha de mielina formando o botão sináptico na superfície da fibra muscular. Especializações dos três tipos celulares constituem a sinapse: o terminal nervoso do motoneurônio, o sarcolema da célula muscular e processos de células de Schwann. Hall and Sanes (1993).

O estabelecimento da JNM é de importância fundamental, uma vez que implica na sobrevivência do animal após seu nascimento. Durante o desenvolvimento pós-natal são observadas importantes alterações das características estruturais e funcionais dos terminais pré e pós-sinápticos da JNM (Kelly and Zacks, 1969; Bennett and Pettigrew, 1974; Witzemann, 2006). Os terminais nervosos em sinapses recém-formadas contêm poucas VSs e as zonas ativas não são facilmente reconhecíveis no plano ultraestrutural. Subsequentemente, as VSs aumentam em número, as zonas ativas tornam-se mais visíveis, as vesículas agrupam-se nas zonas ativas e o terminal nervoso torna-se polarizado (Kelly and Zacks, 1969; Sanes and Lichtman, 1999). A JNM madura é caracterizada pela co-localização espacial de VSs e aglomerados de receptores para ACh (Dahm and Landmesser, 1991).

Para avaliar a participação e a importância funcional do VACHT na neurotransmissão colinérgica, um grupo de pesquisadores coordenados pelo Prof. Marco Antônio Prado, ex-professor do Departamento de Farmacologia da UFMG, gerou, por recombinação homóloga, uma linhagem de camundongos que apresenta expressão reduzida (*knockdown*) do gene do VACHT. Análises por *westernblot* revelaram uma redução de 45% na expressão do VACHT em camundongos heterozigotos (VACHT KD^{HET}), enquanto nos homozigotos (VACHT KD^{HOM}) a redução foi de 65% (Prado *et al.*, 2006). A menor expressão do VACHT não determinou a inviabilidade dos animais geneticamente modificados, de modo que mesmo as linhagens homozigotas apresentaram longevidade aparentemente normal, permitindo que os camundongos atingissem a idade adulta e possibilitando inclusive a realização de análise comportamental desses animais. Portanto, a viabilidade dos camundongos VACHT KD^{HOM} é um importante aspecto desse modelo experimental.

Análises eletrofisiológicas realizadas em placas motoras do músculo diafragma mostraram que os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentaram uma redução no conteúdo quântico de ACh quando comparados aos selvagens (VACHT WT [*wild-type*]). Além disso, a frequência de potenciais pós-sinápticos em miniatura (MEPPs) sofria uma redução significativa nos animais VACHT KD^{HOM} quando comparados aos WT. Os resultados obtidos com os animais VACHT KD^{HET} eram intermediários entre os dados obtidos com os VACHT KD^{HOM} e os VACHT WT (Prado *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010). Em virtude das alterações observadas na transmissão neuromuscular, testes de avaliação da força muscular foram realizados. Os animais VACHT KD^{HET} apresentavam desempenho semelhante aos WT. Contudo, os VACHT KD^{HOM} apresentavam importante déficit de força muscular, reversível à aplicação de piridostigmina, um inibidor da AChE periférica, uma vez que esse fármaco não atravessa a barreira hematoencefálica. Aliando-se às alterações eletrofisiológicas e de força muscular, os VACHT KD^{HOM} também apresentavam déficits na liberação de ACh no cérebro e obtinham piores resultados em testes de aprendizado e desempenho motor que exigiam atividade física sustentada. Portanto, estes animais apresentavam um quadro de síndrome miastênica (Prado *et al.*, 2006).

Processos patológicos que afetam a JNM são relativamente comuns. Dentre uma grande variedade de desordens, a mais comum consiste na miastenia gravis autoimune, a qual é uma doença adquirida. Um grupo menos comum, mas importante e de características hereditárias, consiste nas desordens congênitas da JNM, conhecidas

como Síndromes Miastênicas Congênitas (SMC). Estas desordens são causadas por defeitos em componentes específicos da JNM e são caracterizadas pelo comprometimento na transmissão neuromuscular (Engel *et al.*, 2003; Nogajski *et al.*, 2008). As SMC podem ser classificadas de acordo com: 1) as características de herança genética; 2) a proteína de placa motora que está alterada; ou 3) o local do defeito (componente pré-sináptico, lamina basal sináptica (fenda sináptica) ou componente pós-sináptico) (Engel, 2012). De particular interesse para nós são as alterações pré-sinápticas que culminam com o quadro de SMC. Até o momento, foram descritos quatro tipos pré-sinápticos de SMC humana, a saber: deficiência de ChAT; escassez de VSs com redução da liberação quântica de ACh; síndrome congênita semelhante à doença de Lambert-Eaton, está última caracterizada por autodestruição imunológica dos canais para cálcio sensíveis à voltagem presentes nas zonas ativas pré-sinápticas e; um tipo de SMC com liberação quantal de ACh reduzida devido a um mecanismo ainda não definido (Bady *et al.*, 1987; Engel *et al.*, 2002; Engel, 2012). Interessantemente, esses quatro subtipos de SMC compartilham uma característica em comum, todos levam a um comprometimento na liberação de ACh na JNM.

A ACh é um neurotransmissor extremamente importante no desenvolvimento e funcionamento do SNC e periférico. Alterações na neurotransmissão colinérgica estão associadas com uma variedade de desordens neurológicas tais como a doença de Alzheimer, esquizofrenia, doença de Parkinson, epilepsia, déficit de atenção e hiperatividade e alguns tipos de SMC (Bartus *et al.*, 1982; Coyle *et al.*, 1983; Bady *et al.*, 1987; Maselli *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2002; Misgeld *et al.*, 2002; Brandon *et al.*, 2003; Mesulam, 2004; Engel, 2012). Os efeitos da ACh na sinalização neural e comportamento dependem da quantidade de neurotransmissor liberado (Prado *et al.*, 2006; de Castro *et al.*, 2009 b; Schmid *et al.*, 2011; Guidine *et al.*, 2008; Capettini *et al.*, 2011). A ACh desempenha um papel importante durante o desenvolvimento do sistema nervoso (Misgeld *et al.*, 2002; Brandon *et al.*, 2003; de Castro *et al.*, 2009 a) e, a liberação deste neurotransmissor depende de sua internalização em VSs (Katz, 1971; Parsons, 2000). Assim, a expressão do VACHT e o preenchimento de VSs com ACh podem representar um ponto-chave na regulação da transmissão colinérgica e podem determinar importantes alterações morfológicas e funcionais na JNM.

De fato, camundongos *Knockout* (VACHT^{del/del}) para o gene do VACHT, gerados também pela equipe do professor Marco Antônio Prado, exibem uma série de alterações interessantes. Estudos eletrofisiológicos em preparações musculares de

diafragma destes animais mostraram, surpreendentemente, que os camundongos VACHT^{del/del} apresentavam eventos espontâneos (MEPPs) com amplitude e frequência reduzidas (de Castro *et al.*, 2009). Além disso, os camundongos VACHT^{del/del} apresentavam níveis elevados de RNAm para as proteínas ChAT e para o CHT1, acompanhados de aumento na expressão destas próprias proteínas. Adicionalmente, os animais VACHT^{del/del} ainda exibiam um aumento no conteúdo citoplasmático de ACh, aumento da ramificação nervosa sobre o diafragma e distribuição desorganizada dos agrupamentos de receptores nicotínicos para a ACh em preparações de JNM de diafragma (de Castro *et al.*, 2009). No entanto, estes animais morrem logo após o nascimento, indicando que a liberação de ACh armazenada em VVs pelo VACHT é essencial à sobrevivência e tornando este modelo excelente para estudos sobre as consequências do déficit colinérgico causado pela abolição da expressão do VACHT durante o desenvolvimento pré-natal da JNM, mas inviabilizando-o para estudos durante o qualquer idade do desenvolvimento pós-natal.

Diante das observações descritas anteriormente, tornou-se de grande relevância investigar quais seriam as implicações da expressão reduzida do gene do VACHT e consequente redução do conteúdo quântico de ACh sobre a forma e função da JNM madura, levando-se em consideração a possibilidade de importantes modificações compensatórias nos componentes pré e pós-sinápticos do desenvolvimento animal. Para tanto, nós realizamos um estudo morfofuncional de JNM neuromusculares de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM}, tendo em vista a longevidade normal deste modelo animal.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as alterações morfofuncionais dos elementos pré e pós-sinápticos de JNM de diafragma de camundongos adultos com disfunção colinérgica decorrente da expressão reduzida do gene do transportador vesicular de ACh (VChT).

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar, no plano ultraestrutural, análise qualitativa e quantitativa das possíveis alterações morfológicas dos elementos pré e pós-sinápticos de JNM de diafragma em camundongos VChT WT e VChT KD^{HOM} na idade adulta;

- Realizar, no plano ultraestrutural, análise qualitativa e quantitativa da exo/endocitose de VSs em terminais motores pré-sinápticos em repouso em camundongos VChT WT e VChT KD^{HOM} na idade adulta;

- Realizar, no plano ultraestrutural, análise quantitativa da exo/endocitose de VSs em terminais motores pré-sinápticos sob diferentes estímulos em camundongos VChT WT e VChT KD^{HOM} na idade adulta;

- Realizar, no plano ultraestrutural, análise quantitativa da distribuição de VSs em terminais motores pré-sinápticos em repouso e sob diferentes estímulos em camundongos VChT WT e VChT KD^{HOM} na idade adulta;

- Realizar, no plano ultraestrutural, análise qualitativa e quantitativa do aspecto morfológico das VSs em terminais motores pré-sinápticos em repouso e sob estímulo em camundongos VChT WT e VChT KD^{HOM} na idade adulta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Para a realização deste estudo nós utilizamos linhagens de camundongos C57BL/6J selvagens (VChT WT) e com expressão reduzida (*knockdown* homozigotos) do VChT (VChT KD^{HOM}) na idade adulta (3 meses), geradas pela equipe do professor Marco Antônio Prado, utilizando técnicas de recombinação homóloga baseadas no sistema Cre-LoxP (Prado *et al.*, 2006). Essas linhagens de camundongos transgênicos encontram-se no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG e estão sob a responsabilidade da Profa. Silvia Guatimosim Fonseca, colaboradora deste projeto.

3.2. Registros eletrofisiológicos de MEPPs

Para avaliarmos os efeitos da solução hipertônica de sacarose (500 mM) sobre a liberação espontânea de ACh nós realizamos experimentos de eletrofisiologia para registrar os MEPPs em preparações musculares de camundongos VChT WT e VChT KD^{HOM} na idade adulta. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (22-24°C), utilizando o músculo diafragma alocado em uma placa acrílica contendo o fundo coberto por gel de silicone Sylgard[®], fixado com alfinetes entomológicos e banhado em solução Ringer normal e aerada com uma mistura de 5% CO₂/ 95% O₂. Os músculos foram incubados na presença μ -Conotoxina GIIIB (0.37 μ M), um bloqueador seletivo de canais para sódio voltagem dependentes, presentes na membrana muscular, que foi adicionada à solução de banho para evitar potenciais de ação e contração muscular. Os registros dos MEPPs foram realizados durante 10 minutos na presença da solução Ringer normal contendo μ -Conotoxina. Após este tempo a solução de Ringer normal foi substituída por uma solução Ringer contendo alta concentração de sacarose (500 mM) e μ -conotoxina, através de um sistema de perfusão e os MEPPs foram registrados continuamente durante mais 10 minutos. Para medir os potenciais de placa motora um microeletrodo acoplado a uma sonda ligada a um amplificador foi inserido em uma fibra muscular nas proximidades da JNM. A localização do empalamento (inserção do microeletrodo na fibra muscular) com relação à placa motora foi avaliada de acordo com o formato dos MEPPs, os quais devem apresentar tempo para atingir o pico menor

que 1 milissegundo. Deste modo, o registro foi realizado o mais próximo possível da JNM, com o mínimo de perda eletrotônica e com uma proporção sinal / ruído adequada, permitindo a visualização clara e total do potencial registrado. O potencial de placa motora, que reflete a liberação de ACh, foi avaliado pela técnica de micropunção, na qual são medidas as variações de voltagens intracelulares. Os microeletrodos utilizados foram fabricados com capilares de borosilicato e apresentavam resistências entre 8 e 15 megaohm (MΩ) quando preenchidos com solução de KCl (3M). Os registros foram avaliados pela diferença do eletrodo de referência (denominado zero ou aterramento) em relação ao eletrodo de registro. O sinal era enviado ao amplificador I (Axopatch-200 – Molecular Devices), os registros eram filtrados a 5 KHz (passa-baixa) e amplificados 50x antes de serem digitalizados. Os sinais digitalizados foram registrados pelo programa WinEDR (John Dempster, University of Strathclyde). Nós avaliamos a amplitude e a frequência dos MEPPs na mesma fibra muscular. Um potencial de repouso de -70 mV foi padronizado para a análise da amplitude. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média e a análise estatística foi realizada pela aplicação do teste *t-Student* não pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.3. Marcação com FM1-43 fx e α -bungarotoxina

O músculo diafragma associado ao fragmento de nervo frênico foi dissecado dos camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, seccionado em dois hemidiafragmas e os conjuntos músculo-nervo resultantes foram montados em placas contendo o fundo coberto por gel de silicone Sylgard[®], fixados com alfinetes entomológicos e banhados em solução Ringer contendo 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4, e aerada com uma mistura de 5% CO₂/ 95% O₂.

As preparações foram então marcadas com α -bungarotoxina – Alexa Fluor 594 na concentração de 12 μ M (Betz *et al.*, 1992; Marques *et al.*, 2000), para visualização de aglomerados de receptores nicotínicos para ACh na membrana pós-sináptica e, também, com o marcador fluorescente FM1-43 fx (análogo fixável do FM1-43) na concentração de 4 μ M, para visualização dos terminais pré-sinápticos através da marcação das VSs em reciclagem.

A utilidade dos marcadores FM deve-se às características estruturais fundamentais da molécula. Primeiro, a região da cauda é lipofílica e faz com que o marcador ligue-se a lipídios e outros domínios hidrofóbicos. Segundo, a região central contém dois anéis aromáticos que criam o fluoróforo. O número de ligações duplas contidas entre os dois anéis determina o espectro de fluorescência do marcador. Terceiro, o grupamento da cabeça, positivamente carregado, evita que o marcador atravesse completamente a membrana (**Figura 17A**). Finalmente, os marcadores FM tornam-se 300 vezes mais fluorescentes quando ligados à bicamada lipídica se compararmos quando ele se encontra em solução e é essa característica que nos permite visualizar endocitose (ganho de fluorescência) e exocitose (perda de fluorescência) em preparações extra-vivo. (Brumback *et al.*, 2004; Gaffield and Betz, 2006).

De uma maneira sucinta, após a obtenção de uma preparação neuromuscular devidamente alocada em solução contendo marcador, aplica-se um estímulo que evoca a exocitose das vesículas sinápticas. Estas então liberam seu conteúdo no meio extracelular e ocorre a exposição da face luminal da membrana para o meio durante a exocitose. O corante então se liga ao folheto interno da membrana das vesículas e é internalizado durante endocitose compensatória (**Figura 17B**). Em seguida, o meio externo é lavado retirando-se o excesso de marcador que não foi endocitado e permaneceu ligado externamente à membrana do terminal axonal (**Figura 17C**). Posteriormente, a preparação é examinada por microscopia de fluorescência permitindo a visualização das estruturas endocitadas marcadas, sob a forma de aglomerados vesiculares (**Figura 18A**) (Gaffield and Betz, 2006).

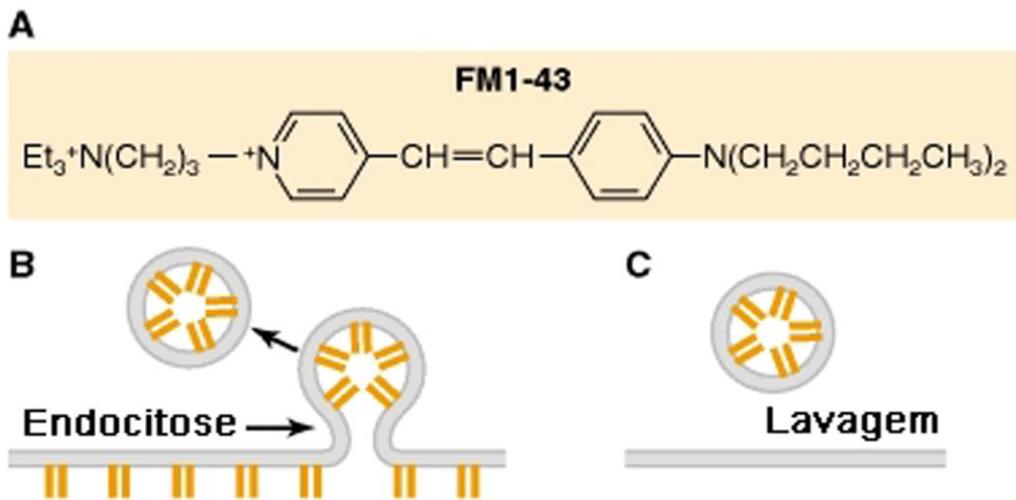


Figura 17: O marcador fluorescente FM1-43 é utilizado para monitoramento dos passos de endocitose e exocitose de vesículas sinápticas em terminais nervosos. (A) Estrutura molecular da sonda fluorescente FM1-43. (B) Marcação da membrana do terminal pré-sináptico com o FM1-43 adicionado à solução salina. O neurônio foi estimulado na presença de FM1-43. Notar que a membrana que originou uma nova vesícula sináptica está marcada com a sonda. (C) Uma breve lavagem remove as moléculas de FM que não foram internalizadas. (Adaptado a partir de *Basic Neurochemistry, seventh edition. Edited by Siegel et. al., 2006*).

Em nosso estudo, para realizar a marcação com FM1-43 fx foi empregado o estímulo com solução hipertônica de sacarose (500 mM) durante 10 minutos, o qual recruta o aglomerado de VSs do RRP. Após a estimulação a preparação foi mantida em repouso por 10 minutos para garantir a captação máxima de FM1-43 fx durante endocitose compensatória. O excesso de FM1-43 fx aderido à membrana do terminal sináptico e à membrana da célula muscular foi removido durante um período de lavagem da preparação em Ringer contendo Advasep-7 (1 mM, um composto utilizado para remover background indesejado) e isento de marcador por no mínimo 30 minutos. As preparações foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1 M por no mínimo 60 minutos. Após a fixação os músculos foram lavados com glicina em tampão fosfato (0.1 M) para redução do sinal fluorescente do fixador. Finalmente, os músculos foram seccionados em dois hemidiafragmas e montados em lâmina de vidro usando o meio de montagem ProLong® Gold (Invitrogen, SP, Brasil) (**Figura 18**).

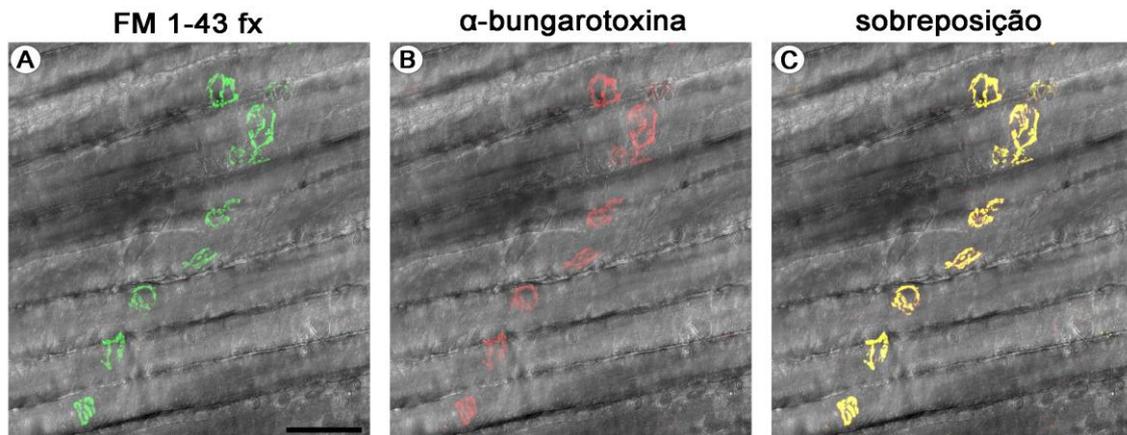


Figura 18: A junção neuromuscular de diafragma de camundongo adulto à microscopia de fluorescência confocal. **A** - Terminais pré-sinápticos marcados com FM 1-43 fixável (verde). **B** - Aglomerados de receptores nicotínicos para acetilcolina (vermelho), localizados nas dobras da membrana muscular pós-sináptica. **C** - Sobreposição das imagens **A** e **B**, mostrando a perfeita colocalização dos elementos sinápticos da junção neuromuscular de diafragma de um camundongo adulto. Os componentes sinápticos apresentam padrão de alinhamento linear ao longo do tecido muscular (cinza). Cada fibra muscular é inervada por apenas um terminal motor. (Barra de escala = 50 μ m). Imagens obtidas através de microscópio confocal (Leica SP5[®]). (Hermann A. Rodrigues).

3.4. Obtenção e análise de imagens através de microscopia confocal

As imagens de JNMs marcadas com FM1-43 fx e α -bungarotoxina foram adquiridas através de um microscópio confocal de escaneamento a laser (Zeiss META 510), localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG. Utilizamos a objetiva de imersão em óleo de 40x (abertura numérica 1.30). A luz de excitação partia de um laser de argônio (488 nm) e de hélio-neônio (543 nm). O espectro de emissão foi fixado em 510-580 nm para FM 1-43 fx e 610-680 para α -bungarotoxina. Secções ópticas na modalidade de série Z foram coletadas em intervalos de 2,0 μ m. Durante a aquisição das imagens, os hemidiafragmas foram inteiramente digitalizados e as imagens foram obtidas a partir de áreas do músculo que apresentaram JNMs marcadas. As análises quantitativas dos elementos pré e pós-sinápticos foram realizadas com o software Image J. Para análise da intensidade de fluorescência, as imagens foram convertidas para o formato da escala de cinza de 8 bits e cada elemento marcado foi avaliado individualmente, sendo que a fluorescência média dos elementos sinápticos de cada animal foi considerada para a comparação entre os genótipos. Os gráficos foram elaborados utilizando o software Prisma 4.0 e os dados foram analisados pelo teste *t-Student* não pareado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para os experimentos de caracterização das JNMs de diafragma os camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM} adultos foram submetidos à perfusão cardíaca com uma solução de tampão de cacodilato de sódio 0.1M, contendo paraformaldeído 4,0% e glutaraldeído 2,5% (pH 7.4) (solução fixadora de Karnovsky modificada). Para os experimentos nos quais avaliamos a reciclagem dos aglomerados de VSs de reciclagem total (*Total Recycling Pool - TRP*) foi realizada a aplicação de estímulo elétrico despolarizante (20 Hz) disparado no nervo frênico através de um eletrodo de sucção durante 5 minutos e os músculos foram imediatamente fixados por imersão em solução fixadora de Karnovsky modificada. Para o monitoramento da reciclagem das VSs do aglomerado de liberação rápida (*Readily Releasable Pool – RRP*) nós utilizamos como estímulo a aplicação de solução hipertônica de sacarose (500 mM) (Rosenmund and Stevens, 1996) durante 10 minutos, seguidos por mais 10 minutos de repouso em solução Ringer normal, mimetizando o protocolo descrito acima para os experimentos de microscopia confocal. Logo após o tempo de repouso os músculos foram fixados por imersão em solução fixadora de Karnovsky modificada. Para os experimentos nos quais avaliamos os efeitos da redução do preenchimento das VSs sobre o aspecto morfológico das mesmas, nós incubamos as preparações neuromusculares com (\pm)-vesamicol (4 μ M), um inibidor específico do VACHT, durante aplicação de estímulo elétrico (Whitton *et al.*, 1986) e após o estímulo as preparações foram imediatamente fixadas para microscopia eletrônica de transmissão. Após a realização de todos os protocolos experimentais citados anteriormente, o músculo diafragma, depois de submetido a um dos respectivos tratamentos, permaneceu em fixação por imersão na solução fixadora de Karnovsky modificada por no mínimo 12 horas a 4° C. Após fixados, os músculos foram recortados em fragmentos de cerca de 3 mm de comprimento próximos à ramificação principal do nervo frênico (**Figura 19**).

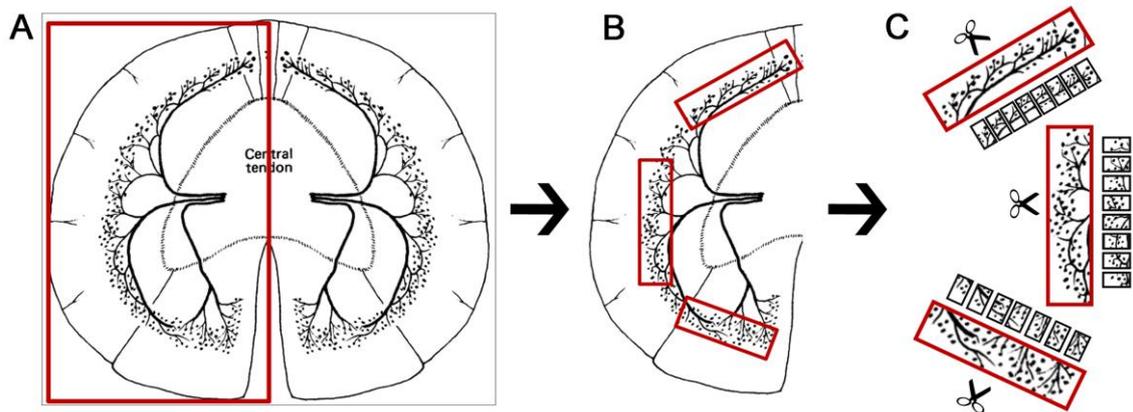


Figura 19: Esquema ilustrativo do modo de obtenção dos fragmentos de músculo diafragma fixado, para processamento para microscopia eletrônica de transmissão. **A** – Desenho esquemático do músculo diafragma, evidenciando a inervação bilateral pelo nervo frênico. O músculo é dividido em dois hemidiafragmas. A área delimitada em vermelho representa um hemidiafragma com sua inervação. **B** - O hemidiafragma destacado em **A** é recortado nas áreas próximas ao tronco principal do nervo frênico, como destacado pelos retângulos vermelhos, pois estas áreas são ricas em JNMs. **C** - As áreas ricas em JNMs extraídas do hemidiafragma em **B** são recortadas em fragmentos retangulares de cerca de 3 mm de comprimento. Estes pequenos fragmentos são então destinados ao protocolo descrito acima para MET, a partir da osmicação. (Desenho adaptado a partir de Comerford and Fitzgerald, 1986).

Em seguida, os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato 0.1M (pH 7.4) por 90 minutos a 4 °C. Ferrocianeto de potássio foi adicionado a esta solução na concentração 1,6% (solução de tetróxido de ósmio reduzido) para evidenciar membranas celulares. Os tecidos foram lavados em solução de tampão cacodilato 0.1M em três banhos de 10 minutos à temperatura ambiente. Os músculos foram contrastados “em bloco” por imersão em acetato de uranila 2% *overnight* à 4° C. Em seguida, os músculos foram lavados com água deionizada por 10 minutos em temperatura ambiente e desidratados em uma série ascendente de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%) e acetona absoluta à temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada uma pré-infiltração em resina epon diluída em acetona, nas respectivas proporções: 1:2, 1:1 e 2:1, na ausência do polimerizador. Por fim, os fragmentos foram infiltrados e incluídos em resina epon, contendo o polimerizador DMP-30, por no mínimo 2 horas à temperatura ambiente, 1 hora em estufa de 40° C e 48 horas em estufa de 60° C. Após a polimerização dos blocos de resina contendo os fragmentos do tecido foi realizada a ultramicrotomia com navalha de vidro (cortes semifinos de 300 nm) para seleção das áreas de interesse, as quais apresentavam grande potencial para conter junções neuromusculares (**Figura 20A**). Em seguida, foi realizada a ultramicrotomia com navalha de diamante (cortes ultrafinos de 50 nm) apenas da região selecionada. Os cortes foram montados em grades de cobre de 200 ou 300 *mesh* e para a coleta das

secções seriadas foram utilizadas telas de cobre sem grades, porém cobertas por películas de formvar. Por fim, as telas coletadas contendo secções de 50 nm foram contrastadas com citrato de chumbo (solução de Reynolds) para posterior visualização (Figura 20B).

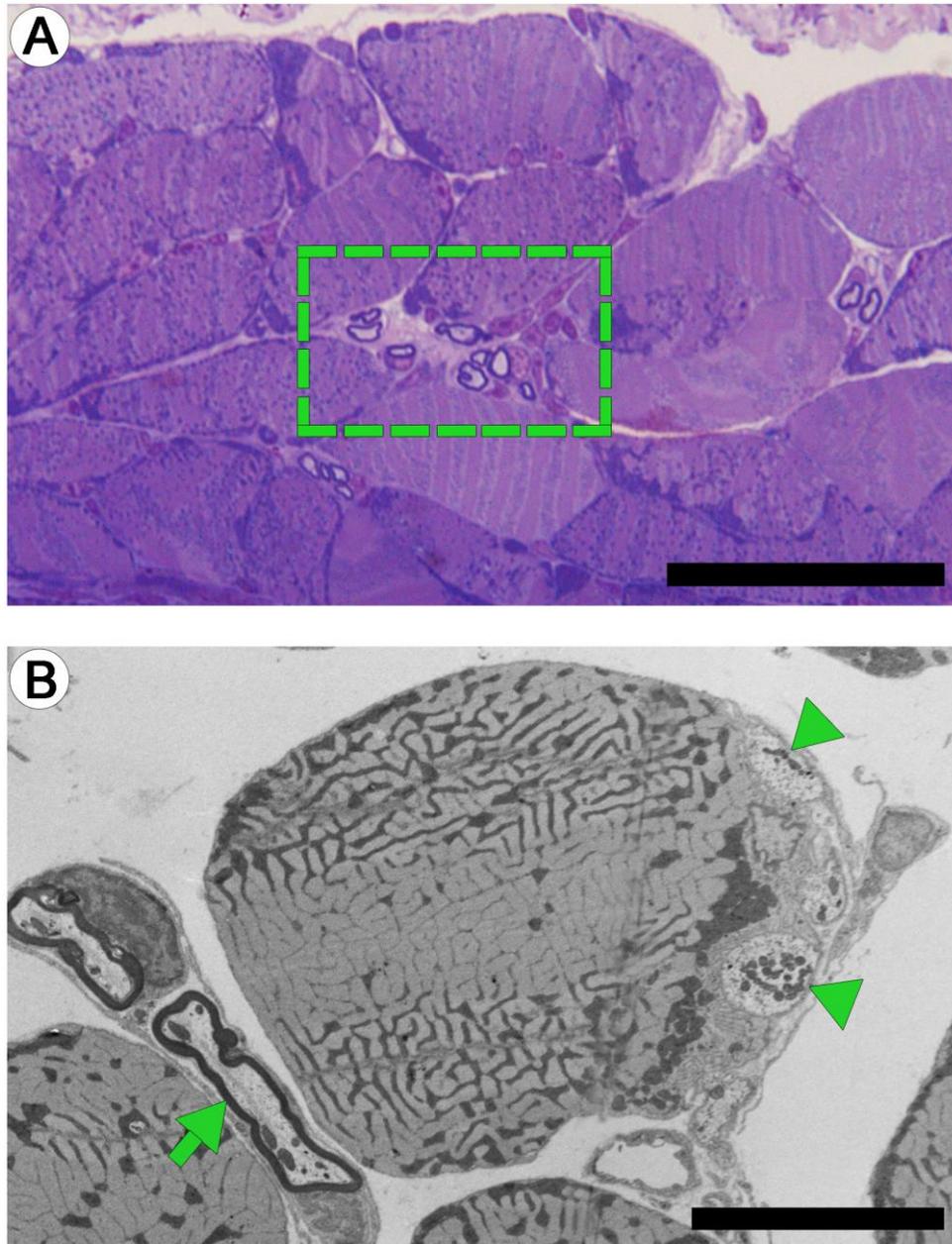


Figura 20 – Localização de áreas no músculo diafragma com grande potencial para conter junções neuromusculares. **A** – Imagem representativa de um corte semifino de músculo diafragma mostrando áreas ricas em fibras nervosas derivadas do nervo frênico, como a delimitada pelo retângulo verde, localizadas entre as fibras musculares. Barra de escala = 50 μ m. Coloração: azul de toluidina. Durante o desenvolvimento deste trabalho, nós observamos que estas são as melhores áreas para encontrar junções neuromusculares. **B** – Elétron-micrografia representativa da região delimitada pelo retângulo verde em **A**. Aqui nós observamos o perfil completo de uma fibra muscular estriada esquelética no centro da imagem, em corte transversal, contendo dois perfis de junções neuromusculares (cabeças de setas verdes apontando dois terminais pré-sinápticos de neurônios motores inervando a fibra muscular). No lado inferior esquerdo notamos a presença de duas fibras nervosas mielinizadas (seta verde). Barra de escala = 10 μ m. Aumento 2.000 x. (Hermann A. Rodrigues).

3.6. Obtenção e análise das elétrôn-micrografias de transmissão

A obtenção das elétrôn-micrografias digitais dos cortes ultrafinos foi realizada através do microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta, com voltagem de aceleração de 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG ou do microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 10, com voltagem de aceleração de 80 kV localizado no CAPI do ICB-UFMG.

A análise das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e a mensuração dos perfis de terminais nervosos (área de secção transversa), comprimento dos perfis de membrana muscular pós-sináptica, assim como a quantificação, distribuição e mensuração das VSs, foram realizadas utilizando-se os programas Image J, Image Pro Plus[®] 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) e Microsoft Excel. A densidade total de VSs foi calculada pela relação do número de vesículas pela área de secção transversa dos perfis de terminais e a densidade de vesículas ancoradas nos perfis de zonas ativas foi determinada pelo número de vesículas localizadas dentro de uma área circunscrita, com raio de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 nm, tendo como centro a região de zona ativa pré-sináptica (Becherer *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2011). Para o cálculo de circunferência de VSs foi utilizada a seguinte fórmula descrita por Van der Kloot e colaboradores (2002): $\text{circunferência} = 2\pi [(d_1^2 + d_2^2)/2]^{0.5}$, na qual d_1 corresponde ao maior diâmetro da vesícula e d_2 corresponde ao maior diâmetro em ângulo reto com d_1 . Para o cálculo de formato das vesículas foi utilizada a seguinte fórmula descrita por Croft e colaboradores (2005): $\text{formato} = (4 \times \pi \times \text{área}) / (\text{perímetro})^2$, considerando o valor de um círculo perfeito próximo de 1.0. (**Figura 21**). Os valores obtidos foram convertidos em representações gráficas através do programa GraphPad Prism 4.0. A análise estatística foi realizada pela aplicação do teste *t-Student* não pareado ou ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

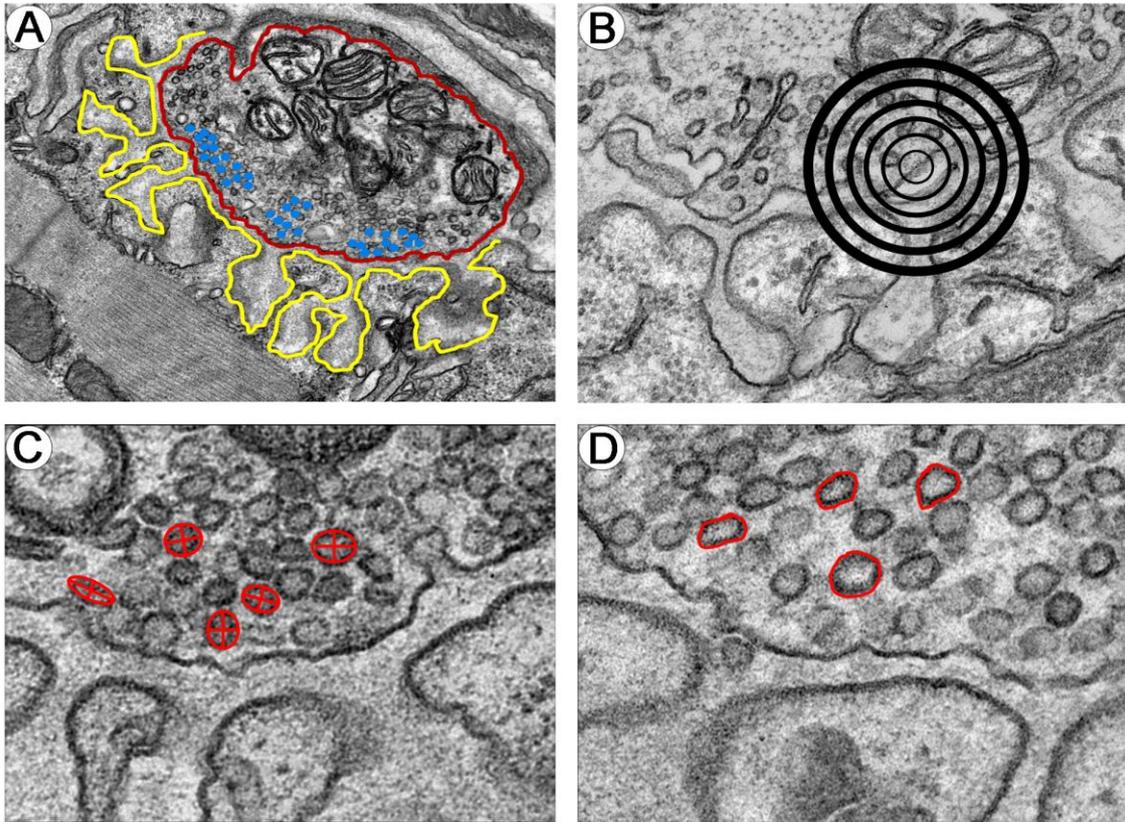


Figura 21 – Esquemas ilustrativos das formas de análise das elétrôn-micrografias dos elementos sinápticos das junções neuromusculares. **A** – Representações esquemáticas das formas de análises dos perfis de terminais nervosos (contorno vermelho), dos perfis de dobras juncionais pós-sinápticas (contorno amarelo) e contagem do número de vesículas sinápticas (algumas foram marcadas em azul para demonstração). **B** – Representação esquemática da quantificação do número de vesículas localizadas próximas às zonas ativas pré-sinápticas. Círculos com raios de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 nm, tendo como centro a região de zona ativa eram desenhados sobre os perfis de terminais nervosos e as vesículas contidas em cada uma dessas demarcações eram contadas. **C** – Representação da forma de mensuração da circunferência das vesículas sinápticas. Nós desenhávamos dois traços sobre as vesículas, incluindo sua membrana plasmática; um correspondente ao maior diâmetro da vesícula (d_1) e outro corresponde ao diâmetro em ângulo reto com d_1 . A aplicação da fórmula descrita por Van der Kloot *et al.* (2002) nos fornecia o valor da circunferência (representada pelo contorno vermelho sobre as vesículas). **D** – Representação da forma de análise do formato das vesículas sinápticas. Nós contornávamos cada vesícula e obtínhamos os valores de área e perímetro, que eram então aplicados à fórmula descrita por Croft *et al.* (2005), a qual nos fornecia valores entre 0 e 1, sendo que valores mais próximos de 1 representavam vesículas mais arredondadas. Todas as elétrôn-micrografias utilizadas nestes esquemas representativos foram obtidas pelo autor durante o desenvolvimento deste trabalho.

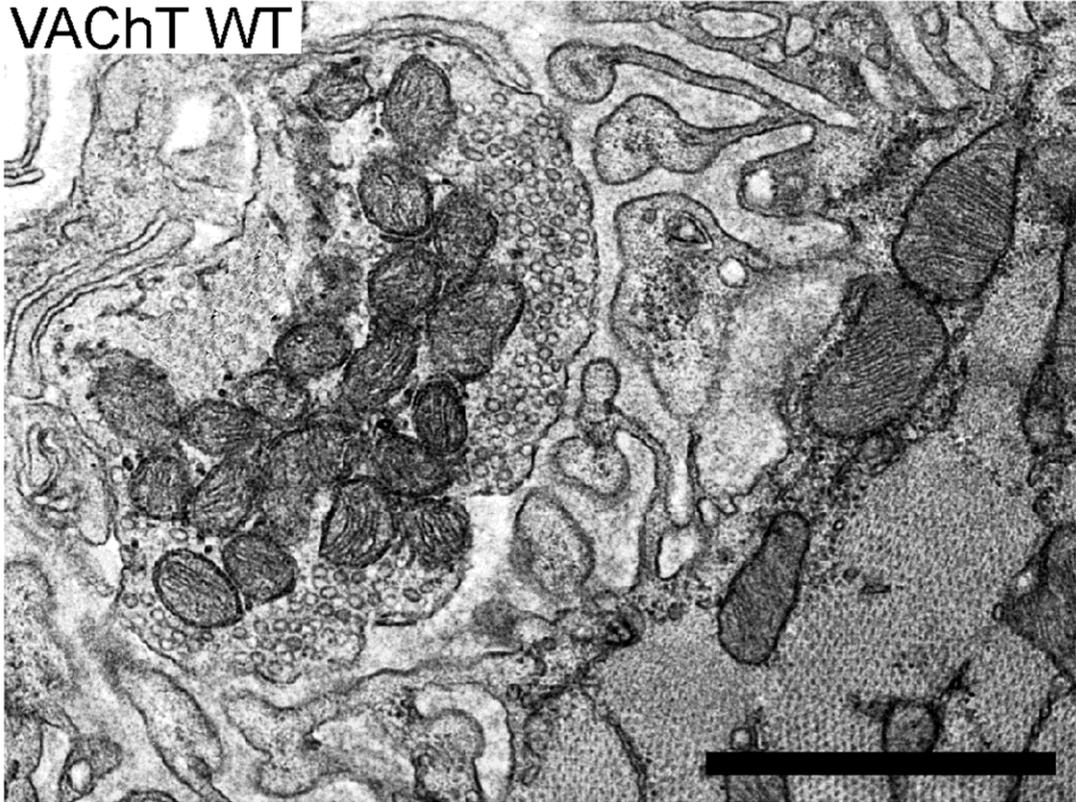
4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. As JNMs de diafragma de camundongos VAcChT KD^{HOM} apresentam aspecto morfológico normal, mas alteração na distribuição de VSs na ausência de estimulação

A fim de determinar os efeitos da expressão reduzida do VAcChT sobre o aspecto morfológico da JNM nós utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão para examinar e caracterizar, de forma inédita, a ultraestrutura de placas motoras do músculo diafragma de camundongos VAcChT KD^{HOM} adultos. Nós encontramos que os elementos sinápticos das JNM de camundongos VAcChT KD^{HOM} apresentam aspecto ultraestrutural geral idêntico ao dos animais VAcChT WT (**Figura 22A e B**). Quando mensuramos o tamanho dos perfis de terminais pré-sinápticos nós observamos que não existia diferença na área de secção transversa dos perfis de terminais nervosos encontrados entre os camundongos VAcChT WT e VAcChT KD^{HOM} (**Figura 23A**). Considerando que camundongos *knockout* para o transportador vesicular de glutamato do tipo 1 (VGLUT1 KO) apresentam redução no número de VSs em terminais nervosos glutamatérgicos (Fremeau Jr. *et al.*, 2004 a), nós questionamos se a redução na expressão do VAcChT poderia ter um efeito similar sobre o número de VSs nos terminais motores colinérgicos. Contudo, nós não encontramos diferença no número de VSs/ μm^2 de terminal entre os camundongos VAcChT WT e VAcChT KD^{HOM} (**Figura 23B**). Nós também mensuramos o comprimento dos perfis das dobras juncionais pós-sinápticas, considerando possíveis alterações compensatórias da célula muscular em decorrência do déficit colinérgico, mas também não observamos diferenças entre os genótipos (**Figura 23C**). Considerando que acetilcolina liberada através da exocitose de VSs é o principal sinal neuronal que dispara respostas a partir dos receptores colinérgicos pós-sinápticos e então regula a diferenciação pós-sináptica e coordena a maturação sináptica (Misgeld *et al.*, 2002; Witzemann, 2006), nossos resultados sugerem, portanto, que a expressão reduzida do VAcChT assegura uma liberação mínima de acetilcolina que é suficiente para manter o desenvolvimento e a formação normal das sinapses neuromusculares nos camundongos VAcChT KD^{HOM}.

A VACHT WT



B VACHT KD^{HOM}

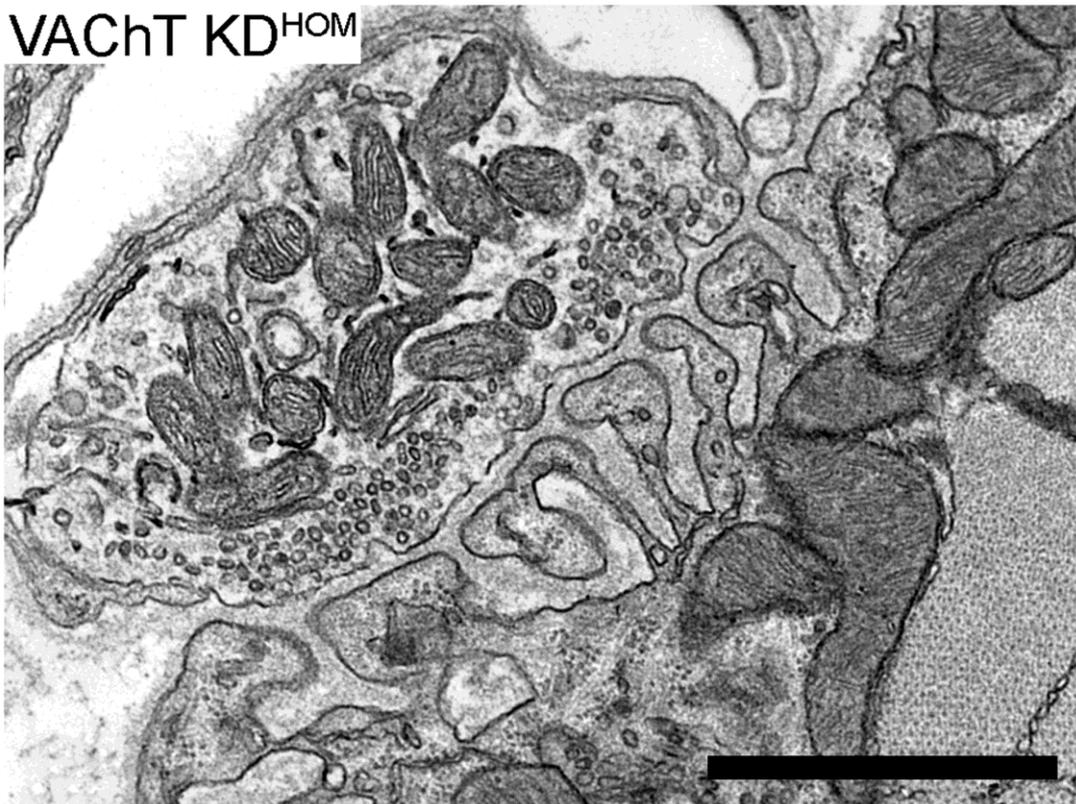


Figura 22 – Elétron-micrografias de transmissão do perfil de duas JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT (A) e VACHT KD^{HOM} (B) na ausência de estímulo. Barra de escala = 1 μ m. Aumento 20.000x.

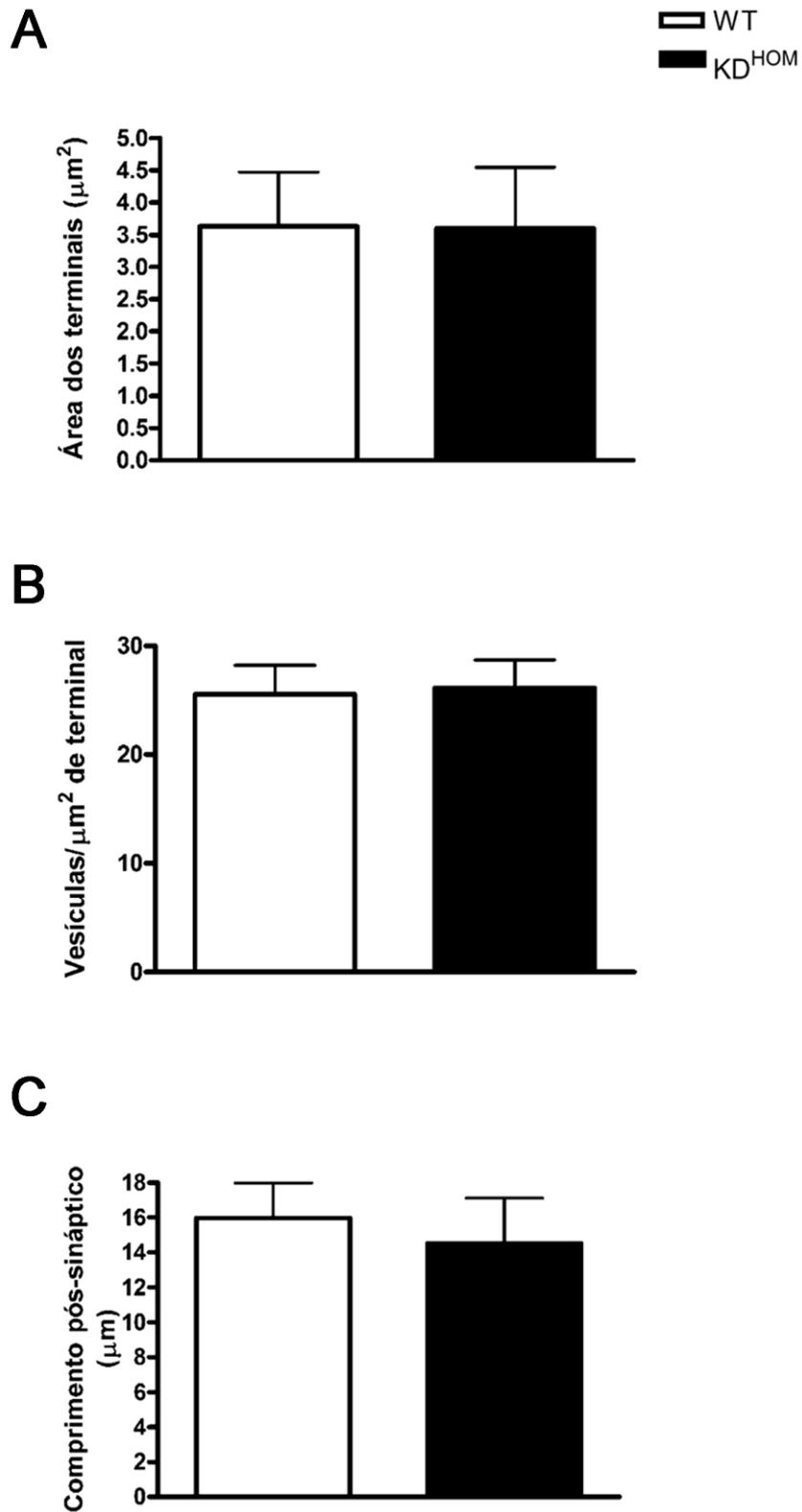


Figura 23 – A expressão reduzida do VAcHT não induz alterações no aspecto morfológico geral das JNMs de diafragma nos camundongos VAcHT KD^{HOM}: A - Gráfico mostrando o tamanho da área de secção transversa dos perfis de terminais pré-sinápticos em μm^2 . B - Gráfico comparando a relação do número de VSs por μm^2 de perfil de terminal pré-sináptico. C - Gráfico exibindo o comprimento total dos perfis de dobras da membrana pós-sináptica (μm). (Nós analisamos, no mínimo, 25 JNMs de 5 animais individuais por genótipo. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM)).

Durante as análises morfométricas para a caracterização das JNMs nós percebemos uma alteração na distribuição das VSs localizadas próximas às zonas ativas pré-sinápticas nos terminais nervosos dos camundongos VACHT KD^{HOM} quando comparados aos WT (**Figura 24A e B** – círculos). A partir dessa observação nós analisamos, de forma quantitativa, a distribuição das VSs dentro dos perfis de terminais motores de ambos os genótipos e confirmamos que os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentavam uma alteração na distribuição de VSs localizadas a diferentes distâncias graduais a partir das zonas ativas pré-sinápticas quando comparados com os camundongos VACHT WT (**Figura 24C e Tabela 1**). As **figuras 25A e B** ilustram uma sequência de quatro cortes seriados (50 nm de espessura) de JNM dos camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, que possibilitam acompanhar com mais precisão a distribuição das VSs nos terminais motores. Estes resultados sugerem que o VACHT tem um papel importante na distribuição de VS nos terminais motores de diafragma.

Tabela 1 – Média ± Erro Padrão da Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, na ausência de estimulação.

	50 nm	100 nm	150 nm	200 nm	250 nm	300 nm
WT	6.2 ± 0.9	12.2 ± 2.0	16.9 ± 2.5	23.1 ± 3.0	29.1 ± 3.5	34.9 ± 4.0
KD ^{HOM}	2.8 ± 0.6	6.3 ± 1.0	9.5 ± 1.7	13.5 ± 2.2	16.6 ± 2.9	20.0 ± 3.6

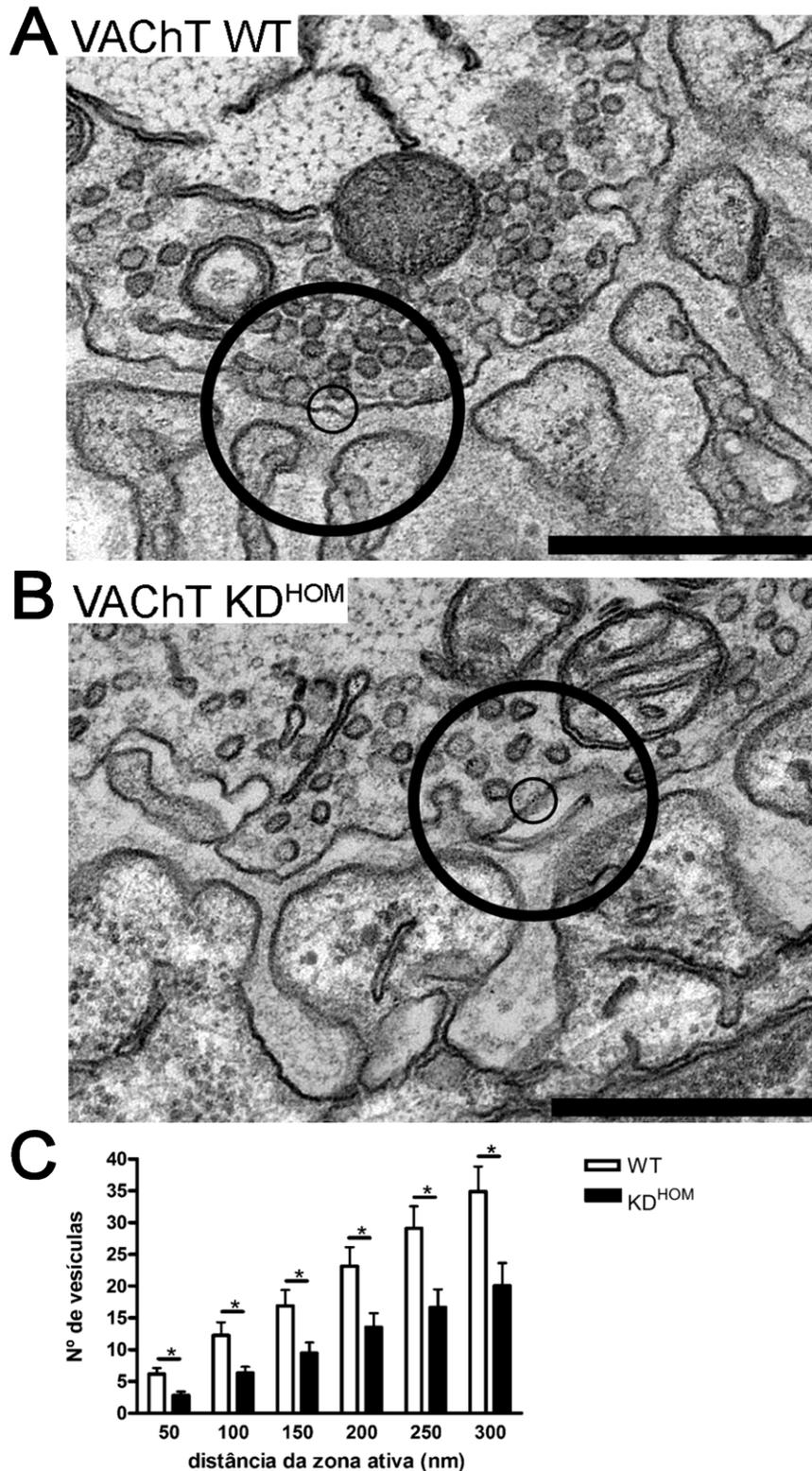


Figura 24 – Os terminais motores de diafragma de camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam distribuição alterada de VSs próximas às zonas ativas na ausência de estimulação: A e B - Imagens representativas do perfil de dois terminais pré-sinápticos de JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, na ausência de estímulo, mostrando a distribuição de VSs localizadas a diferentes distâncias próximas das zonas ativas (os círculos representam as distâncias de 50 nm [circulo menor] e 300 nm [circulo maior]). Barra de escala = 500 nm. Aumento 50.000x. **C -** Gráfico mostrando as médias do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas pré-sinápticas. Nós analisamos, no mínimo, 25 perfis JNMs de 5 animais individuais por genótipo. Todos os perfis de zonas ativas visualizadas integralmente foram utilizados para a quantificação. Os resultados são expressos como média ± EPM. * = p<0.05, teste *t-Student* não pareado.

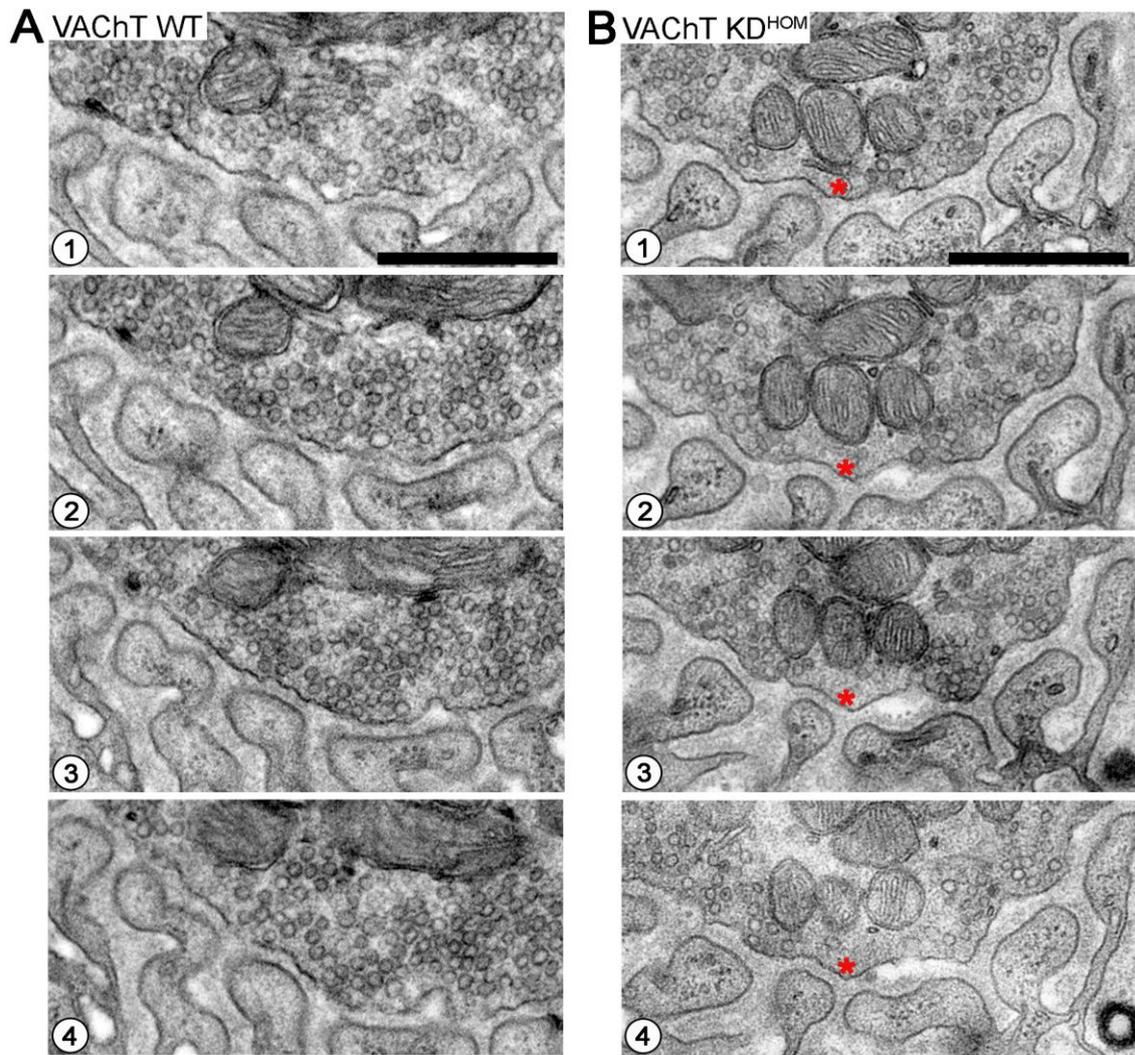


Figura 25 – A distribuição de VSs em terminais motores de diafragma na ausência de estimulação: A e B - Quatro secções seriadas do perfil de JNMs de animais VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, mostrando áreas sem VSs (*) nas zonas ativas dos terminais motores dos animais VACHT KD^{HOM}. Barra de escala = 500 nm. Aumento 50.000x.

4.2. A expressão reduzida do VAcHT altera a distribuição de VSs em JNMs estimuladas eletricamente

A partir dos resultados descritos anteriormente mostrando uma alteração na distribuição de VSs nos terminais motores de diafragma dos animais VAcHT KD^{HOM}, nós decidimos avaliar se a reciclagem e distribuição das VSs estariam alteradas após diferentes formas de estimulação dos terminais pré-sinápticos. Considerando que os animais VAcHT KD^{HOM} apresentam uma menor recuperação da depressão sináptica induzida por estímulo tetânico (Lima *et al.*, 2010), que pode estar relacionada com uma alteração na reciclagem vesicular, nós utilizamos a técnica de MET para avaliarmos a reciclagem e distribuição das VSs do aglomerado de reciclagem total (TRP) mediante aplicação de estímulo elétrico despolarizante (20 Hz / 5 min). As **figuras 26A e B** mostram imagens representativas de perfis de JNMs de camundongos VAcHT WT e VAcHT KD^{HOM} após estímulo elétrico despolarizante aplicado no nervo frênico. Nós não encontramos diferença no número de VSs/ μm^2 de terminal entre os genótipos estudados (**Figura 26C**). Entretanto, nós observamos que as JNMs dos camundongos VAcHT KD^{HOM} continuavam apresentando uma alteração na distribuição de VSs localizadas a diferentes distâncias das zonas ativas pré-sinápticas após estimulação elétrica (**Figuras 27A e B** – círculos). As análises quantitativas confirmaram que os camundongos VAcHT KD^{HOM} apresentavam uma alteração na distribuição das vesículas localizadas a diferentes distâncias graduais a partir das zonas ativas pré-sinápticas quando comparados com os camundongos VAcHT WT (**Figura 27C e Tabela 2**). As **figuras 28A e B** ilustram uma sequência de quatro cortes seriados (50 nm de espessura) de JNMs dos camundongos VAcHT WT e VAcHT KD^{HOM}, respectivamente, após estimulação elétrica, que possibilitam acompanhar com mais precisão a distribuição das VSs nos terminais motores. Estes resultados sugerem que a expressão reduzida do VAcHT não compromete a reciclagem das VSs do TRP, mas altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma dos animais VAcHT KD^{HOM}.

Tabela 2 – Média \pm Erro Padrão da Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, após estimulação elétrica.

	50 nm	100 nm	150 nm	200 nm	250 nm	300 nm
WT	2.7 \pm 0.3	4.3 \pm 0.4	5.9 \pm 0.2	7.5 \pm 0.4	9.1 \pm 0.6	10.6 \pm 1.0
KD ^{HOM}	1.6 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1	4.7 \pm 0.4	5.5 \pm 0.6	6.4 \pm 1.0

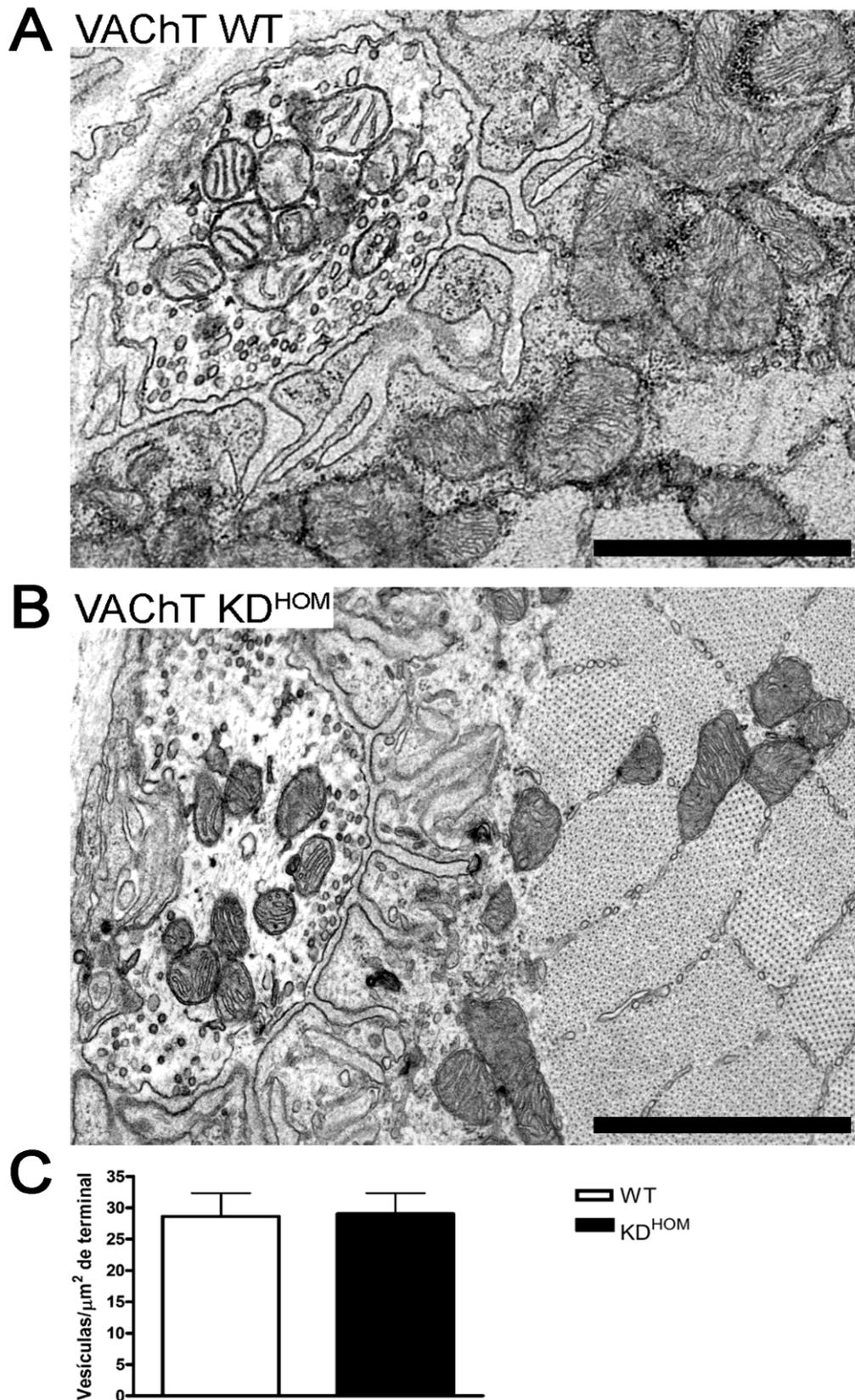


Figura 26 – A expressão reduzida do VACHT não compromete a reciclagem de VSs do TRP após estimulação elétrica: **A** e **B** - Imagens representativas do perfil de duas JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, após estimulação elétrica de 20 Hz por 5 minutos. Barra de escala = 1 μm. Aumento 20.000x. **C** - Gráfico comparando a relação do número de VSs por μm² de perfil de terminal pré-sináptico. Nós analisamos, no mínimo, 15 perfis de JNMs de 3 animais individuais por genótipo.

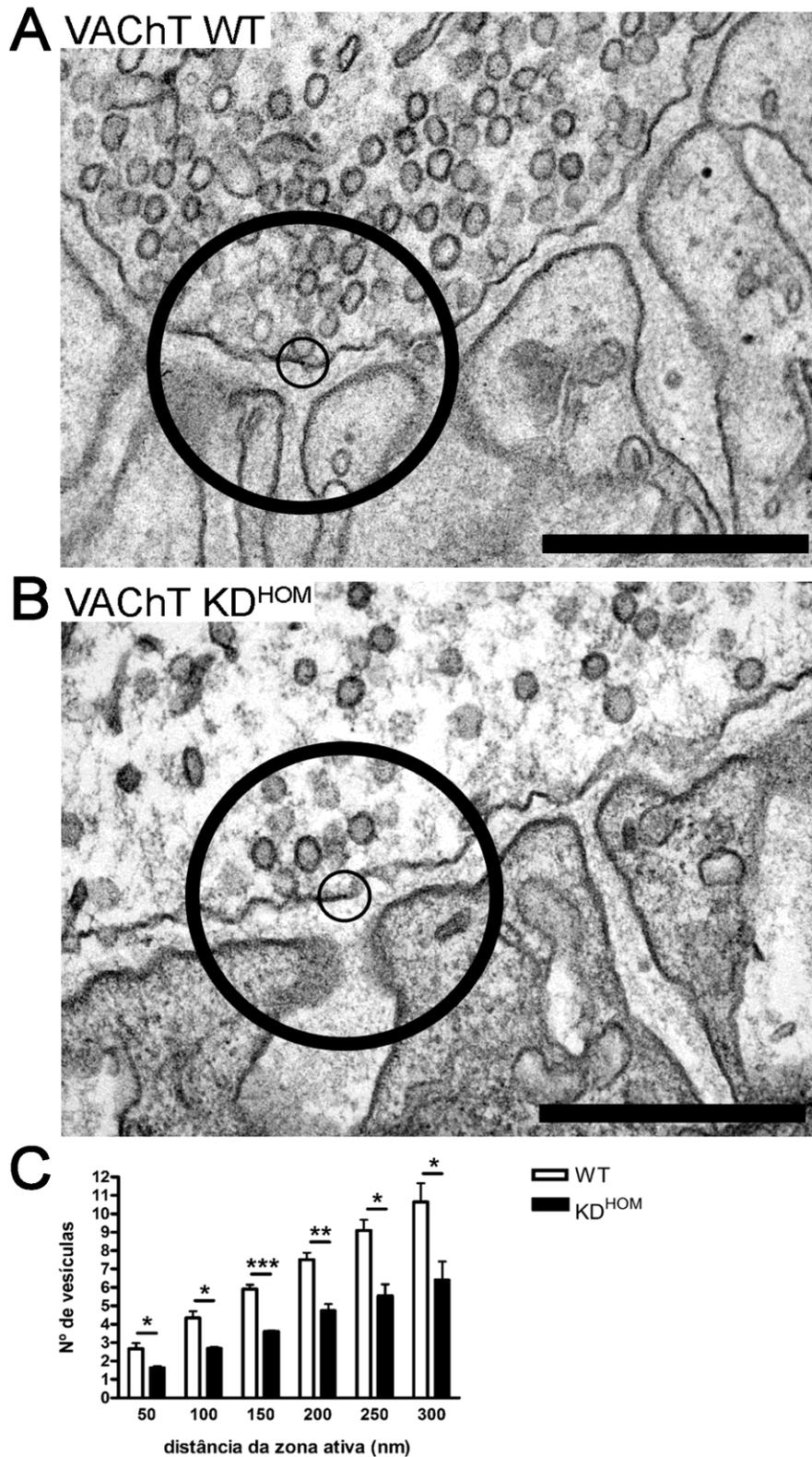


Figura 27 – A expressão reduzida do VACht altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma após estimulação elétrica: A e B - Imagens representativas do perfil de dois terminais pré-sinápticos de JNMs de diafragma de camundongos dos referidos genótipos após o mesmo tratamento supracitado, mostrando a distribuição de VSs localizadas a diferentes distâncias das zonas ativas (os círculos representam as distâncias de 50 nm [circulo menor] e 300 nm [circulo maior]). Barra de escala = 500 nm. Aumento 50.000x. **C -** Gráfico mostrando as médias do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas pré-sinápticas. Nós analisamos, no mínimo, 15 perfis de JNMs de 3 animais individuais por genótipo. Todos os perfis de zonas ativas visualizadas integralmente foram utilizados para a quantificação. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * = $p < 0.05$; ** $p = 0.005$; *** $p = 0.0006$, teste *t-Student* não pareado.

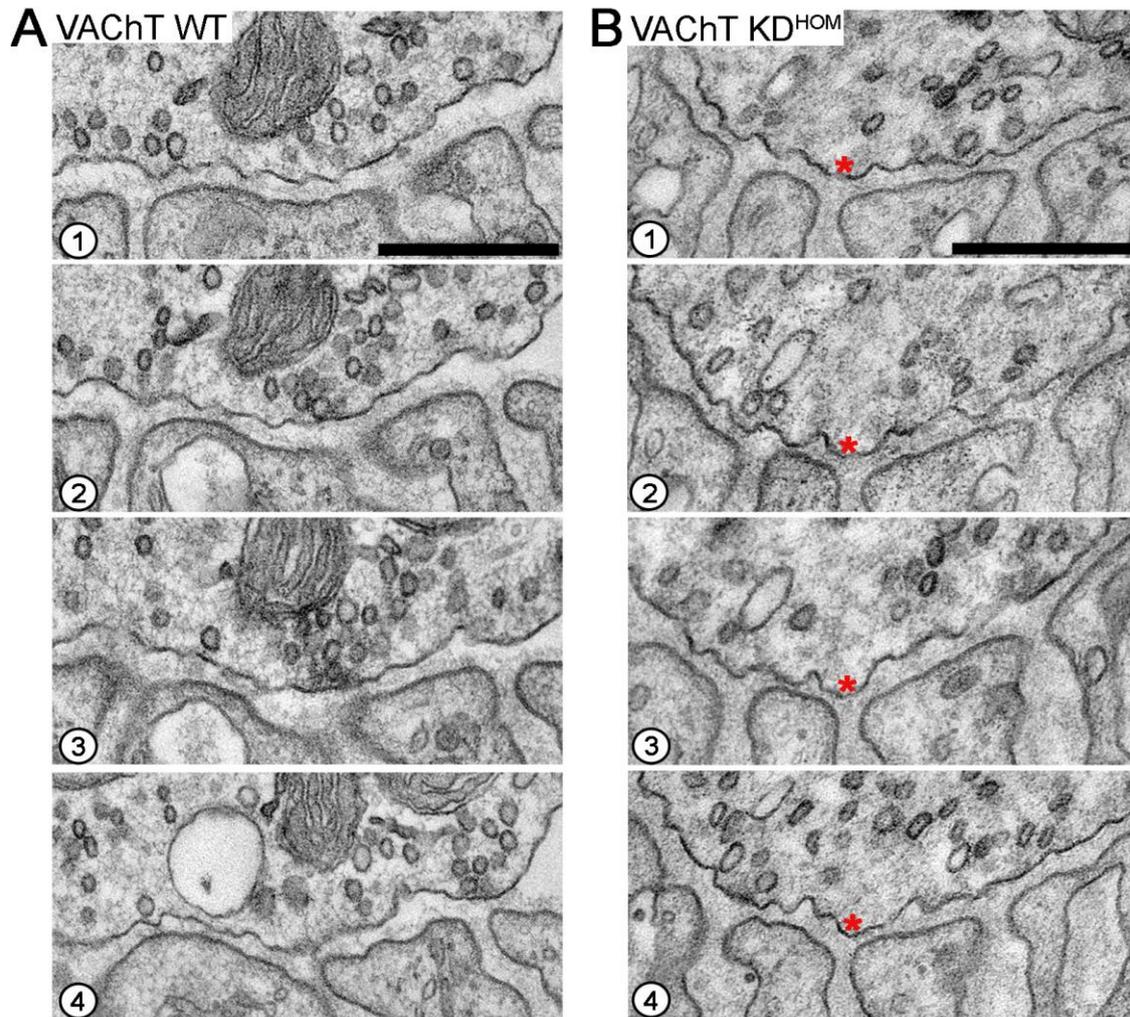


Figura 28 – A distribuição de VSs em terminais motores de diafragma após estimulação elétrica: A e B - Quatro secções seriadas do perfil de JNMs de animais VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, mostrando áreas sem VSs (*) nas zonas ativas dos terminais motores dos animais VACHT KD^{HOM}. Barra de escala = 500 nm. Aumento 50.000x.

4.3. As JNMs de diafragma de camundongos VAcHT KD^{HOM} apresentam alteração na reciclagem e distribuição de VSs após estimulação hipertônica com sacarose

Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que os camundongos VAcHT KD^{HOM} apresentavam pronunciado defeito na transmissão neuromuscular, caracterizada por uma redução na liberação espontânea de ACh, a qual é independente de cálcio (Prado *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010). Além disso, Lima e colaboradores (2010) sugeriram que a redução na frequência de MEPPs observada para os animais KD^{HOM} seria o resultado de uma competição entre VSs contendo acetilcolina e vesículas desprovidas de neurotransmissor, pelos sítios de liberação pré-sinápticos. Considerando que tais sítios de liberação são ocupados por VSs aptas para a exocitose rápida, ou seja, aquelas que compõem o aglomerado RRP, nós utilizamos solução hipertônica de sacarose (500 mM) para avaliar a reciclagem das VSs do aglomerado de liberação rápida, pois esta forma de estimulação também independe da participação de íons cálcio (Rosenmund and Stevens, 1996; Sara *et al.*, 2002).

Utilizando a técnica de registro eletrofisiológico de MEPPs nós monitoramos, de uma forma indireta, a liberação de ACh induzida por sacarose hipertônica aplicada sobre o diafragma de camundongos VAcHT KD^{HOM} e comparamos com os WT. As **figuras 29A e B** mostram dois registros representativos dos MEPPs obtidos a partir de preparações neuromusculares de diafragma de camundongos VAcHT WT e VAcHT KD^{HOM}, respectivamente, ao final de 10 minutos na presença de solução hipertônica de sacarose (500 mM). A frequência de MEPPs antes da estimulação foi de $0.4 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ (média \pm EPM) para VAcHT WT e $0.7 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ para VAcHT KD^{HOM}. Após 10 minutos de estimulação hipertônica a frequência de MEPPs nos WT foi cerca de 16.2 ± 3.7 (média \pm EPM) vezes maior que a frequência de pré-incubação, enquanto que nos KD^{HOM} a frequência aumentou apenas 3.1 ± 0.8 vezes a partir dos valores de pré-incubação (**Figura 29C**). A amplitude dos MEPPs antes da estimulação foi de 1.1 ± 0.2 mV (média \pm EPM) para VAcHT WT e 1.0 ± 0.2 mV para VAcHT KD^{HOM}. A aplicação de solução hipertônica de sacarose induziu uma redução na amplitude de MEPPs nos animais VAcHT KD^{HOM}, observada desde o primeiro minuto de estimulação (**Figura 29D**). Estes dados sugerem que sob a estimulação hipertônica, o preenchimento vesicular não pode ser mantido durante a liberação de neurotransmissores e que os animais VAcHT KD^{HOM} liberam vesículas parcialmente preenchidas. Além disso, a

redução na frequência de MEPPs que ocorre posteriormente pode refletir um comprometimento da reciclagem de VSs do RRP durante a aplicação do estímulo hipertônico.

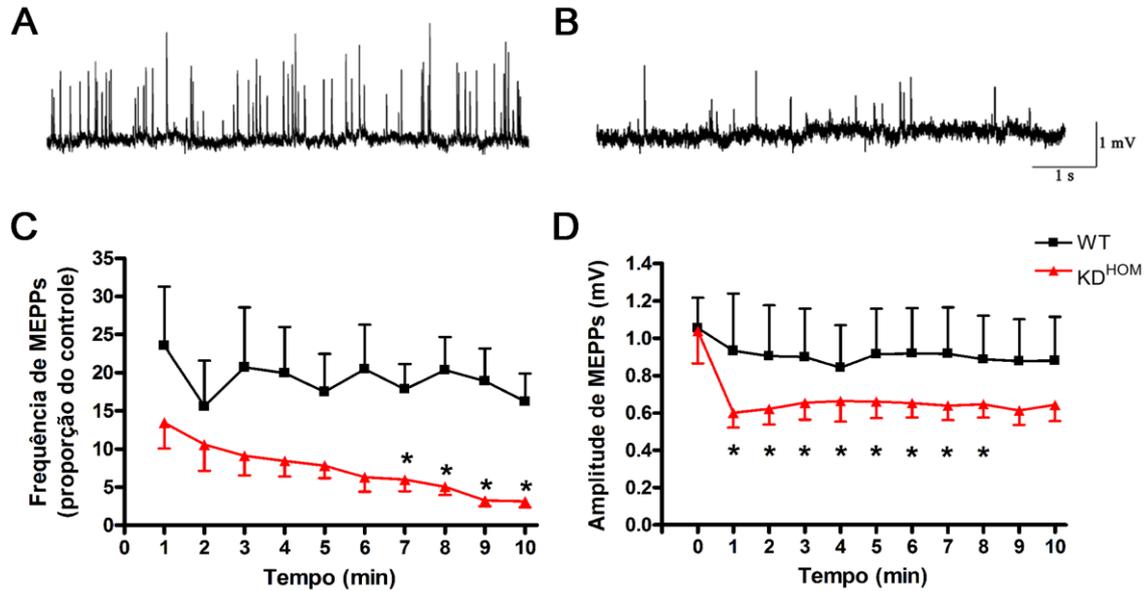


Figura 29 – A expressão reduzida do VAcHT determina alterações na liberação de ACh induzida por estímulo hipertônico com sacarose: **A e B** – Registros representativos de MEPPs obtidos a partir de preparações neuromusculares de diafragma de camundongos VAcHT WT e VAcHT KD^{HOM}, respectivamente. Ambos os registros representam a frequência de MEPPs ao final de 10 minutos de estimulação com solução hipertônica de sacarose (500 mM). **C** – Gráfico comparando a frequência de MEPPs registrados no músculo diafragma de camundongos VAcHT WT e VAcHT KD^{HOM} durante 10 minutos na presença de solução hipertônica de sacarose. **D** – Gráfico comparando a amplitude dos MEPPs registrados durante 10 minutos na presença de solução hipertônica de sacarose para ambos os genótipos. (n=4 fibras musculares para os animais de cada genótipo. Os resultados foram normalizados a partir dos valores basais de cada parâmetro para ambos os genótipo e são expressos como média ± EPM. * = p<0.05, teste *t-Student* não pareado).

Para testar se os terminais pré-sinápticos de JNMs de diafragma dos camundongos VAcHT KD^{HOM} apresentavam comprometimento de reciclagem de VSs do RRP durante estimulação hipertônica, nós avaliamos os níveis de internalização pré-sináptico da sonda atividade-dependente, FM1-43 fx, que permite monitorar a reciclagem vesicular. As preparações neuromusculares foram incubadas em Ringer contendo sacarose (500 mM) e o marcador fluorescente FM1-43 fx. A **figura 30** mostra imagens representativas dos elementos sinápticos de JNMs de diafragma de animais WT e KD^{HOM}, observadas ao microscópio confocal: **A e D** - terminais nervosos marcados com FM 1-43 fx; **B e E** - aglomerados de receptores nicotínicos pós-sinápticos marcados com α -bungarotoxina; **C e F** - sobreposição dos elementos pré e pós-sinápticos.

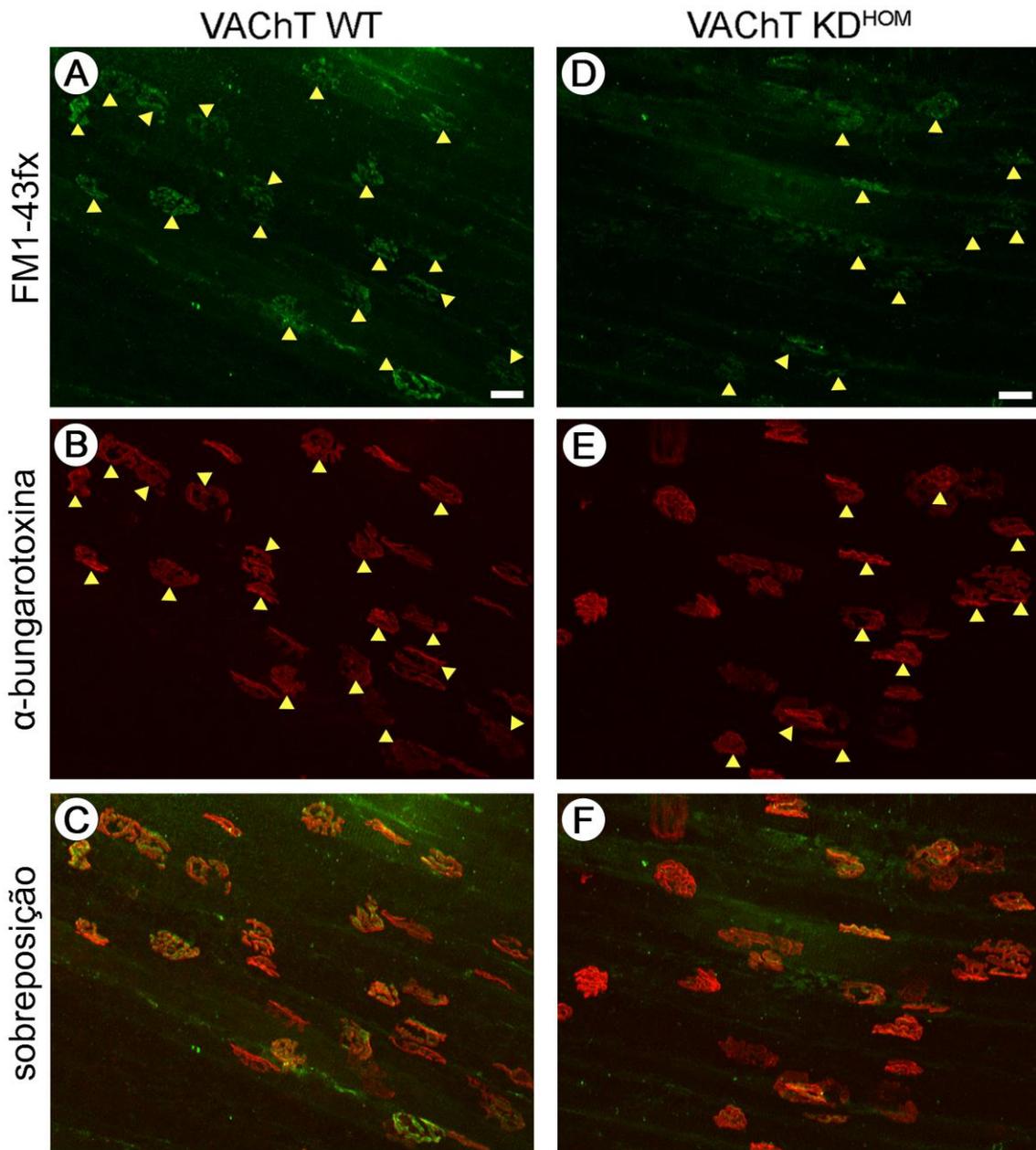


Figura 30 – Imagens representativas de elementos sinápticos (cabeças de setas) de JNMs de diafragma de camundongos VChT WT (A - C) e VChT KD^{HOM} (D - F) após estimulação com sacarose hipertônica, obtidas através de microscopia confocal. Podemos observar para ambos os genótipos: A e D - os terminais motores pré-sinápticos marcados com FM 1-43 fx (verde), B e E - aglomerados pós-sinápticos de receptores nicotínicos para ACh na membrana muscular marcados com α-bungarotoxina-Alexa 594 (vermelho) e, C e F - a colocalização destes elementos (amarelo). Barra de escala = 10 μm.

Quando nós mensuramos a intensidade do sinal fluorescente dos terminais pré-sinápticos, nós observamos uma redução significativa para os animais VAcHT KD^{HOM} em comparação com os WT (**Figura 31A**). Considerando que a estimulação hipertônica recruta um pequeno número de VSs, a internalização de FM1-43 e conseqüentemente os níveis de fluorescência pré-sinápticos são, evidentemente, reduzidos para ambos os genótipos. Então, para assegurar que a mensuração do sinal fluorescente realmente foi realizada nos terminais nervosos, nós realizamos a marcação dos aglomerados de receptores nicotínicos pós-sinápticos para ACh com α -bungarotoxina conjugada com Alexa-594 para identificar a localização precisa dos terminais pré-sinápticos, pois a JNM madura é caracterizada pela co-localização espacial de VSs e aglomerados de receptores para ACh (Dahm and Landmesser, 1991). Nós quantificamos os níveis de fluorescência dos elementos pós-sinápticos e observamos que os valores foram similares para ambos os genótipos (**Figura 31B**). Simultaneamente, mensuramos a área de cada um dos elementos pré e pós-sinápticos marcados e não observamos diferença no tamanho destes entre os animais VAcHT WT e VAcHT KD^{HOM} (**Figura 31C**). É importante ressaltar que a área total de músculo diafragma analisada foi semelhante para ambos os genótipos estudados (**Figura 31D**).

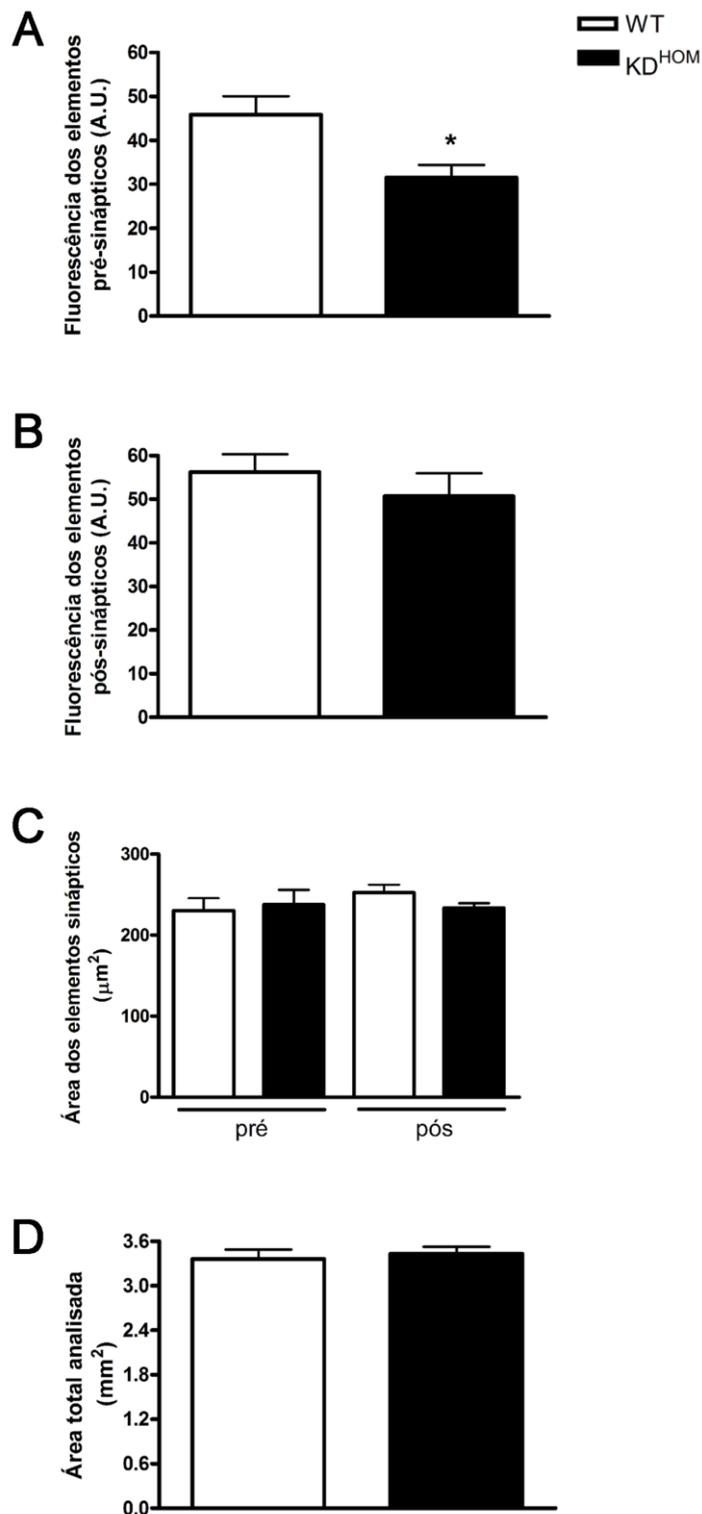


Figura 31 – Os animais VACHT KD^{HOM} apresentam alteração na reciclagem de VSs do RRP induzida por estímulo hipertônico com sacarose: **A** - Gráfico comparando a quantificação da intensidade de fluorescência dos elementos pré-sinápticos em unidades arbitrárias (U.A.). **B** - Gráfico mostrando a quantificação da intensidade de fluorescência dos elementos pós-sinápticos em unidades arbitrárias (U.A.). **C** - Gráfico comparando a média dos valores de área dos elementos sinápticos individualmente em μm^2 . **D** - Gráfico exibindo a média dos valores de área total analisada sobre o diafragma em mm^2 . (n=3 animais de cada genótipo. Foram quantificados e mensurados 1248 e 572 elementos pré-sinápticos para VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente e, 1814 e 1609 elementos pós-sinápticos para VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * = $p < 0.05$, teste *t-Student* não pareado).

Por fim, nós utilizamos a MET para avaliar no plano ultraestrutural os efeitos da estimulação hipertônica com sacarose sobre aspecto morfológico dos terminais motores de camundongos VACHT KD^{HOM}. As **figuras 32A e B** mostram imagens representativas de perfis de JNMs de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, após estímulo com solução hipertônica de sacarose (500 mM). Análises quantitativas de várias dessas imagens revelaram que o número de VSs/ μm^2 de perfil de terminal foi significativamente reduzido nos animais VACHT KD^{HOM} quando comparados com os WT (**Figura 32C** – WT = 27.07 ± 1.227 ; KD^{HOM} = 17.34 ± 0.3854). Após a estimulação hipertônica, nós observamos que as JNMs dos camundongos VACHT KD^{HOM} continuavam apresentando uma alteração na distribuição de VSs nos terminais pré-sinápticos (**Figuras 33A e B** – círculos). As análises quantitativas confirmaram que os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentavam uma alteração na distribuição de VSs localizadas a diferentes distâncias graduais a partir das zonas ativas pré-sinápticas quando comparados com os camundongos VACHT WT (**Figura 33C e Tabela 3**) Os resultados descritos acima indicam que a expressão reduzida do VACHT leva a um comprometimento da reciclagem das VSs do RRP e a uma alteração na distribuição de vesículas na JNM de diafragma dos animais VACHT KD^{HOM} após aplicação de estímulo hipertônico.

Tabela 3 – Média \pm Erro Padrão da Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, após estimulação com sacarose hipertônica.

	50 nm	100 nm	150 nm	200 nm	250 nm	300 nm
WT	1.3 ± 0.1	2.5 ± 0.2	3.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	5.1 ± 0.3	6.0 ± 0.3
KD ^{HOM}	0.9 ± 0.1	2.3 ± 0.3	3.0 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.9 ± 0.3	4.3 ± 0.4

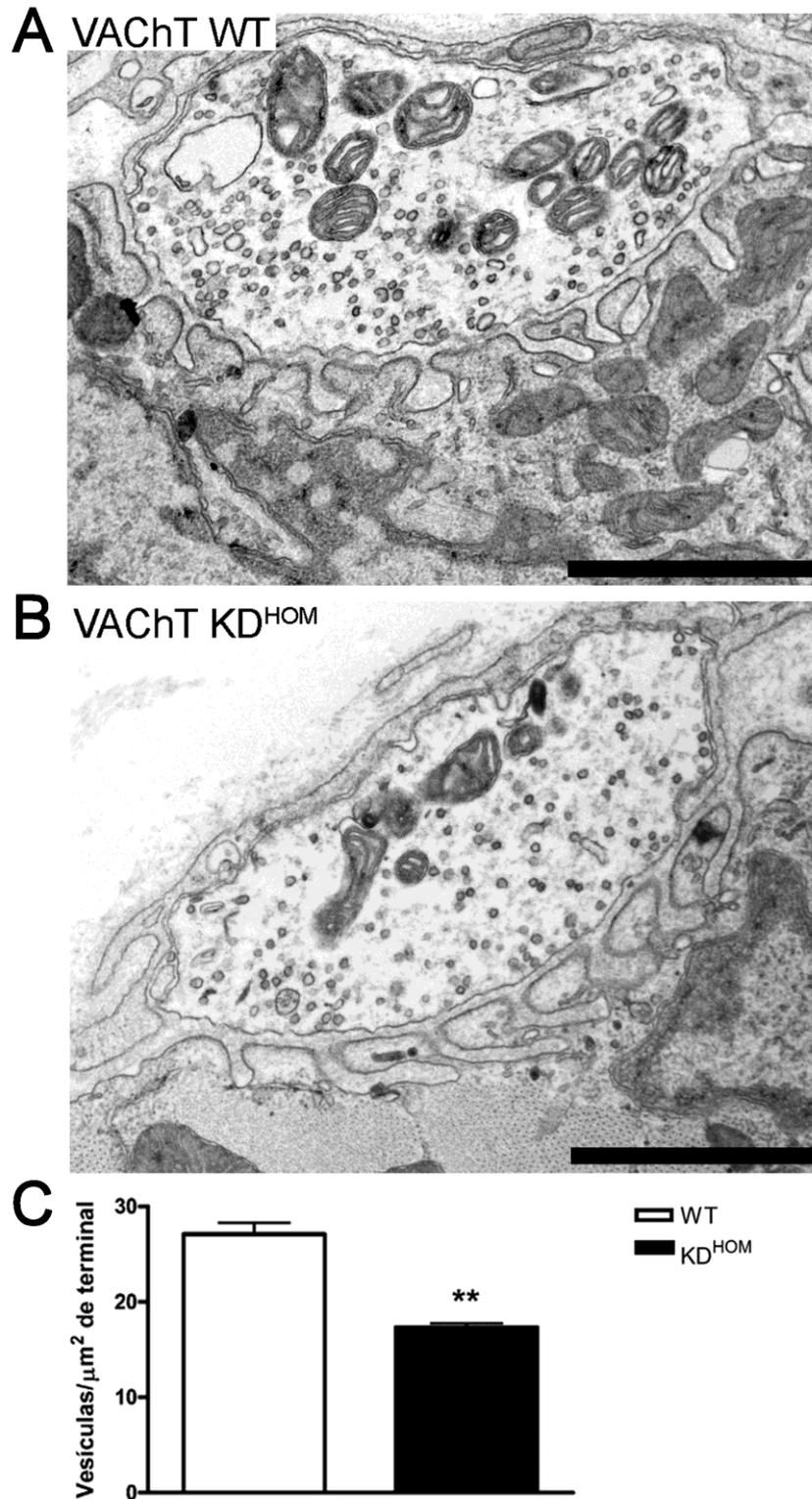


Figura 32 – A redução na expressão do VACHT compromete a reciclagem das VSs do RRP após aplicação de estímulo hipertônico com sacarose: A e B - Imagens representativas do perfil de duas JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, após estimulação com solução hipertônica de sacarose por 10 min. Barra de escala = 1 μm . Aumento 20.000x. E - Gráfico comparando a relação do número de VSs por μm^2 de perfil de terminal pré-sináptico. Nós analisamos, no mínimo, 15 perfis de JNMs de 3 animais individuais por genótipo. Os resultados são expressos como média \pm EPM. ** = $p < 0.01$, teste *t-Student* não pareado.

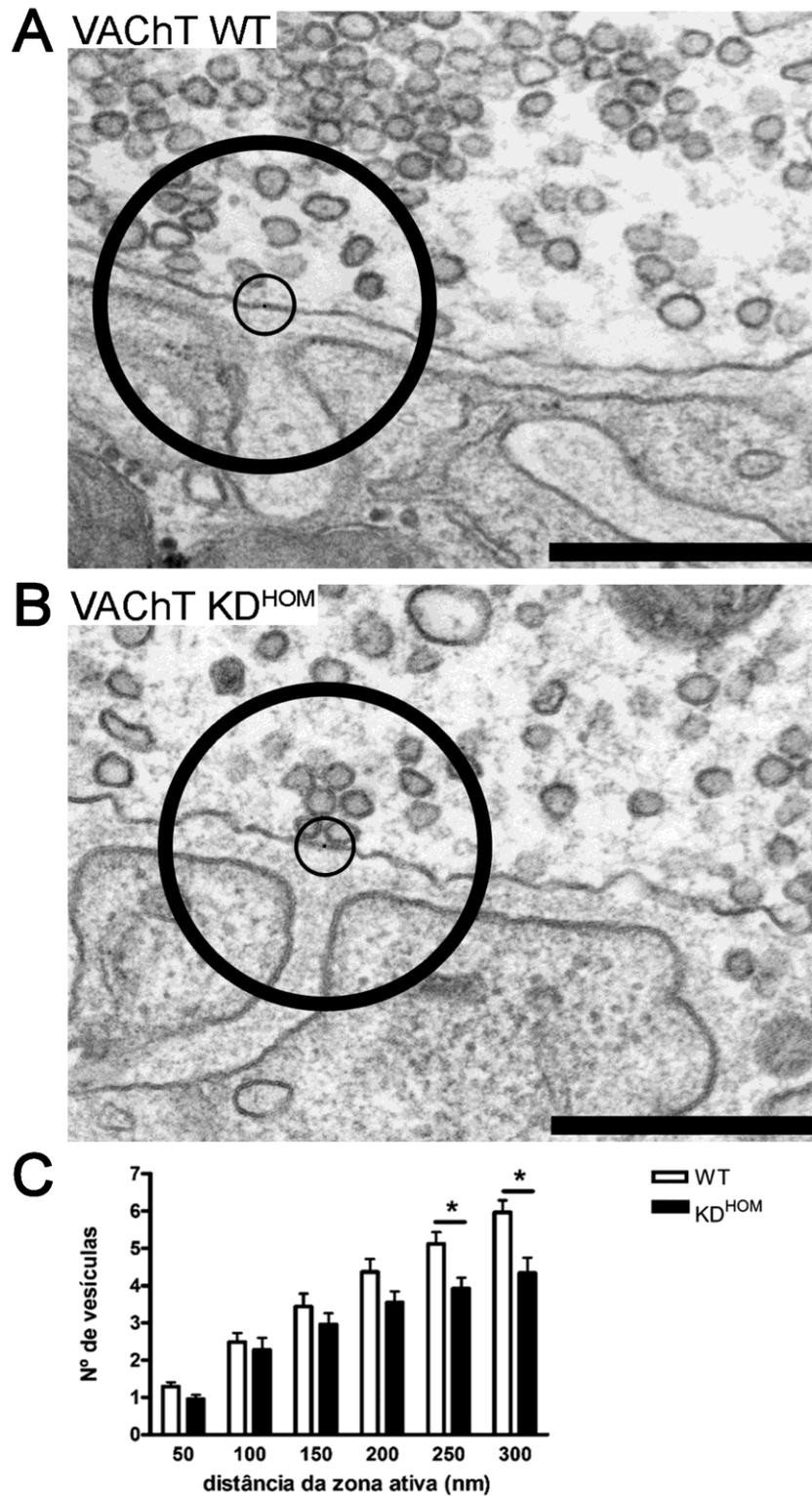


Figura 33 – A redução na expressão do VAcHT altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma após aplicação de estímulo hipertônico com sacarose: A e B - Imagens representativas do perfil de dois terminais pré-sinápticos de JNMs de diafragma de camundongos dos referidos genótipos após o mesmo tratamento supracitado, mostrando a distribuição de VSs localizadas a diferentes distâncias das zonas ativas (os círculos representam as distâncias de 50 nm [circulo menor] e 300 nm [circulo maior]). Barra de escala = 500 nm. Aumento 50.000x. **C -** Gráfico mostrando as médias do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas pré-sinápticas. Nós analisamos, no mínimo, 15 perfis de JNMs de 3 animais individuais por genótipo. Todos os perfis de zonas ativas visualizadas integralmente foram utilizados para a quantificação. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, teste *t-Student* não pareado.

4.4. O aspecto morfológico das VSs nas JNMs de diafragma de camundongos VACHT KD^{HOM}

Além da alteração na distribuição de VSs próximas às zonas ativas, outra característica ultraestrutural que nos chamou a atenção durante a caracterização das JNMs de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} foi a presença de numerosas vesículas com aspecto morfológico irregular, elípticas e achatadas, nos terminais nervosos destes animais. As **figuras 34A e B** mostram elétrôn-micrografias representativas de perfis de terminais nervosos de JNMs contendo vesículas com forma predominantemente arredondada nos camundongos VACHT WT e muitas vesículas com formato elíptico e achatado nos VACHT KD^{HOM}.

Levando-se em consideração as evidências na literatura de que o aspecto morfológico das VSs correlaciona-se com o nível de preenchimento das mesmas com neurotransmissores (Van der Kloot *et al.*, 2002; Budzinski *et al.*, 2009), nós decidimos testar se a alteração na forma das VSs nos terminais motores de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} ocorria devido à redução de seu conteúdo quântico de ACh. Para isso, nós estimulamos a reciclagem de VSs através da aplicação de um estímulo elétrico despolarizante na presença do (\pm)-vesamicol (4 μ M), um inibidor específico do VACHT, para alterar o preenchimento das VSs dos terminais motores de diafragma de animais WT. Então, utilizando equações matemáticas descritas por outros autores (Van der Kloot *et al.*, 2002; Croft *et al.*, 2005) para avaliar aspectos morfológicos de VSs, nós comparamos o tamanho, a partir da circunferência, e o formato das VSs encontradas nos terminais motores dos camundongos WT tratados com aquelas dos VACHT WT e VACHT KD^{HOM} estimulados eletricamente, porém não tratados como vesamicol.

Inicialmente, nós comparamos o número total de VSs nos terminais nervosos de VACHT WT e VACHT KD^{HOM} não tratados (**Figuras 35A e B**, respectivamente) com aquelas de WT tratados (**Figura 35C**), para determinar se o bloqueio da atividade do VACHT poderia interferir com a reciclagem de VSs nas JNMs de diafragma. As análises quantitativas revelaram um número similar de VSs/ μ m² de terminal semelhante entre as três condições experimentais (**Figura 35D**). Este resultado sugere que alterações no conteúdo quântico de ACh determinadas por inibição farmacológica do VACHT não interferem com a reciclagem de VSs na JNM de diafragma.

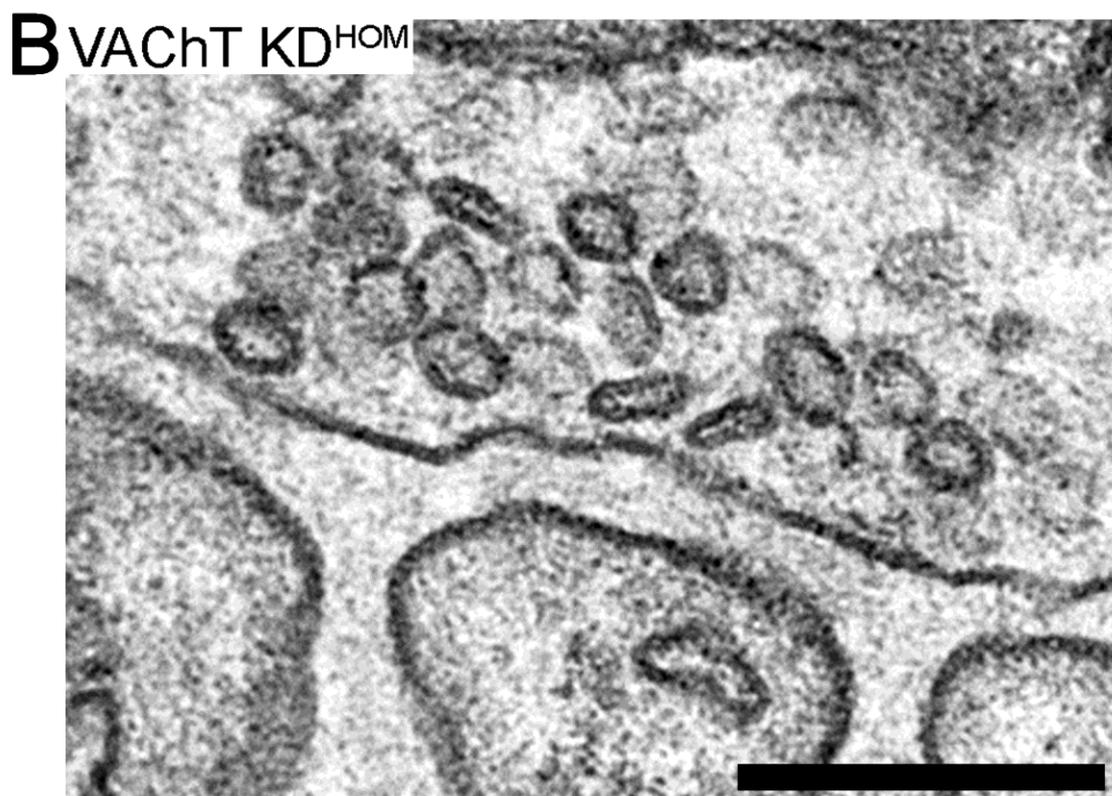
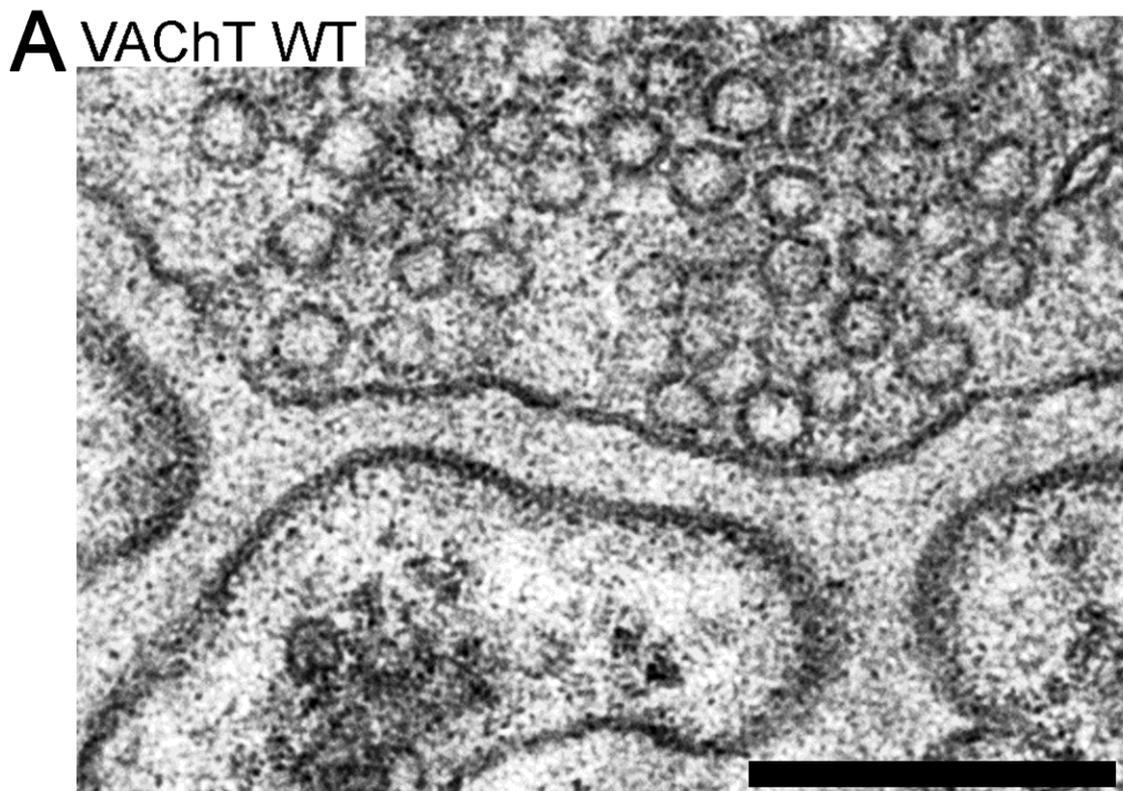


Figura 34 – Os terminais motores de JNMs de diafragma de camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam VSs com forma alterada: A e B - Imagens representativas de perfis terminais pré-sinápticos de JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, mostrando a presença de numerosas vesículas com forma irregular, elípticas e achatadas, nos terminais nervosos de diafragma dos animais KD^{HOM} em comparação com os WT. Barra de escala = 500 nm. Aumento 50.000x.

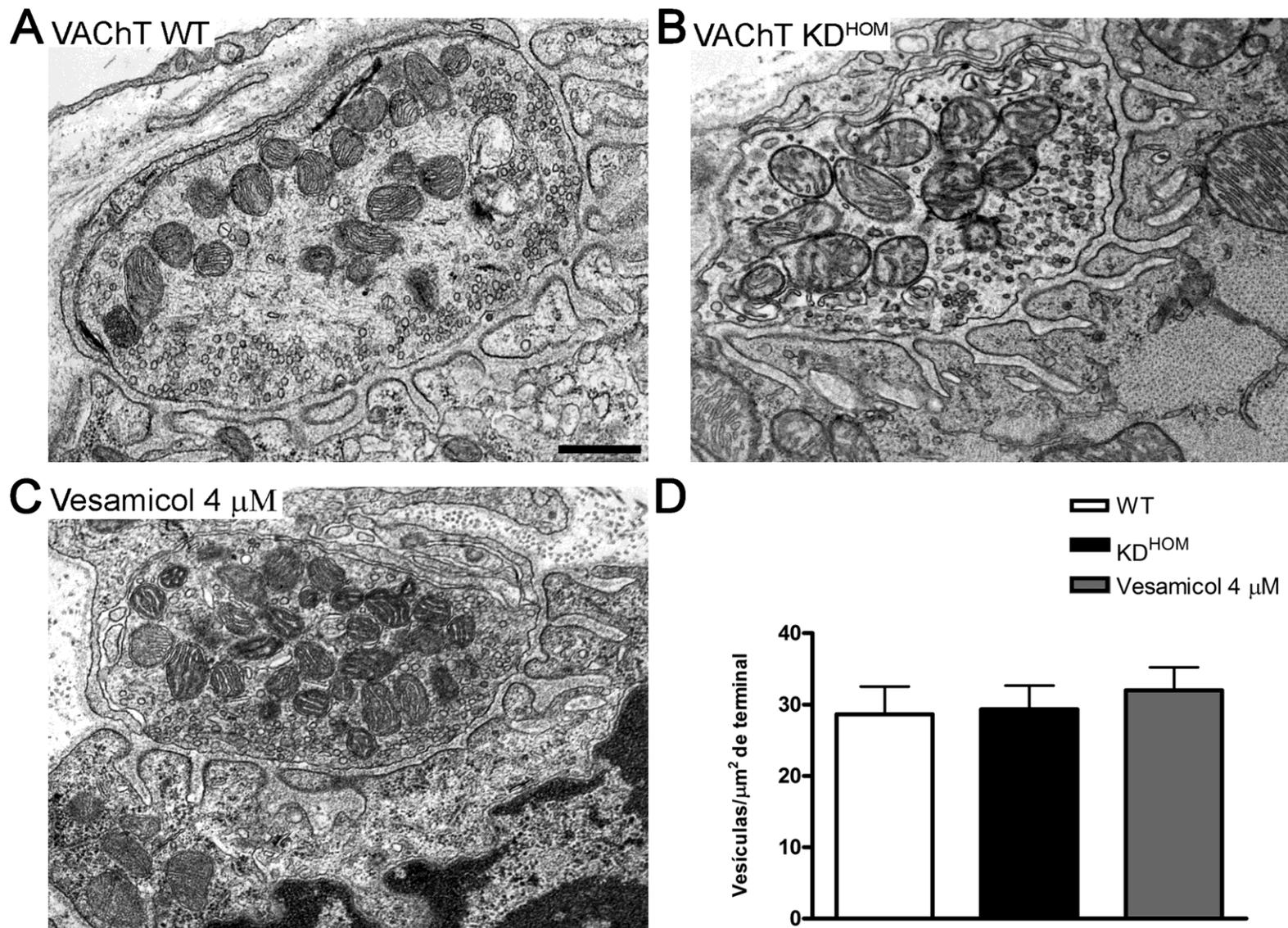


Figura 35 – A inibição farmacológica do VACHT não compromete a reciclagem de VSs nas JNMs de diafragma: **A** e **B** - Imagens representativas do perfil de duas JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, estimulados eletricamente, porém não tratados com vesamicol. **C** - Imagem representativa do perfil de um terminal pré-sináptico de JNM de diafragma de camundongo WT após estimulação elétrica e tratamento com vesamicol. Barra de escala = 500 nm. Aumento 23.000x. **D** - Gráfico comparando a relação do número de VSs por μ m² de perfil de terminal pré-sináptico. (Nós analisamos, no mínimo, 15 JNMs de 3 animais individuais por genótipo. Os resultados são expressos como média \pm EPM)).

Nós também comparamos a distribuição de VSs entre os terminais nervosos de WT tratado e VACHT KD^{HOM} não tratado para avaliarmos se o comprometimento do preenchimento vesicular com neurotransmissor seria o fator determinante da alteração na distribuição de VSs já observada em nosso estudo. As **figuras 36A e B** mostram imagens representativas de perfis de terminais motores de JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM} não tratados com vesamicol. A **figura 36C** mostra uma imagem representativa de um terminal nervoso de diafragma de camundongo WT tratado com vesamicol. As análises quantitativas revelaram que os camundongos VACHT KD^{HOM} não tratados apresentavam uma alteração na distribuição de VSs localizadas a diferentes distâncias graduais a partir das zonas ativas pré-sinápticas quando comparados com os camundongos WT tratados (**Figura 36D e Tabela 4**).

Tabela 4 – Média \pm Erro Padrão da Média do número de VSs localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas, após estimulação elétrica (VACHT KD^{HOM} não tratado e WT tratado com vesamicol).

	50 nm	100 nm	150 nm	200 nm	250 nm	300 nm
KD ^{HOM}	1.6 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1	3.6 \pm 0.1	4.7 \pm 0.4	5.5 \pm 0.6	6.4 \pm 1.0
Vesamicol	2.2 \pm 0.1	4.7 \pm 0.4	8.2 \pm 0.3	11.7 \pm 0.7	13.8 \pm 1.4	15.6 \pm 2.1

Adicionalmente, quando mensuramos o tamanho e o formato das VSs, nós observamos que os terminais nervosos dos animais VACHT KD^{HOM} não tratados apresentavam VSs discretamente menores (224.0 \pm 1.0 nm) que aquelas dos terminais dos animais VACHT WT não tratados (226.0 \pm 1.0 nm). Nós também observamos que os terminais motores dos animais WT tratados com vesamicol apresentavam vesículas ainda menores (203 \pm 2.0 nm) quando comparadas aquelas encontradas nos terminais de VACHT WT e VACHT KD^{HOM} não tratados (**Figuras 37A e B**). Além disso, os terminais nervosos de JNM de diafragma, tanto de VACHT KD^{HOM} não tratados, quanto de WT tratados com vesamicol, apresentaram um número menor de VSs com formato esférico quando comparadas aquelas dos terminais de animais VACHT WT não tratados (**Figura 37C e D**). Estes resultados sugerem que a distribuição das VSs nos terminais motores de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} pode estar relacionada com os níveis de proteína VACHT presentes na membrana vesicular e que o aspecto morfológico das VSs pode ser influenciado pelo conteúdo quântico de ACh.

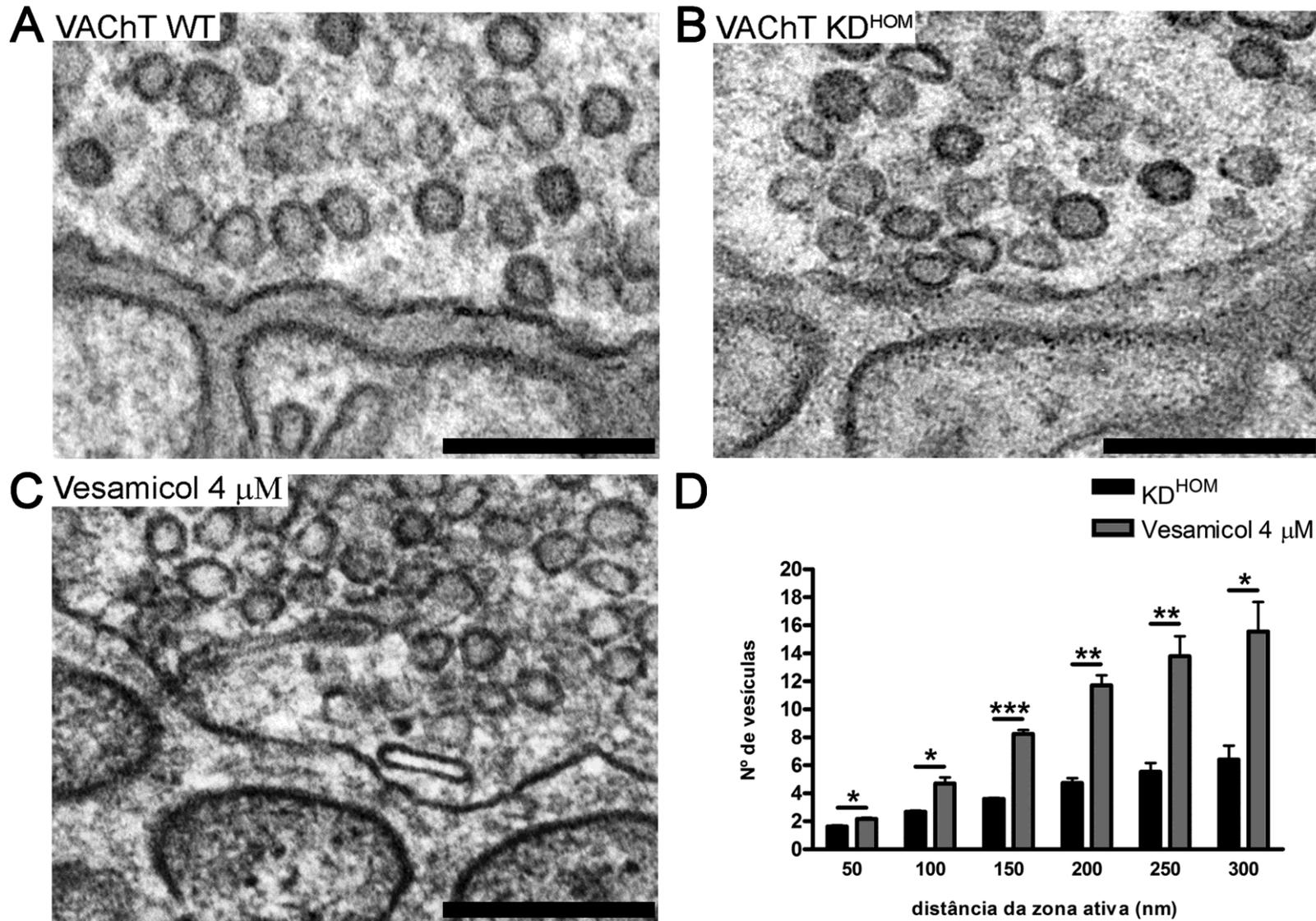


Figura 36 – A distribuição das VS nos terminais motores de diafragma de camundongos VACHT KD^{HOM} é influenciada pelos níveis de expressão da proteína VACHT: A e B – Imagens representativas do perfil de dois perfis de terminais pré-sinápticos de JNMs de diafragma de camundongos VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, respectivamente, estimulados eletricamente, porém não tratados com (\pm)-vesamicol (4 μ M). **C –** Imagem representativa do perfil de um terminal pré-sináptico de JNM de diafragma de camundongo WT após estimulação elétrica e tratamento com vesamicol. Barra de escala = 500 nm. Aumento 50.000x. **D –** Gráfico mostrando as médias do número de VS localizadas a diferentes distâncias a partir das zonas ativas pré-sinápticas. Nós analisamos, no mínimo, 15 perfis de JNMs de 3 animais individuais por genótipo. Todos os perfis de zonas ativas visualizadas integralmente foram utilizadas para a quantificação. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.0001$, teste *t-Student* não pareado.

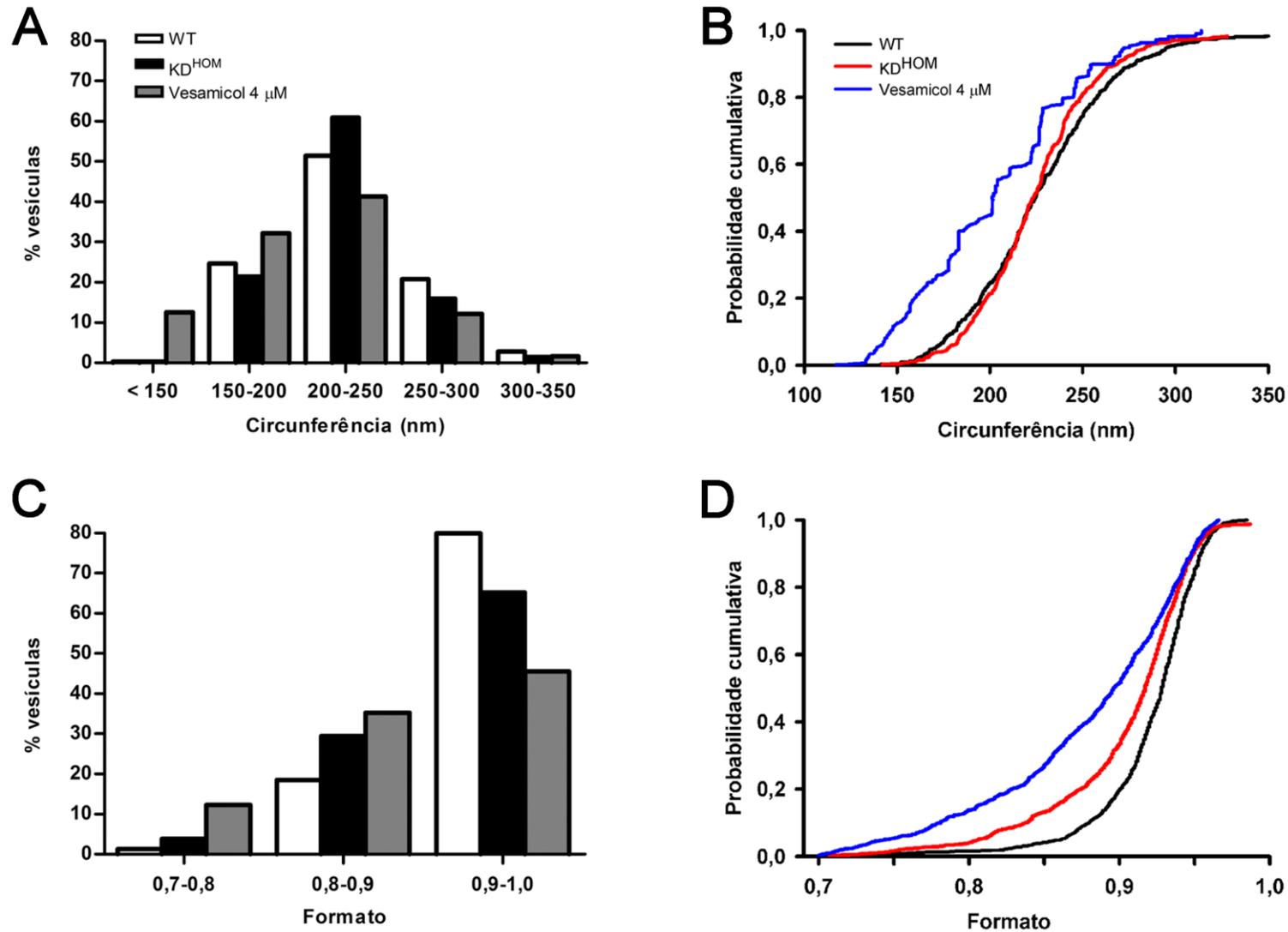


Figura 37 – O aspecto morfológico das VSs nos terminais motores de diafragma de camundongos VAcHT KD^{HOM} é influenciado pelos níveis de ACh das VSs: **A** – Histograma de distribuição dos valores de circunferência das VSs, em nm. **B** – Curva de probabilidade cumulativa para os dados apresentados em (E) ($p < 0.05$ comparando WT e KD^{HOM}; $p < 0.0001$ comparando vesamicol com WT e KD^{HOM}; teste de Kolmogorov-Smirnov). **C** – Histograma de distribuição dos valores de formato das VSs, em unidades arbitrárias (A.U), considerando o valor de um círculo perfeito próximo de 1.0. **D** – Curva de probabilidade cumulativa para os dados apresentados em (G). ($p < 0.0001$ comparando vesamicol e KD^{HOM} com WT; teste de Kolmogorov-Smirnov). Nós analisamos, no mínimo, 15 perfis de JNM de 3 animais individuais por genótipo. Todas as VSs visualizadas integralmente foram utilizadas para a quantificação de circunferência e formato, a saber: WT e KD^{HOM} não tratados = 1104 vesículas para ambos; WT tratado com vesamicol = 1193 vesículas.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

Neste trabalho, nós investigamos as consequências morfológicas e funcionais da expressão reduzida do gene que codifica a proteína VAcHT, sobre as sinapses neuromusculares de diafragma de camundongos VAcHT KD^{HOM} adultos, na idade de 3 meses.

Na literatura, existem relatos de que alterações na expressão de transportadores vesiculares para neurotransmissores induzem alterações morfológicas em sinapses, que podem comprometer severamente a função neuronal e a resposta da célula inervada. Fremeau e colaboradores (2004a) relataram que o bloqueio da expressão do transportador vesicular de glutamato do tipo 1 (VGLUT-1) determinou uma redução no número de VSs em terminações axonais de hipocampo e cerebelo de camundongos. Entretanto, camundongos *knockout* para o transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VMAT-2) não apresentavam alterações morfológicas significativas nos terminais nervosos dopaminérgicos do estriado (Croft *et. al.*, 2005). Contudo, até a realização do presente trabalho, não existia qualquer estudo ultraestrutural detalhado investigando as consequências da expressão reduzida do VAcHT sobre a morfologia de terminais nervosos colinérgicos, apesar das já mencionadas importantes alterações funcionais relatadas por outros pesquisadores do nosso grupo de pesquisa.

Dentre as diversas alterações cognitivas e funcionais apresentadas pelos animais VAcHT KD^{HOM} algumas foram de particular interesse para nós, como por exemplo, o fato desses animais apresentarem pronunciado comprometimento da transmissão sináptica neuromuscular, o que causava uma redução severa da força muscular e prejudicava o seu desempenho motor (Prado *et al.*, 2006). Adicionalmente, estes autores mostraram que o déficit de força podia ser melhorado através da administração prévia de inibidores da enzima acetilcolinesterase, no caso, a piridostigmina. Interessantemente, devido a suas características moleculares, esse fármaco não atravessa a barreira hemato-encefálica, revelando então que o déficit colinérgico periférico, causado pela alteração na transmissão neuromuscular seria a causa da disfunção neuromuscular (Prado *et al.*, 2006). Esses achados nos possibilitaram utilizar como modelo sináptico a JNM e também suscitar uma série de questionamentos sobre o aspecto morfológico dos terminais nervosos de sinapses neuromusculares. Então, diante da possibilidade de utilização dos animais com VAcHT KD^{HOM}, tornou-se de extremo interesse avaliar no plano ultraestrutural, possíveis alterações pré e pós-sinápticas da

JNM, tais como: da área dos terminais nervosos, do número de VSs e sua distribuição em relação às zonas ativas, da extensão das dobras juncionais pós-sinápticas e do aspecto morfológico das VSs. Além disso, nós também nos questionamos se a expressão reduzida do VAcHT e a consequente redução no armazenamento de ACh poderiam regular algum aspecto da reciclagem de VSs mediante diferentes paradigmas de estimulação pré-sináptica. Interessantemente, a presença de alguma destas alterações poderia contribuir para a disfunção neuromuscular desses animais, a qual até então estava associada apenas à redução da liberação de acetilcolina.

5.1. A expressão reduzida do VAcHT não compromete a morfologia da JNM de diafragma nos camundongos VAcHT KD^{HOM}

Neste estudo, inicialmente, nós investigamos o impacto da expressão reduzida da proteína VAcHT sobre o aspecto morfológico da JNM de diafragma de camundongos VAcHT KD^{HOM} adultos, na idade de 3 meses. Utilizando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, nós realizamos análises qualitativas e quantitativas dos elementos sinápticos de JNM dos animais VAcHT KD^{HOM} e encontramos que estas exibiam aparência geral normal, quando comparados aos VAcHT WT, considerando aspectos como: tamanho dos perfis de terminais pré-sinápticos, número total de vesículas por perfil de terminal e comprimento da membrana muscular pós-sináptica (figuras 21 e 22). No entanto, mesmo na ausência de estimulação, a expressão reduzida do VAcHT determinou uma marcante alteração na distribuição das VSs no interior dos terminais nervosos de diafragma (Figuras 23 e 24).

Durante o desenvolvimento, as JNMs passam por diversas alterações estruturais e funcionais, sendo mais dramáticas aquelas que acontecem após o nascimento (Witzemann, 2006). O terminal pré-sináptico arborizado e ramificado forma-se durante a segunda semana pós-natal em roedores, sendo que o crescimento muscular ocorre pelo aumento do comprimento e do diâmetro das fibras musculares e os terminais nervosos crescem simultaneamente com as fibras musculares durante este período, de tal forma que o aspecto morfológico das regiões pré e pós-sinápticas são correspondentes na idade adulta, apesar das diferenças estruturais e funcionais particulares de cada componente celular sináptico (Kelly and Zacks, 1969; Dahm and Landmesser, 1991; Sanes and Lichtman, 1999).

Na JNM colinérgica, o neurotransmissor ACh é o principal sinal neuronal que dispara respostas a partir dos receptores colinérgicos pós-sinápticos, do tipo nicotínico, e então regula a diferenciação pós-sináptica e coordena a maturação sináptica (Misgeld *et al.*, 2002; Witzemann, 2006; de Castro *et al.*, 2009 a). O papel regulatório da ACh durante o desenvolvimento da JNM colinérgica tem sido estudado através da geração de camundongos VACHT^{del/del} e também de camundongos *knockout* para o gene da enzima ChAT. Ambos os modelos animais exibem desenvolvimento anormal das JNMs, mostrando aumento no número de axônios e células de Schwann no nervo motor; aumento na ramificação intramuscular dos nervos desde o início da sinaptogênese; dilatação das zonas de placa terminal; diminuição no número e tamanho dos miotubos; sinais de necrose dos miotubos; profusão de receptores para acetilcolina na proximidade do terminal nervoso; múltiplos sítios sinápticos em miotubos individuais; hiperinervação de sítios sinápticos individuais e diminuição no número de dobras juncionais na membrana pós-sináptica (Misgeld *et al.*, 2002; Brandon *et al.*, 2003; de Castro *et al.*, 2009).

A formação da sinapse neuromuscular e a diferenciação final de sinapses maduras dependem da neurotransmissão (Misgeld *et al.*, 2002). A JNM madura normal apresenta características importantes que definem sua função, tais como o tamanho dos terminais nervosos, o acúmulo de VSs no terminal pré-sináptico, o qual leva a um aumento no conteúdo quântico liberado e o estabelecimento de grandes dobras pós-juncionais na membrana muscular subjacente ao terminal nervoso, que aumentam a área de superfície pós-sináptica, aumentando também a velocidade e a capacidade de resposta pós-sináptica à liberação do neurotransmissor (Sanes and Lichtman, 1999). Assim sendo, nossos resultados sugerem que a expressão reduzida de VACHT garante um nível mínimo de liberação de ACh, que é suficiente para manter o desenvolvimento e promover o estabelecimento normal das sinapses neuromusculares no diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM}.

5.2. A expressão reduzida do VACHT altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma dos animais VACHT KD^{HOM} após estimulação elétrica

Nós também investigamos a reciclagem e distribuição das VSs na JNM de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} após estimulação elétrica pré-sináptica aplicada via nervo frênico. Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão nós

avaliamos o aspecto morfológico dos terminais nervosos da JNM fixados imediatamente após a aplicação do estímulo. Nós observamos que não existia alteração no número total de VSs entre os terminais motores de diafragma de animais VACHT WT e VACHT KD^{HOM}, apesar de uma alteração na distribuição de VSs próximas às zonas ativas pré-sinápticas nestes últimos (Figuras 25, 26 e 27).

Prado e colaboradores (2006), utilizando a sonda vital, atividade-dependente, FM1-43, para monitorar reciclagem de VSs em terminais pré-sinápticos de diafragma de camundongos VACHT KD^{HOM} mostraram que as terminações motoras desses animais, após estímulo despolarizante por KCl, internalizavam FM1-43 em quantidade semelhante às de animais WT, de tal modo que não se observou diferença significativa na quantificação do sinal fluorescente entre os genótipos (Prado *et al.*, 2006). Tal resultado indicava que o número de VSs que reciclam durante estímulo despolarizante era equivalente para os dois genótipos. Além disso, a análise de desmarcação dos aglomerados vesiculares contendo FM1-43 demonstrou que a exocitose de VSs se processava praticamente com a mesma intensidade e mesma cinética quando são comparados os animais VACHT WT e VACHT KD^{HOM} (Prado *et al.*, 2006). Nossos resultados mostrando que o número total de VSs, após estimulação elétrica, não era diferente entre VACHT KD^{HOM} e VACHT WT corroboram os achados de Prado e colaboradores e, mais que isso, mostram de forma direta que estes autores estavam corretos ao sugerir um número semelhante de VSs, entre os genótipos, reciclando na JNM após estimulação.

De fato, muitos trabalhos na literatura relatam a ocorrência da reciclagem de VSs normal após alterações no conteúdo quântico de neurotransmissores. Cousin e Nicholls (1997) realizaram experimentos com neurônios granulares do cerebelo submetidas a tratamento com bafilomicina, agente inibidor da VH^+ -ATPase, e metilamina, uma base fraca que abole o componente ΔpH do gradiente eletroquímico transmembrana, o qual contribui para o armazenamento de neurotransmissores no interior das VSs. Eles observaram que a captação e liberação de FM1-43 após pulsos despolarizantes estavam preservadas mesmo nas células tratadas com os agentes acima citados, indicando que vesículas com conteúdo quântico reduzido ou abolido podem ser recicladas nas terminações axonais. Zhou e colaboradores (2000), utilizando técnica de eletrofisiologia, obtiveram resultados similares utilizando bafilomicina para romper o gradiente próton-eletroquímico de vesículas de terminações sinápticas de neurônios de hipocampo em cultura.

Em JNMs colinérgicas, a reciclagem de VSs, monitorada com a sonda FM1-43, ocorre em terminais estimulados mesmo na presença de vesamicol (inibidor do VACHT), mostrando que o transporte de ACh para as vesículas recicladas não é um requisito para o ciclo (Parsons *et al.*, 1999). Em outros estudos, Van der Kloot *et al.* (2000) e Hong (2001) observaram, por meio de estudo eletrofisiológico, a ocorrência de liberação de VSs com conteúdo quântico reduzido após pré-incubação de preparações de JNM com cloreto de amônio (o qual colapsa ΔpH), vesamicol, bafilomicina e concanamicina, esta última também promove inibição da VH^+ -ATPase.

Adicionalmente, Croft *et al.* (2005) através de experimentos utilizando as sondas FM1-43 e FM2-10 para monitorar a reciclagem de VSs em neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo de camundongos VMAT-2 *knockout*, demonstraram que as VSs submetem-se a endocitose e exocitose com cinética idêntica àquela observada em animais WT para o VMAT-2.

Com relação à distribuição das VSs após aplicação de estímulo elétrico (Figuras 26 e 27) e, mesmo na situação basal, ou seja, na ausência de estimulação (Figuras 23 e 24) é importante ressaltar que a JNM de vertebrados possui um aglomerado total de VSs de cerca de 500.000 vesículas (Rizzoli and Betz, 2005) e que, além das diferenças na localização espacial, nenhuma outra característica ultraestrutural distingue claramente os aglomerados de VSs dentro de um terminal pré-sináptico (Rizzoli and Betz, 2005; Alabi and Tsien, 2012). Neste contexto, alterações sutis na distribuição de VSs nos terminais nervosos de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} poderiam não ser percebidas durante a marcação com sondas fluorescentes, como o FM1-43, quando consideramos a existência de um aglomerado total de VSs tão amplo.

Um estudo interessante realizado por Kamin e colaboradores (2010) sugeriu que as VSs submetem-se a alterações, ou processos de maturação, que resultam na redução de sua mobilidade e de seu agrupamento em um aglomerado preexistente. Baseado nisso, nós sugerimos que uma alteração no número de cópias do VACHT por VS nos animais VACHT KD^{HOM} pode representar um estado imaturo das VSs colinérgicas e, então, torná-las menos móveis precocemente, resultando em uma redução no agrupamento das VS em aglomerados individuais e na interconversão de vesículas entre os aglomerados vesiculares (Südhof, 2000; Rizzoli and Betz, 2005; Alabi and Tsien, 2012).

Portanto, nossos resultados referentes à avaliação da reciclagem de VSs após estimulação elétrica, em conjunto com os relatados por Prado e colaboradores (2006),

mostram que uma diminuição da expressão do VAcHT, com consequente redução do conteúdo quântico de ACh nas vesículas não compromete a reciclagem e biogênese de VSs na JNM de diafragma. Adicionalmente, nossos dados levantam a possibilidade de participação do VAcHT nos processos de distribuição de VSs nos terminais pré-sinápticos.

5.3. A expressão reduzida do VAcHT compromete a reciclagem das VSs do RRP e altera a distribuição vesicular nos terminais motores de diafragma dos animais VAcHT KD^{HOM} após estimulação hipertônica

Um novo achado deste estudo relaciona-se com os nossos resultados usando solução hipertônica de sacarose para estimular a reciclagem de VSs a partir do RRP em terminais nervosos motores do músculo diafragma de camundongos com déficit colinérgico. Uma vez que os animais VAcHT KD^{HOM} não apresentam alteração na reciclagem de VSs do TRP, nós decidimos avaliar a reciclagem daquele aglomerado de VSs em particular, levando em consideração que as vesículas do RRP são as primeiras liberadas durante um impulso nervoso (Rosenmund and Stevens, 1996).

É descrito na literatura que as soluções hipertônicas extracelulares aumentam a frequência de MEPPs na JNM de vertebrados (Fatt and Katz, 1952; Hubbard *et al.*, 1968; Kita and Van der Kloot, 1977; Cheng and Miyamoto, 1999). Embora os mecanismos subjacentes a tal aumento de frequência sejam desconhecidos, existem evidências sugestivas de que esta forma de estimulação não requer influxo de Ca²⁺ ou liberação a partir de estoques intracelulares e que, portanto, consiste de um estímulo para liberação de neurotransmissores, independente de cálcio, que mobiliza especificamente o RRP (Rosenmund and Stevens, 1996; Sara *et al.*, 2002).

Inicialmente nós avaliamos a frequência e amplitude de MEPPs na JNM dos animais VAcHT KD^{HOM} durante a aplicação de solução hipertônica (500 mM) e comparamos com aquelas avaliadas para os VAcHT WT. Nós encontramos que as fibras musculares do diafragma dos camundongos VAcHT KD^{HOM} exibiam frequência e amplitude de MEPPs reduzidas durante a estimulação hipertônica (Figura 28).

Nossos resultados das análises eletrofisiológicas, portanto, mostravam que os terminais nervosos dos animais VAcHT KD^{HOM} liberavam VSs do RRP que não estavam completamente preenchidas com neurotransmissores ou talvez, até mesmo vazias, considerando que na condição da expressão reduzida do VAcHT algumas

vesículas poderiam ocasionalmente não conter este transportador em sua membrana e, então, seriam incapazes de sustentar a liberação de ACh (Prado *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010). Contudo, conforme já mostrado neste trabalho e também por Prado *et al.* (2006), a reciclagem das VSs do TRP na JNM de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} é normal, independente do seu nível de preenchimento com neurotransmissor. Então é provável que as vesículas vazias estejam competindo com as cheias pelos sítios de liberação pré-sinápticos (Lima *et al.*, 2010), o que resultaria nas alterações eletrofisiológicas encontradas por nós e por outros autores (Prado *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010). Entretanto, levando em consideração que nossos resultados de frequência e amplitude de MEPPs são referentes apenas às vesículas do RRP, é possível que além da competição vesicular, também haja um comprometimento da reciclagem das vesículas deste aglomerado, o que até então não havia sido investigado.

Para testar esta hipótese nós avaliamos a reciclagem das VSs do RRP após estimulação hipertônica com sacarose, utilizando a sonda fluorescente FM1-43 fx e também através da microscopia eletrônica de transmissão. Nós observamos que os terminais pré-sinápticos de diafragma dos animais VACHT KD^{HOM} apresentavam uma redução na intensidade de marcação com o FM1-43 (Figuras 29 e 30), o que era compatível com a redução no número total de VSs revelada pela análise ultraestrutural das JNMs destes camundongos quando comparados aos VACHT WT (Figura 31). Estes resultados sugerem, portanto, que pelo menos para a estimulação hipertônica com sacarose, a redução na frequência e amplitude de MEPPs não ocorre somente pela competição entre VSs cheias ou vazias (Lima *et al.*, 2010), mas também por um considerável comprometimento da reciclagem de VSs a partir do RRP.

Recentemente tem sido mostrado que a endocitose compensatória de VSs pode ocorrer após exocitose disparada de forma independente de cálcio, como por exemplo, por estimulação hipertônica de sacarose (Yao *et al.*, 2012). Contudo, na ausência de influxo de cálcio, o tempo de endocitose é mais lento que sob condições normais de liberação induzida por este íon (Hosoi *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2012). Alguns estudos das últimas décadas vêm apontando diversas proteínas como possíveis sensores de cálcio para endocitose, incluindo a sinaptotagmina (Zhang *et al.*, 1994), a qual parece ter dois papéis distintos, um como sensor de cálcio que dispara a exocitose rápida e sincronizada e outro como um sensor de cálcio que acelera a endocitose (Yao *et al.*, 2012).

Adicionalmente, nossos dados ultraestruturais também mostram uma distribuição alterada das VSs próximas às zonas ativas nos terminais nervosos dos animais VACHT KD^{HOM}, quando estimulados hipertonicamente (Figura 32), sugerindo um defeito na mobilização de VSs nos terminais pré-sinápticos de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} comparados aos WT também durante essa forma de estimulação. Além da possibilidade das VSs nos terminais nervosos de VACHT KD^{HOM} sinalizarem um estado imaturo na gênese vesicular em decorrência da alteração no número de cópias deste transportador em sua membrana e isso reduzir sua mobilidade e/ou agrupamento e/ou interconversão entre os aglomerados (Kamin *et al.*, 2010; Südhof, 2000; Rizzoli and Betz, 2005; Alabi and Tsien, 2012), outra possibilidade para explicar as alterações na distribuição de VSs nos terminais nervosos de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} observadas em nosso estudo relaciona-se com o fato de que alterações na expressão da proteína VACHT poderiam prejudicar a interação deste com outras proteínas que regulam a mobilidade das vesículas e, portanto, comprometer a formação dos aglomerados vesiculares ou resultar na dispersão de vesículas.

Adicionalmente, a alteração na expressão de proteínas presentes na membrana das VSs que participam dos processos de ancoramento de vesículas nas zonas ativas e também com o citoesqueleto neuronal comprometem a ancoragem e distribuição das vesículas nos terminais nervosos. Camundongos *knockout* para o gene da proteína rab3A, a qual participa da ancoragem de VSs nas zonas ativas pré-sinápticas por interagir com proteínas desta região, apresentam redução no número de VSs próximas às zonas ativas dos terminais motores de músculo diafragma, ou seja, aquelas que compõem o *Readily Releasable Pool* e o *Recycling Pool* (Coleman *et al.*, 2007; Coleman and Bykhovskaia, 2010). Por outro lado, camundongos *knockout* para o gene das proteínas sinapsina I e II, que ligam as VSs a filamentos de actina, apresentam reduzido número de vesículas localizadas distantes das zonas ativas pré-sinápticas, aquelas que formam o *Resting Pool* (Li *et al.*, 1995; Samigullin *et al.*, 2004; Coleman and Bykhovskaia, 2010; Akbergenova and Bykhovskaia, 2010; Bykhovskaia, 2011). Neste contexto é possível pensar que o VACHT pode interagir diretamente com outras proteínas do terminal nervoso, quer sejam das zonas ativas pré-sinápticas ou do citoesqueleto, de tal forma que, uma redução na expressão deste transportador interfira com a distribuição de VSs nos terminais nervosos da JNM de diafragma.

Estudos futuros serão necessários para focar sobre o mecanismo de interação entre VACHT e outras proteínas pré-sinápticas e/ou de VSs e as consequências da

expressão reduzida deste transportador sobre a formação e distribuição dos aglomerados vesiculares nos terminais nervosos dos camundongos VACHT KD^{HOM}.

5.4. O conteúdo quântico de ACh determina o aspecto morfológico das VSs, enquanto a expressão reduzida do VACHT afeta a distribuição vesicular em terminais nervosos de músculo diafragma

Outro achado importante deste trabalho diz respeito às alterações observadas no aspecto morfológico das VSs nas JNM de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM}. Durante a realização deste trabalho uma característica ultraestrutural marcante dos terminais pré-sinápticos das JNM de diafragma dos animais VACHT KD^{HOM} que nos chamou a atenção foi a presença constante e acentuada de VSs com formato pleomórfico nos terminais nervosos destes animais quando comparadas com aquelas de VACHT WT (Figura 33).

Considerando que os animais VACHT KD^{HOM} apresentam uma redução no número de cópias do transportador na membrana das VSs e reduzido conteúdo quântico de ACh (Lima *et al.*, 2010), nós hipotetizamos que as alterações na forma das VSs seria uma consequência da diminuição do preenchimento com ACh. Para testar esta hipótese, nós avaliamos, utilizando MET, a circunferência e o formato das VSs dos terminais nervosos de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} e VACHT WT estimulados eletricamente e comparamos com aquelas dos terminais de animais WT submetidos à estimulação elétrica e tratados com vesamicol (Marshall, 1970; Anderson *et al.*, 1983; Prado *et al.*, 1993). Além disso, nós também avaliamos o número total e a distribuição das VSs nos terminais de WT tratados com vesamicol e comparamos com aqueles de VACHT KD^{HOM} não tratados.

As análises ultraestruturais revelaram que a inibição farmacológica do VACHT não alterava a quantidade total e a distribuição das VSs (Figura 34 e 35), no entanto, ela influenciava o aspecto morfológico das VSs (Figura 36). O resultado de distribuição de VSs após inibição do VACHT com vesamicol fortaleceu nossa suspeição de que a alteração na expressão do VACHT pudesse representar um estado vesicular imaturo e, por consequência, comprometer sua distribuição nos aglomerados vesiculares (Kamin *et al.*, 2010). Considerando que as VSs têm uma função muito precisa, é provável que existam mecanismos que assegurem a inclusão de todos os componentes de membrana necessários nas vesículas nascentes. Embora algumas proteínas estejam presentes em

grandes quantidades nas VSs, outras estão representadas por apenas uma cópia, gerando um equilíbrio adequado e sugerindo a existência de mecanismos de verificação durante a reconstituição das VSs para garantir que todos os componentes importantes sejam incluídos para a geração de VSs maduras (Takamori *et al.*, 2006; Saheki and De Camilli, 2012). Assim sendo, a presença do número correto de cópias de VACHT na membrana poderia ser um ponto de sinalização crucial para correta formação e distribuição das VSs. Entretanto, estudos futuros serão necessários para o melhor esclarecimento da relação entre maturidade vesicular, expressão de VACHT e distribuição vesicular, pois ainda nem mesmo sabemos qual o número de cópias deste transportador existe de fato na membrana das VSs.

Com respeito às alterações morfológicas das VSs, a relação entre o tamanho destas e alterações no conteúdo quântico de ACh tem sido investigada por outros pesquisadores. Budzinski *et al.* (2009) utilizando VSs purificadas de cérebro de rato ou camundongo mostraram que, na presença de solução tampão contendo ATP e glutamato o preenchimento das vesículas era aumentado e isso causava um aumento no tamanho das mesmas. Em outro trabalho, Fremeau *et al.* (2004 a) relataram que VSs de neurônios glutamatérgicos de hipocampo de camundongos VGLUT-1 *knockout* apresentavam aspecto morfológico alongado. Entretanto, VSs de neurônios dopaminérgicos de camundongos VMAT-2 *knockout* não apresentam alterações de tamanho ou forma (Croft *et al.*, 2005).

Van der Kloot e colaboradores (2002) realizando experimentos utilizando solução hipertônica de gluconato e aspartato, para aumentar o conteúdo de ACh nas VSs em JNM de rã, mostraram um aumento no tamanho dos MEPPs, que não foi acompanhado por alterações no tamanho das VSs (Van der Kloot *et al.*, 2002). Adicionalmente, o tamanho das vesículas não foi substancialmente diminuído quando o conteúdo quântico foi reduzido pelo tratamento com hemicolínio (inibidor da captação de colina) ou NH_4^+ (o qual diminui o gradiente de prótons necessário para captação de ACh para as VSs). Contudo, o tratamento com vesamicol induziu uma redução no tamanho das vesículas (Van der Kloot *et al.*, 2002), o que concorda com os nossos achados referentes ao tamanho das VSs nos terminais nervosos de diafragma dos camundongos VACHT KD^{HOM} não tratados e WT tratados com vesamicol (Figura 36). Interessantemente, Van der Kloot e colaboradores (2002) sugeriram que o vesamicol pode estar alterando o tamanho das VSs por um mecanismo que não seja a inibição do VACHT, mas nossos dados mostram alterações na circunferência e formato das VSs nos

terminais nervosos dos camundongos VACHT KD^{HOM} não tratados e WT tratados com vesamicol, indicando que, pelo menos para JNM de camundongos estas alterações podem estar relacionadas com a quantidade e/ou atividade do VACHT na membrana da VSs.

Para transportar acetilcolina, o VACHT utiliza um gradiente eletroquímico gerado por bombas de prótons presentes na membrana vesicular, as V^H⁺-ATPases, as quais translocam prótons H⁺ para o interior das VSs, por meio da hidrólise do ATP (Liu and Edwards, 1997; Ozkan and Ueda, 1997; Nguyen *et al.*, 1998; Parsons, 2000; Prado *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2013). O VACHT realiza, então, a troca de dois íons H⁺ por uma molécula de ACh, preenchendo o interior das vesículas com o neurotransmissor (Nguyen and Parsons, 1995; Nguyen *et al.*, 1998, Van der Kloot, *et al.*, 2002). Dessa forma, uma alteração na quantidade e/ou atividade do VACHT poderia impactar sobre a troca de prótons, alterando a tonicidade no interior das vesículas e induzindo alterações morfológicas nestas. De fato, recentemente foi relatado que a utilização de fixadores aldeídicos induz achatamento de VSs em sinapses hipocâmpais de camundongos *knockout* para VGLUT1, devido a uma alteração na tonicidade das VSs excitatórias (Siksou *et al.*, 2013). Portanto, nós sugerimos que em vesículas colinérgicas a expressão e a atividade normais do VACHT também são importantes para a manutenção da tonicidade e aspecto morfológico das VSs nos terminais nervosos das JNM de diafragma.

Embora nossos resultados sugiram que o conteúdo vesicular de ACh interfere com o aspecto morfológico das VSs, nós não podemos descartar a possibilidade de que a redução no número ou na atividade do VACHT, em nosso modelo experimental, também pode afetar a forma das vesículas. A remoção de componentes da membrana vesicular, tais como o colesterol, não altera o formato das VSs, embora altere consideravelmente a circunferência destas na JNM de rã (Rodrigues *et al.*, 2013). Além disso, um aumento ou uma redução na expressão de VGLUT em JNM de *Drosophila* induz um aumento ou diminuição no diâmetro das VSs, respectivamente (Daniels *et al.*, 2004; Daniels *et al.*, 2006).

Adicionalmente, o aspecto morfológico das VSs também pode ser definido após a endocitose mediada por capa de clatrina (Zhang *et al.*, 1998; Nonet *et al.*, 1999; Petralia *et al.*, 2013). Considerando que o VACHT interage com as proteínas adaptadoras de clatrina, especialmente a AP-2, a qual reconhece sítios baseados em dileucinas presentes no VACHT (Barbosa Jr *et al.*, 2002; Prado and Prado, 2002; Kim and

Hersh, 2004; Ferreira *et al.*, 2005), a expressão reduzida deste transportador poderia comprometer o número de sítios necessários para a conexão adequada entre eles. Interessantemente, VSs reconstituídas após estimulação intensa são frequentemente mais heterogêneas em tamanho que aquelas de terminais em repouso ou submetidos à estimulação suave (Ferguson *et al.*, 2007). Então, após um estímulo forte a fidelidade da reconstituição das VSs pode ser parcialmente perdida e um novo ciclo de exocitose e endocitose mediada por clatrina pode ser necessário para reconstituir VSs de tamanho e composição bem definidos (Saheki and De Camilli, 2012).

Considerando que a intensidade de estimulação foi idêntica entre VACHT WT tratado, VACHT KD^{HOM} tratado e WT não tratado, alterações no formato da vesícula podem, de fato, apontar para um comprometimento na interação entre VACHT e clatrina e seus adaptadores. Portanto, é possível que alterações no aspecto morfológico das VSs dos terminais nervosos dos camundongos VACHT KD^{HOM} possam estar relacionadas a um defeito no modelamento das vesículas durante os eventos de endocitose mediada por clatrina. Uma possibilidade intrigante consiste no fato de que essas alterações na circunferência e formato das VSs, que nós observamos nos animais VACHT KD^{HOM}, podem ser a razão para reciclagem alterada das VSs no RRP, observada nestes camundongos.

Finalmente, nossos dados mostram que a redução na expressão do VACHT tem um importante papel na reciclagem e mobilização de aglomerados específicos de VSs na JNM. Nós sugerimos que a redução do conteúdo quântico de ACh é importante para definir o aspecto morfológico das VSs, enquanto que os níveis da proteína VACHT na membrana vesicular são importantes para definir a distribuição das VSs no interior dos terminais nervosos das JNMs de diafragma. Nossos resultados também sugerem que as alterações funcionais causadas pela deficiência de VACHT (Prado *et al.*, 2006; Guzman *et al.*, 2011; Martyn *et al.*, 2012) podem envolver múltiplos mecanismos, incluindo uma diminuição no armazenamento de neurotransmissores, adicional aos déficits na reciclagem e mobilização das VSs do RRP. Estudos futuros serão necessários para esclarecer a relação entre a expressão do VACHT e a regulação da mobilidade das VSs em sinapses neuromusculares.

Como já mencionado neste estudo, existem quatro tipos de SMC humana já identificados, caracterizados por: deficiência de ChAT; escassez de VSs com redução da liberação quantal de ACh; síndrome congênita semelhante à doença de Lambert-Eaton, e; SMC com liberação quântica de ACh reduzida devido a um mecanismo ainda não

definido (Bady *et al.*, 1987; Engel *et al.*, 2002; Engel, 2012). Sabendo que os animais VACHT KD^{HOM} apresentam uma alteração genética pré-sináptica, que determina a expressão reduzida do VACHT e, conseqüentemente, redução da liberação quântica de ACh (Prado *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2010), além de comprometimento da reciclagem das VSs do RRP, alteração na distribuição e aspecto morfológico das VSs é razoável pensar que deficiências na expressão e ou atividade do VACHT poderiam contribuir efetivamente para os processos fisiopatológicos envolvidos nas SMC em humanos e também em outras doenças neurodegenerativas. De fato, a importância do VACHT no estabelecimento de desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, foi recentemente relatada em um estudo que mostrou uma redução significativa nos níveis de RNAm e da própria proteína VACHT em amostras de córtex cerebral de pacientes com esta doença (Chen *et al.*, 2011). Portanto, nossos dados podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, tendo o VACHT como um importante alvo para futuras intervenções em pacientes com SMC.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusão

De forma inédita, nós estudamos as alterações morfológicas de JNM de camundongos que apresentam redução na expressão do VACHT (VACHT KD^{HOM}) e, por consequência, apresentam menor quantidade de ACh liberada em resposta à atividade neuronal. Em conjunto, nossos resultados sugerem que uma liberação mínima de ACh garantida pela expressão reduzida do VACHT é suficiente para manter a ontogênese e a biogênese normal das sinapses neuromusculares nos camundongos VACHT KD^{HOM}. Entretanto, a redução na expressão do VACHT e, por consequência, nos níveis desta proteína na membrana vesicular influencia a distribuição de VSs nos terminais motores de diafragma e pode comprometer a reciclagem de um aglomerado de vesículas específico, o RRP, envolvidas na liberação de neurotransmissores evocada por sacarose, as quais reciclam de forma independente de cálcio, similarmente ao que acontece na liberação espontânea de neurotransmissores. Adicionalmente, nossos dados sugerem que o conteúdo quântico de ACh é importante para definir o aspecto morfológico das VSs na JNM de camundongos, não descartando a possibilidade de que a alteração na expressão do VACHT também pode colaborar para a alteração na forma das VSs, por reduzir a quantidade desta proteína na membrana das vesículas e comprometer o acoplamento da clatrina e seus adaptadores, prejudicando o modelamento das VSs nos terminais motores de diafragma de camundongos VACHT KD^{HOM} durante a endocitose. Finalmente, nossos dados mostram que, embora sutis, as alterações encontradas são suficientes para comprometer a neurotransmissão na JNM e, por consequência, podem prejudicar a função muscular nos animais VACHT KD^{HOM}.

7. REFERÊNCIAS

7. Referências

AKBERGENOVA, Y.; BYKHOVSKAIA, M. Synapsin regulates vesicle organization and activity-dependent recycling at *Drosophila* motor boutons. **Neuroscience**, v.170, n.2, p.441-452, 2010.

ALABI, AR. A.; TSIEN, R. W. Synaptic Vesicle Pools and Dynamics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.4, n.8, p.1–18, 2012.

ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F.; ALKONDON, M.; ROGERS, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v.89, n.1, p.73-120, 2009.

ANDERSON, D. C.; KING, S. C.; PARSONS, S. M. Pharmacological characterization of the acetylcholine transport system in purified Torpedo electric organ synaptic vesicles. **Molecular Pharmacology**, v.24, n.1, p.48-54, 1983.

BADY, B.; CHAUPLANNAZ, G.; CARRIER, H. Congenital Lambert-Eaton myasthenic syndrome. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.50, p.476-478, 1987.

BARBOSA, J. Jr.; FERREIRA, L. T.; MARTINS-SILVA, C.; SANTOS, M. S.; TORRES, G. E.; CARON, M.G.; GOMEZ, M. V.; FERGUSON, S. S.; PRADO, M. A.; PRADO, V. F. Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. **Journal of Neurochemistry**, v.82, n.5, p.1221–1228, 2002.

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

BECHERER, U.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W. J. Effects of Staurosporine on Exocytosis and Endocytosis at Frog Motor Nerve Terminals. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n.3, p.782–787, 2001.

BENNETT, M. R.; PETTIGREW, A.G. The Formation of Synapses in Striated Muscle During Development. **The Journal of Physiology**, v.241, n.2, p.515-545, 1974.

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

BIRKS, R.; MACINTOSH, F. C. Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.39, n.4, p.787-827, 1961.

BLAKELY, R. D.; EDWARDS, R. H. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012; 4 (2):a005595.

BRANDON, E. P.; LIN, W.; D'AMOUR, K. A.; PIZZO, D. P.; DOMINGUEZ, B.; SUGIURA, Y.; THODE, S.; KO, C. P.; THAL, L. J.; GAGE, F. H.; LEE, K. F. Aberrant Patterning of Neuromuscular Synapses in Choline Acetyltransferase-Deficient Mice. **The Journal of Neuroscience**, v.23, n.2, p.539 –549, 2003.

BRAVO, D.; PARSONS, S. M. Microscopic kinetics and structure-function analysis in the vesicular acetylcholine transporter. **Neurochemistry International**, v.41, p.285–289, 2002.

BUDZINSKI, K. L.; ALLEN, R. W.; FUJIMOTO, B. S.; KENSEL-HAMMES, P.; BELNAP, D. M.; BAJJALIEH, S. M.; CHIU, D. T. Large Structural Change in Isolated Synaptic Vesicles upon Loading with Neurotransmitter. **Biophysical Journal**, v.97, p. 2577–2584, 2009.

BYKHOVSKAIA, M. Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.22, n.4, p.387-392, 2011.

CAPETTINI, S. B.; MORAES, M. F. D.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. M.; PEREIRA, G.S. Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice show sexual dimorphism on memory. **Brain Research Bulletin**, v.85, p.54–57, 2011.

CARR, C. M.; RIZO, J. At the junction of SNARE and SM protein function. **Current Opinion in Cell Biology**, v.22, n.4, p.488-495, 2010.

CECCARELLI, B.; HULBURT, W. P.; MAURO, A. Turnover of Transmitter and Synaptic Vesicles at the Frog Neuromuscular Junction. **The Journal of Cell Biology**, v.57, p.499–524, 1973.

CHAPMAN, E. R. How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 615–41, 2008.

CHEN, K. H.; REESE, E. A.; KIM, H-W.; RAPOPORT, S. I.; RAO, J. S. Disturbed Neurotransmitter Transporter Expression in Alzheimer Disease Brain. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.26, n.4, p.755-766. 2011.

CHENG, H.; MIYAMOTO, M. D. Effect of hypertonicity on augmentation and potentiation and on corresponding quantal parameters of transmitter release. **Journal of Neurophysiology**, v.81, n.3, p.1428-1431, 1999.

COLEMAN, W. L.; BILL, C. A.; BYKHOVSKAIA, M. RAB3A deletion reduces vesicle docking and transmitter release at the mouse diaphragm synapse. **Neuroscience**, v.148, p.1–6, 2007.

COLEMAN, W. L.; BILL, C. A.; SIMSEK-DURAN, F.; LONART, G.; SAMIGULLIN, D.; BYKHOVSKAIA, M. Synapsin II and calcium regulate vesicle docking and the cross-talk between vesicle pools at the mouse motor terminals. **The Journal of Physiology**, v.586, n.19, p.4649-4673, 2008.

COLEMAN, W. L.; BYKHOVSKAIA, M. Cooperative regulation of neurotransmitter release by Rab3a and synapsin II. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v.44, n.2, p.190-200, 2010.

COMERFORD, P. T.; FITZGERALD, J. T. Motor innervations of rodent diaphragm. **Journal of Anatomy**, v.149, p.171-175, 1986.

CONTI-FINE, B. M.; MILANI, M.; KAMINSKI, H. J. Myasthenia gravis: past, present and future. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.11, p.2843-2854, 2006.

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

COUTEAUX, R. Remarks on the organization of axon terminals in relation to secretory processes at synapses. **Advances in Cytopharmacology**, v. 2, p.369–79, 1974.

COYLE, J. T.; PRICE, D. L.; DeLONG M. R. Alzheimer's Disease: A Disorder of Cortical Cholinergic Innervation. **Science**, v.219, p.1184–1190, 1983.

CROFT, B. G.; FORTIN, G. D., CORERA, A. T.; EDWARDS, R. H.; BEAUDET, A.; TRUDEAU, L. E.; FON, E. A. Normal biogenesis and cycling of empty synaptic vesicles in dopamine neurons of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 1, p. 306–315, 2005.

D'HOEDT, D.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: an overview on drug discovery. **Expert opinion on Therapeutic Targets**, v.13, n.4, p.395-411, 2009.

DAHM, L. M.; LANDMESSER, L. T. The Regulation of Synaptogenesis during Normal Development and Following Activity Blockade. **The Journal of Neuroscience**, v.11, n.1, p.238–255, 1991.

DAJAS-BAILADOR, F.; WONNACOTT, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n.6, p.317-324, 2004.

DANIELS, R. W.; COLLINS, C. A.; GELFAND, M. V.; DANT, J.; BROOKS, E. S.; KRANTZ, D. E.; DiANTONIO, A. Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decreased in quantal content. **The Journal of Neuroscience**, v.24, n.46, p.10466-10474, 2004.

DANIELS, R. W.; COLLINS, C. A.; CHEN, K.; GELFAND, M. V.; FEATHERSTONE, D. E.; DiANTONIO, A. A Single Vesicular Glutamate Transporter Is Sufficient to Fill a Synaptic Vesicle. **Neuron**, v.49, p.11–16, 2006.

DE CASTRO, B. M.; DE JAEGER, X.; MARTINS-SILVA, C.; LIMA, R. D.; AMARAL, E.; MENEZES, C.; LIMA, P.; NEVES, C. M.; PIRES, R. G.; GOULD, T. W.; WELCH, I.; KUSHMERICK, C.; GUATIMOSIM, C.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; RYLETT, R. J.; GOMEZ, M. V.; CARON, M. G.; OPPENHEIM, R. W.; PRADO, M. A.; PRADO, V. F. The Vesicular Acetylcholine Transporter is Required for Neuromuscular Development and Function. **Molecular and Cellular Biology**, v.29, n.19, p.5238–5250, 2009 a.

DE CASTRO, B. M.; PEREIRA, G. S.; MAGALHÃES, V.; ROSSATO, J. I.; DE JAEGER, X.; MARTINS-SILVA, C.; LELES, B.; LIMA, P.; GOMEZ, M. V.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. M. Reduced Expression of the Vesicular Acetylcholine Transporter Causes Learning Deficits in Mice. **Genes, Brain and Behavior**, v.8 ,p.23–35, 2009 b.

DE ROBERTIS, E. D.; BENNETT, H. S. Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v.1, n.1, p.47-58, 1995.

DE SAINT BASILE, G.; MÉNASCHÉ, G.; FISCHER, A. Molecular Mechanisms of Biogenesis and Exocytosis of Cytotoxic Granules. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n.8, p.568–579, 2010.

DECHIARA, T. M.; BOWEN, D. C.; VALENZUELA, D. M.; SIMMONS, M. V.; POUYMIROU, W. T.; THOMAS, S.; KINETZ, E.; COMPTON, D. L.; ROJAS, E.; PARK, J. S.; SMITH, C.; DISTEFANO, P.S.; GLASS, D.J.; BURDEN, S.J.; YANCOPOULOS, G. D. The Receptor Tyrosine Kinase MuSK is Required for Neuromuscular Junction Formation In Vivo. **Cell**, v.85, p.501–512, 1996.

DENKER, A.; KRÖHNERT, K.; BÜCKERS, J.; NEHER, E.; RIZZOLI, S. O. The reserve pool of synaptic vesicles acts as a buffer for proteins involved in synaptic vesicle recycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.108, n.41, p.17183-17188, 2011.

ENGEL, A. G. **The neuromuscular junction**. Handbook of Clinical Neurology, Vol. 91 (3rd series). Chapter 3. Neuromuscular junction disorders. Elsevier. B.V. 2008.

ENGEL, A. G. Congenital Myasthenic Syndromes in 2012. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.12, p.92-101, 2012.

ENGEL, A. G.; OHNO, K.; SINE, S. M. The Spectrum of Congenital Myasthenic Syndromes. **Molecular Neurobiology**, v.26, n.2-3, p. 347-367, 2002.

ENGEL, A. G.; OHNO, K.; SINE, S. M. Congenital myasthenic syndromes: A diverse array of molecular targets. **Journal of Neurocytology**, v.32, p.1017–1037, 2003.

ERICKSON, J. D.; SCHAFFER, M. K.; BONNER, T. I.; EIDEN, L. E.; WEIHE, E. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.10, p.5166-5171, 1996.

FARSAD, K.; DE CAMILLI, P. Neurotransmission and the Synaptic Vesicle Cycle. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.75, p.261-284, 2002.

FATT, P.; KATZ, B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. **The Journal of Physiology**, v.117, n.1, p.109-128, 1952.

FERGUSON, S. M.; BRASNJO, G.; HAYASHI, M.; WOLFEL, M.; COLLESI, C.; GIOVEDI, S.; RAIMONDI, A.; GONG, L. W.; ARIEL, P.; PARADISE, S.; O'TOOLE, E.; FLAVELL, R.; CREMONA, O.; MIESENBOECK, G.; RYAN, T. A.; DE CAMILLI, P. A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. **Science**, v.316, n.5824, p.570-574, 2007.

FERGUSON, S. M.; DE CAMILLI, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.13, n.2, p.75-88, 2012.

FERNANDEZ-ALFONSO, T.; RYAN, T. A. A heterogeneous "resting" pool of synaptic vesicles that is dynamically interchanged across boutons in mammalian CNS synapses. **Brain Cell Biology**, v.36, n.1-4, p.87-100, 2008.

FERREIRA, L. T.; SANTOS, M. S.; KOLMAKOVA, N. G.; KOENEN, J.; BARBOSA, J. Jr.; GOMEZ, M. V.; GUATIMOSIM, C.; ZHANG, X.; PARSONS, S. M.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. Structural requirements for steady-state localization of the vesicular acetylcholine transporter. **Journal of Neurochemistry**, v.94, n.4, p.957-969, 2005.

FESCE R.; GROHOVAZ, F.; VALTORTA, F.; MELDOLESI, J. Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? **Trends in Cell Biology**, v.4, n.1, p.1-4, 1994.

FREDJ, N. B.; BURRONE, J. A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. **Nature Neuroscience**, v.12, n.6, p.751-758, 2009.

FREMEAU, Jr, R. T.; KAM, K.; QUERSHI, T.; JOHNSON, J.; COPENHAGEN, D. R.; STORM-MATHISEN, J.; CHAUDHRY, F. A.; NICOLL, R. A.; EDWARDS, R. H. Vesicular glutamate transporter 1 e 2 target to functionally distinct synaptic release sites. **Science**, v. 304, n. 5678, p. 1815-1819, 2004 a.

FREMEAU Jr, R. T.; VOGLMAIER, S.; SEAL, R. P.; EDWARDS, R. H. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. **Trends in Neuroscience**, v.27, n.2, p.98-103, 2004 b.

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

GAUTAM, M.; NOAKES, P. G.; MUDD, J.; NICHOL, M.; CHU, G. C.; SANES, J. R.; MERLIE, J. P. Failure of Postsynaptic Specialization to Develop at Neuromuscular Junctions of Rapsyn-deficient Mice. **Nature**, v.377, p.232–236, 1995.

GELMAN, J. S.; FRICKER, L. D. Hemopressin and other bioactive peptides from cytosolic proteins: are these non-classical neuropeptides? **The AAPS Journal**, v.12, n.3, p.279-289, 2010.

GOTTI, C.; ZOLI, M.; CLEMENTI, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.27, n.9, p.482-491, 2006.

GUIDINE, P. A. M.; REZENDE, G. H. S.; QUEIROZ, C. M. T.; MELLO, L. E.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. M.; PEREIRA, G. S.; MORAES, M. F. D. Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice are more susceptible to pilocarpine induced status epilepticus. **Neuroscience Letters**, v.436, p.201–204, 2008.

GUNDELFINGER, E. D.; KESSELS, M. M.; QUALMANN, B. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.4, p.127-139, 2003.

GUZMAN, M. S.; De JAEGER, X.; RAULIC, S.; SOUZA, I. A.; LI, A. X.; SCHMID, S.; MENON, R. S.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G.; BARTHA, R.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the striatum reveals regulation of behaviour by cholinergic-glutamatergic co-transmission. **PLoS Biology**, v.9, n.11: e1001194. doi: 10.1371/journal.pbio.1001194. Epub 2011.

HALL, Z. W. **An Introduction to Molecular Neurobiology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 1992.

HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell/Neuron**, suplemento 72/10, p.99–121, 1993.

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

HAN, Y.; KAESER, P. S.; SÜDHOF, T. C.; SCHNEGGENBURGER, R. RIM Determines Ca²⁺ Channel Density and Vesicle Docking at the Presynaptic Active Zone. **Neuron**, v.69, p.304–316, 2011.

HARLOW, M. L.; RESS, D.; STOSCHEK, A.; MARSHALL, R. M.; MCMAHAN, U. J. The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. **Nature**, v. 409, n. 6819, p.479-84, 2001.

HEUSER, J. E.; REESE T. S. Evidence For Recycling of Synaptic Vesicle Membrane During Transmitter Release at the Frog Neuromuscular Junction. **The Journal of Cell Biology**, v.57, p.315–344, 1973.

HONG, S. J. Reduction of quantal size and inhibition of neuromuscular transmission by bafilomycin A. **Neuropharmacology**, v.41, n.5, p.609-17, 2001.

HOSOI, N.; HOLT, M.; SAKABA, T. Calcium dependence of exo- and endocytotic coupling at a glutamatergic synapse. **Neuron**, v.63, n.2, p.216-229, 2009.

HUA, Y.; SINHA, R.; MARTINEAU, M.; KAHMS, M.; KLINGAUF, J. A common origin of synaptic vesicles undergoing evoked and spontaneous fusion. **Nature Neuroscience**, v.13, n.12, p.1451-1453, 2010.

HUA, Z.; LEAL-ORTIZ, S.; FOSS, S. M.; WAITES, C. L.; GARNER, C. C.; VOGLMAIER, S. M.; EDWARDS, R. H. v-SNARE composition distinguishes synaptic vesicle pools. **Neuron**, v.71, n.3, p.474-487, 2011.

HUBBARD, J. I.; JONES, S. F.; LANDAU, E. M. An examination of the effects of osmotic pressure changes upon transmitter release from mammalian motor nerve terminals. **The Journal of Physiology**, v.197, n.3, p.639-657, 1968.

JESSELL, T. M.; KANDEL, E. R. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. **Cell**, v.72, suplemento: 1-30, 1993.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principios de Neurociencia**. 4^a ed. Manole, 2003, 992 p.

KAMIN, D.; LAUTERBACH, M. A.; WESTPHAL, V.; KELLER, J.; SCHÖNLE, A.; HELL, S. W.; RIZZOLI, S. O. High- and low-mobility stages in the synaptic vesicle cycle. **Biophysical Journal**, v.99, n.2, p.675-684, 2010.

KATZ, B.; MILEDI, R. Propagation of Electric Activity in Motor Nerve Terminals. **Proceedings of the Royal Society of London, Séries B**, v.161, p.453-482, 1965.

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

KATZ, B.; MILEDI, R. Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. **The Journal of Physiology**, v.203, n.2, p.459-487, 1969.

KATZ, B. Quantal Mechanism of Neural Transmitter Release. **Science**, v.173, p.123-126, 1971.

KELLY, A. M.; ZACKS, S. I. The Fine Structure of Motor Endplate Morphogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v.42, n.1, p.154-69, 1969.

KIM, M-H.; HERSH, L. B. The Vesicular Acetylcholine Transporter Interacts with Clathrin-associated Adaptor Complexes AP-1 and AP-2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.12580–12587, 2004.

KITA, H.; VAN DER KLOOT, W. Time course and magnitude of effects of changes in tonicity on acetylcholine release at frog neuromuscular junction. **Journal of Neurophysiology**, v.40, n.2, p.212-224, 1977.

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

LEE, R. K.; JASMIN, B. J.; ROTUNDO, R. L. Development of the neuromuscular junction. **In: Principles of Medical Biology, v.11, Developmental Biology, p.187-207.** JAI Press Inc. 1998.

LI, L.; CHIN, L-S.; SHUPLIAKOV, O.; BRODIN, L.; SIHRA, T. S.; HVALBYI, O.; JENSEN, V.; ZHENG, D.; MCNAMARA, J. O.; GREENGARD, P.; ANDERSEN, P. Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, n.20, p.9235-9239, 1995.

LIMA, R. F.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. M.; KUSHMERICK, C. Quantal Release of Acetylcholine in Mice with Reduced Levels of the Vesicular Acetylcholine Transporter. **Journal of Neurochemistry**, v.113, p.943–951, 2010.

LIU, Y.; EDWARDS, R. H. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. **Annual Review of Neuroscience**, v. 20, p.125-56, 1997.

MARQUES, M. J.; CONCHELLO, J-A.; LICHTMAN, J. W. From Plaque to Pretzel: Fold Formation and Acetylcholine Receptor Loss at the Developing Neuromuscular Junction. **The Journal of Neuroscience**, v.20, n.10, p.3663-3675, 2000.

MARSHALL, I. G. Studies on the blocking actions of 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183). **British Journal of Pharmacology**, v.38, n.3, p.503-516, 1970.

MARTYN, A. C.; De JAEGER, X.; MAGALHAES, A. C.; KESARWANI, R.; GONÇALVES, D. F.; RAULIC, S.; GUZMAN, M. S.; JACKSON, M. F.; IZQUIERDO, I.; MACDONALD, J. F.; PRADO, M. A.; PRADO, V. F. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n.43, p.17651-17656, 2012.

MASELLI, R. A.; KONG, D. Z.; BOWE, C. M.; McDONALD, C. M.; ELLIS, W. G.; AGIUS, M. A.; COMEZ, C. M.; RICHMAN, D. P.; WOLLMANN, R. L. Presynaptic Congenital Myasthenic Syndrome Due to Quantal Release Deficiency. **Neurology**, v.57, p.279 – 289, 2001.

MESULAM, M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? **Learning & Memory**, v.11, p.43–49, 2004.

MISGELD, T.; BURGESS, R. W.; LEWIS, R. M.; CUNNINGHAM, J. M.; LICHTMAN, J. W.; SANES, J. R. Roles of Neurotransmitter in Synapse Formation: Development of Neuromuscular Junctions Lacking Choline Acetyltransferase. **Neuron**, v.36, p.635–648, 2002.

MURTHY, V. N.; DE CAMILLI, P. Cell Biology of the Presynaptic Terminal, **Annual Review of Neuroscience**, v.26, p.701–28, 2003.

NATHANSON, N. M. Synthesis, trafficking and localization of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v.119, n.1, p.33-43, 2008.

NGUYEN, M. L.; PARSONS, S. M. Effects of internal pH on the acetylcholine transporter of synaptic vesicles. **Journal of Neurochemistry**, v.64, n.3, p.1137–1142, 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, 1998.

NICHOLLS, D. G. **Proteins, transmitters and synapses**. Oxford: Blackwell Science, 1994, 253 p.

NOGAJSKI, J. H.; KIERNAN, M. C.; OUVRIER, R. A.; ANDREWS P. I. Congenital myasthenic syndromes. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.16, p.1-11, 2009.

NONET, M. L.; HOLGADO, A. M.; BREWER, F.; SERPE, C. J.; NORBECK, B. A.; HOLLERAN, J.; WEI, L.; HARTWIEG, E.; JORGENSEN, E. M.; ALFONSO, A. UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 Homologue, Regulates the Size and Protein Composition of Synaptic Vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, v.10, p.2343–2360, 1999.

OZKAN, E. D.; UEDA, T. Glutamate Transport and Storage in Synaptic Vesicles. **Japanese Journal of Pharmacology** v.77, p.1–10, 1998.

PALACE, J.; BEESON, D. The congenital myasthenic syndromes. **Journal of Neuroimmunology**, v.201, p.2-5, 2008.

PALADE, G. E. Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. **The Anatomical Record**, v.118, n.2, p.335-336, 1954.

PALAY, S. L. 1954. Electron microscope study of the cytoplasm of neurons. **The Anatomical Record**, v.118, n.2, p.336, 1954.

PARNAS, H.; SLUTSKY, I.; RASHKOVAN, G.; SILMAN, I.; WESS, J.; PARNAS, I. Depolarization initiates phasic acetylcholine release by relief of a tonic block imposed by presynaptic M2 muscarinic receptors. **Journal of Neurophysiology**, v.93, n.6, p.3257-3269, 2005.

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

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.

PARSONS, S. M.; PRIOR, C.; MARSHALL, I. G. Acetylcholine transport, storage and release. **International Review of Neurobiology**, v.35, p.279-390, 1993.

PETRALIA, R. S.; WANG, Y-X.; INDIG, F. E.; BUSHLIN, I.; WU, F.; MATTSON, M. P.; YAO, P. J. Reduction of AP180 and CALM Produces Defects in Synaptic Vesicle Size and Density. **NeuroMolecular Medicine**, v.15, p.49–60, 2013.

PRADO, M. A.; COMEZ, M. V.; COLLIER, B. Mobilization of a vesamicol-insensitive pool of acetylcholine from a sympathetic ganglion by ouabain. **Journal of Neurochemistry**, v.61, n.1, p.45-56, 1993.

PRADO, V. F.; PRADO, M. A. Signals involved in targeting membrane proteins to synaptic vesicles. **Cellular and Molecular Neurobiology**, vol.22, p.565–577, 2002.

PRADO, M. A. M.; REIS, R. A. M.; PRADO, V. F.; MELLO, M. C.; GOMEZ, M. V.; MELLO, F. G. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, v. 41, p. 291–299, 2002.

PRADO, V. F.; MARTINS-SILVA, C.; CASTRO, B. M.; LIMA, R. F.; BARROS, D. M.; AMARAL, E. A.; RAMSEY, A. J.; SOTNIKOVA, T. D.; RAMIREZ, M. R.; KIM, H. G.; ROSSATO, J. I.; KOENEN, J.; QUAN, H.; COTA, V. R.; MORAES, M. F. D.; GOMEZ, M. V.; GUATIMOSIM, C.; WETSEL, W. C.; KUSHMERICK, C.; PEREIRA, G. S.; GAINETDINOV, R. R.; IZQUIERDO, I.; CARON, M. G.; PRADO, M. A. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. **Neuron**, v.51, p.601–612, 2006.

PRADO, V. F.; ROY, A.; KOLISNYK, B.; GROS, R.; PRADO, M. A. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. **The Biochemical Journal**, v.450, n.2, p.265-274, 2013.

PUN, S.; SIGRIST, M.; SANTOS, A. F.; RUEGG, M. A.; SANES, J. R.; JESSELL, T. M.; ARBER, S.; CARONI, P. An Intrinsic Distinction in Neuromuscular Junction Assembly and Maintenance in Different Skeletal Muscles. **Neuron**, v.34, p.357-370, 2002.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FRITZPATRICK, D.; KATZ, L. C.; LAMANTIA, A-S; McNAMARA, J. O.; WILLIAMS M. **Neuroscience**. 2th ed. Sinauer Associates Inc, 2001, 681 p.

PYLE, J. L.; KAVALALI, E. T.; PIEDRAS-RENTERIA, E. S.; TSIEN, R. W. Rapid reuse of readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. **Neuron** v.28, p.221–231, 2000.

RAMIREZ, D. M.; KHVOTCHEV, M.; TRAUTERMAN, B.; KAVALALI, E. T. Vti1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles at rest and maintains spontaneous neurotransmission. **Neuron**, v.73, n.1, p.121-134, 2012.

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

RICHARDS, D. A.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W. J. Two Endocytic Recycling Routes Selectively Fill Two Vesicle Pools in Frog Motor Nerve Terminals. **Neuron**, v.27, p.551–559, 2000.

RICHARDS, D. A.; GUATIMOSIM, C.; RIZZOLI, S. O.; BETZ, W. J. Synaptic Vesicle Pools at the Frog Neuromuscular Junction. **Neuron**, v.39, p.529–541, 2003.

RIZO, J.; SÜDHOF, T. C. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.3, n.8, p.641-653, 2002.

RIZO, J.; SÜDHOF, T. C. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins and their accomplices – guilty as charged? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.28, p.279-308, 2012.

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

ROBITAILLE, R.; ADLER, E. M.; CHARLTON, M. P. Strategic localization of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. **Neuron**, v. 5, p.773-779, 1990.

RODRIGUES, H. A.; LIMA, R. F.; FONSECA, M. C.; AMARAL, E.; MARTINELLI, P. M.; NAVES, L. A.; GOMEZ, M. V.; KUSHMERICK, C.; PRADO, M. A.; GUATIMOSIM, C. Membrane cholesterol regulates different modes of synaptic vesicle release and retrieval at the frog neuromuscular junction. **The European Journal of Neuroscience**, v.38, n.7, p.2978-2987, 2013.

ROSENMUND, C.; STEVENS, C. F. Definition of the Readily Releasable Pool of Vesicles at Hippocampal Synapses. **Neuron**, v.16, p.1197–1207, 1996.

ROYLE, S. G.; LAGNADO L. Endocytosis at the synaptic terminal. **The Journal of Physiology**, v.553, n.2, p.345-355, 2003.

SAHEKI, Y.; DE CAMILLI, P. Synaptic vesicle endocytosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012; 4 (9):a005645.

SAMIGULLIN, D.; BILL, C. A.; COLEMAN, W. L.; BYKHOVSKAIA, M. Regulation of transmitter release by synapsin II in mouse motor terminals. **The Journal of Physiology**, v.561, p.149-158, 2004.

SANES, J. R. The synaptic cleft of the neuromuscular junction. **Seminars in DEVELOPMENTAL BIOLOGY**, v.6, p.163-173, 1995.

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

SARA, Y., MOZHAYEVA, M. G.; LIU, X.; KAVALALI, E. T. Fast vesicle recycling supports neurotransmission during sustained stimulation at hippocampal synapses. **The Journal of Neuroscience**, v.22, n.5, p.1608-1617, 2002.

SCHWEIZER, F. E.; RYAN, T. A. The Synaptic Vesicle: Cycle of Exocytosis and Endocytosis. **Current Opinion in Neurobiology**, v.16, p.298–304, 2006.

SCHMID, S.; AZZOPARDI, E.; DE JAEGER, X.; PRADO, M. A. M.; PRADO, V. F. VACHT knock-down mice show normal prepulse inhibition but disrupted long-term habituation . **Genes, Brain and Behavior**, v.10, n.4, p.457–464, 2011.

SIKSOU, L.; SILM, K.; BIESEMANN, C.; NEHRING, R. B.; WOJCIK, S. M.; TRILLER, A.; EL MESTIKAWY, S.; MARTY, S.; HERZOG, E. A role for vesicular glutamate transporter 1 in synaptic vesicle clustering and mobility. **The European Journal of Neuroscience**, v.37, n.10, p.1631-1642, 2013.

SÖLLNER, T.; BENNETT, M. K.; WHITEHEART, S. W.; SCHELLER, R. H.; ROTHMAN, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. **Cell**, v.75, n.3, p.409–418, 1993.

STEVENS, C. F.; WILLIAMS, J. H. “Kiss and run” exocytosis at hippocampal synapses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.23, p.12828-12833, 2000.

SÜDHOF, T. C. The Synaptic Vesicle Cycle revisited. **Neuron**, v.28, n.2, p.317-320, 2000.

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

SÜDHOF, T. C.; RIZO, J. Synaptic Vesicle Exocytosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.3, n.12, p.1–14, 2011.

SÜDHOF, T. C.; ROTHMAN, J. E. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. **Science**, v.323, n.5913, p.474-477, 2009.

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

TAKEI, K.; MUNDIGL, O.; DANIELL, L.; DE CAMILLI, P. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. **The Journal of Cell Biology**, v.133, p.1237–1250, 1996.

TAKAMORI, S.; HOLT, M.; STENIUS, K.; LEMKE, E. A.; GRONBORG, M.; RIEDEL, D.; URLAUB, H.; SCHENCK, S.; BRÜGGER, B.; RINGLER, P.; MÜLLER, S. A.; RAMMNER, B.; GRÄTER, F.; HUB, J. S.; DE GROOT, B. L.; MIESKES, G.; MORIYAMA, Y.; KLINGAUF, J.; GRUBMÜLLER, H.; HEUSER, J.; WIELAND, F.; JAHN, R. Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. **Cell**, v.127, n.4, p.831-846, 2006.

TANG, J.; MAXIMOV, A.; SHIN, O. H.; DAI, H.; RIZO, J.; SÜDHOF, T. C. A complexin/synaptotagmin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. **Cell**, v.126, n.6, p.1175-1187, 2006.

TAO-CHENG, J. H. Activity-related redistribution of presynaptic proteins at the active zone. **Neuroscience**, v.141, p.1217–1224, 2006.

TENG, H.; COLE, J. C.; ROBERTS, R. L.; WILKINSON, R. S. Endocytic Active Zones: Hot Spots for Endocytosis in Vertebrate Neuromuscular Terminals. **The Journal of Neuroscience**, v.19, n.12, p.4855–4866, 1999.

TENG, H.; WILKINSON, R. S. Clathrin-mediated endocytosis near active zones in snake motor boutons. **The Journal of Neuroscience**, v.20, n.21, p.7986-7993, 2000.

TORREJAIS, M. M.; SOARES, J. C.; MATHEUS, S. M. M.; CASSEL, F. D.; MELLO, J. M.; BASSO, N. A. Histochemical and SEM evaluation of the neuromuscular junctions from alcoholic rats. **Cell & Tissue**, v.34, n.2, p.117–123, 2002.

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

VAN DER KLOOT, W.; COLASANTE, C.; CAMERON, R.; MOLGÓ, J. Recycling and refilling of transmitter quanta at the frog neuromuscular junction. **The Journal of Physiology**, v.523, n.4, p.247-58, 2000.

VAN DER KLOOT, W.; MOLGÓ, J.; CAMERON, R.; COLASANTE, C. Vesicle size and transmitter release at the frog neuromuscular junction when quantal acetylcholine content is increased or decreased. **The Journal of Physiology**, v.541, n.2, p.385–393, 2002.

WAN, H. I.; DiANTONIO, A.; FETTER, R. D.; BERGSTROM, K.; STRAUSS, R.; GOODMAN, C. S. Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. **Neuron**, v.26, n.2, p.313-329, 2000.

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

WHITTON, P.S.; MARSHALL, I.G.; PARSONS, S.M. Reduction of Quantal Size by Vesamicol (AH 5183), an inhibitor of vesicular acetylcholine storage. **Brain Research**, v.385, p.189–192, 1986.

WOJCIK, S. M.; KATSURABAYASHI, S.; GUILLEMIN, I.; FRIAUF, E.; ROSENMUND, C.; BROSE, N.; RHEE, J. S. A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. **Neuron**, v.50, n.4, p.575-587, 2006.

YAO, J.; KWON, S. E.; GAFFANEY, J. D.; DUNNING, F. M.; CHAPMAN, E. R. Uncoupling the roles of synaptotagmin I during endo- and exocytosis of synaptic vesicles. **Nature Neuroscience**, v.15, p.243-249, 2012.

ZHAI, R. G.; BELLEN, H. J. The Architecture of the Active Zone in the Presynaptic Nerve Terminal. **Physiology**, v.19, p.262-270, 2004.

ZHANG, B.; KOH, Y. H.; BECKSTEAD, R. B.; BUDNIK, V.; GANETZKY, B.; BELLEN, H. J. Synaptic Vesicle Size and Number Are Regulated by a Clathrin Adaptor Protein Required for Endocytosis. **Neuron**, v.21, p.1465–1475, 1998.

ZHANG, J. Z.; DAVLETOV, B. A.; SÜDHOF, T. C.; ANDERSON, R. G. Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling. **Cell**, v.78, p.751-760, 1994.

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

8.ANEXOS