

Bráulio Marcone de Castro

**FUNÇÕES MOTORAS EM  
CAMUNDONGOS DEFICIENTES DO  
TRANSPORTADOR VESICULAR DE  
ACETILCOLINA (VAC<sub>h</sub>T)**

Belo Horizonte

Agosto

2006

Bráulio Marcone de Castro

**FUNÇÕES MOTORAS EM  
CAMUNDONGOS DEFICIENTES DO  
TRANSPORTADOR VESICULAR DE  
ACETILCOLINA (VAC<sub>h</sub>T)**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Orientador: *Marco Antônio Máximo Prado*

Co-orientadores: *Vânia Ferreira Prado*

*Grace Schenatto Pereira*

Belo Horizonte

Agosto

2006

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia e no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- American Health Assistance Foundation
- Pronex-MG
- NIH-Forgaty

## **Agradecimentos**

A Deus.

Agradeço aos meus pais e irmãos, pelo apoio e confiança.

Aos professores Marco Antônio e Vânia, pela oportunidade do aprendizado e pelas demonstrações de competência e profissionalismo.

À professora Grace pela orientação, apoio, conselhos e acima de tudo pela amizade.

Ao professor Rogélio Lopes pela oportunidade de expandir minhas ambições ao ingressar no PET e pelo apoio na minha vinda à UFMG.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez, pelo exemplo.

Ao professor Márcio Flávio e ao aluno Vinícius Rosa Cota, pelo apoio nos experimentos de força muscular e pelas sugestões.

Aos alunos Greice, Bruno e Rodrigo, pela ajuda, idéias e comprometimento.

A todos amigos e colegas dos laboratórios de Neurofarmacologia e Neurobiologia molecular.

Aos amigos Diogo, Danuza, Adriane e Rodrigo pelo apoio indispensável para a realização desse trabalho.

Aos amigos Ana Cristina, Janice, Diane, Melissa, Luciene, Geraldo, Stefany, Brunos, Dani, Fabíola, Diane, Lucimar, Cristina, Fabiana, pelo convívio e amizade.

Aos amigos Ricardo e Célio, por tudo.

Ao amigo Vitório, pelo apoio.

À tia Terezinha e Vitório pela estadia nos primeiros meses em BH. Sou eternamente grato a vocês.

A Roberto e Rúbia, pela ajuda na vinda para BH. Muito obrigado.

À tia Marluce e tia Ângela, pelo apoio e pelo refúgio em Sete Lagoas.

Aos amigos de Paraúna, uma fonte de renovação de minhas forças.

Ao ensino público, gratuito e de qualidade.

Lista de figuras e tabela	VII
Lista de abreviaturas	VII
Resumo	IX
Abstract	X
1- Introdução	01
1.1 – A neurotransmissão química	
1.2 – A neurotransmissão colinérgica	02
1.2.1-Síntese de Acetilcolina	04
1.2.2 – Captação de colina pelo terminal pré-sináptico	05
1.2.3 – Transporte de Acetilcolina para vesículas sinápticas	07
1.2.4 – A inativação da Acetilcolina	08
1.2.5 – Camundongos geneticamente modificados e proteínas pré-sinápticas colinérgicas	10
1.3- Mecanismos efetores	11
1.3.1- Receptores nicotínicos	11
1.3.2- Receptores muscarínicos	12
1.4- Neurotransmissão colinérgica central	13
1.4.1- Acetilcolina e cognição	14
1.4.2 – Acetilcolina e aprendizado motor	15
1.5 – Acetilcolina e a junção neuromuscular	16
1.5.1- Disfunções colinérgicas na junção neuromuscular	19
1.6 – Modelos animais de hipofunção colinérgica	21
2- Objetivos	23

2.1-Objetivo geral	23
2.2-Objetivos específicos	23
3-Materiais e métodos	23
3.1- Animais experimentais	23
3.2- Avaliação da força muscular	24
3.2.1- Teste “wire hang”	24
3.2.2 – Teste de força de agarre	25
3.3 – Aprendizado motor	25
3.3.1 - Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod)	25
3.4 - Resistência física	26
3.4.1- Esteira motorizada	26
4 – Resultados	27
4.1-Força muscular	27
4.2-Aprendizado motor	30
4.3-Resistência física	32
5 – Discussão	33
6 – Conclusões	38
7 – Referências bibliográficas	39
8 – Anexo	46

## Lista de Figuras e Tabela

Figura 1: Desenho esquemático representando a neurotransmissão colinérgica

Figura 2: Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica central em ratos

Figura 3: Desenho esquemático da neurotransmissão na junção neuromuscular

Figura 4: Teste de “wire hang” aplicado em camundongos selvagens, VACHT KD<sup>HET</sup> e camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>.

Figura 5: Teste de força de agarre aplicado em camundongos selvagens, VACHT KD<sup>HET</sup> e camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>.

Figura 6: Efeito de inibidores da AChE sobre a força de agarre em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>

Figura 7: Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod) aplicado em camundongos selvagens, VACHT KD<sup>HET</sup> e camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>.

Figura 8: Teste da esteira motorizada aplicado em camundongos selvagens, VACHT KD<sup>HET</sup> e camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>.

## Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BuChE	Butilcolinesterase
Ch	Colina
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
DA	Doença de Alzheimer
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
HC-3	Hemicolínio-3
JNM	Junção neuromuscular
$K_i$	Constante de inibição
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mAChRs	Receptores muscarínicos de Ach
nAChRs	Receptores nicotínicos de Ach
SMC	Síndromes miatênicas congêntitas
VACHT	Transportador vesicular de Acetilcolina
VACHT KD <sup>HET</sup>	Camundongo “knock-down” heterozigoto para o VACHT
VACHT KD <sup>HOM</sup>	Camundongo “knock-down” homozigoto para o VACHT
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas



## Resumo

A liberação do neurotransmissor Acetilcolina (ACh) depende de sua estocagem em vesículas sinápticas, um passo controlado pela atividade do transportador vesicular de ACh (VACHT). A neurotransmissão mediada por ACh possui um papel crucial no controle central e periférico do movimento. Camundongos Knock-down heterozigoto (VACHT  $KD^{HET}$ ) e homozigoto (VACHT  $KD^{HOM}$ ) para o VACHT apresentam uma redução de 45% e 65% na expressão do VACHT, respectivamente. Para avaliar o impacto da redução da expressão do VACHT em funções motoras, utilizamos o teste de força de agarre, o teste “wire hang”, a esteira motorizada e o teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod). Animais VACHT  $KD^{HET}$  não apresentaram alterações no wire hang, teste de força de agarre e na esteira motorizada, entretanto animais VACHT  $KD^{HOM}$  apresentaram uma performance significativamente prejudicada em tais tarefas. O déficit na força de agarre observado em animais VACHT  $KD^{HOM}$  foi temporariamente revertido pela administração de inibidores da AChE centrais e periféricos. Apesar da ausência de alterações na força muscular e resistência ao exercício, camundongos VACHT  $KD^{HET}$  apresentaram uma cinética de aprendizado motor mais lenta que animais selvagens. Nossos resultados demonstram que diferentes níveis de hipofunção colinérgica podem causar formas distintas de anormalidade motora. Camundongos VACHT  $KD^{HOM}$  apresentaram um

perfil miastênico, enquanto animais VACHT KD<sup>HET</sup> parecem apresentar um comprometimento de origem predominantemente central. Estes camundongos geneticamente modificados podem representar novos modelos para a investigação da neuroquímica do controle motor, bem como modelos de disfunções motoras geradas por quadros de hipofunção colinérgica.

## Abstract

Acetylcholine (ACh)–mediated neurotransmission has a crucial role in the control of movement. Release of ACh depends on its storage in synaptic vesicles, a step controlled by the activity of the VACHT. We developed a genetically altered strain of mice with reduced expression of this transporter. Heterozygous (VACHT KD<sup>HET</sup>) and homozygous (VACHT KD<sup>HOM</sup>) knock–down mice have 45 and 65% decrease in VACHT protein. To evaluate whether VACHT deficiency may affect motor functions, we used the following tasks: grip force, wire hang and treadmill. Motor learning was measured on the rotarod. We were unable to detect any alteration in the grip force, wire hang and treadmill tests in VACHT KD<sup>HET</sup> mice; however VACHT KD<sup>HOM</sup> mice were significantly impaired in all three tasks. Reduced grip strength in VACHT KD<sup>HOM</sup> mice was readily reversed by prior injection of galantamine. Moreover, motor learning performance on the accelerating rotarod task by VACHT KD<sup>HET</sup> mice was worse than for wild type controls. Our results demonstrate that different levels of cholinergic hypofunction may causes distinct types of motor abnormality. VACHT KD<sup>HOM</sup> shows a myastenic profile, while VACHT

KD<sup>HET</sup> mice presented a decrease in motor learning with normal motor function. These genetically modified mice may represent a novel model system for investigation of motor control and congenital myasthenic syndromes.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A neurotransmissão química

Até o século XIX, havia um consenso de que a comunicação entre neurônios ocorria através de uma conexão física direta. Entretanto, estudos realizados por Golgi, Ramon y Cajal e outros foram capazes de convencer a comunidade científica de que essas conexões, hoje conhecidas como sinapses, são próximas em vez de contínuas (Taylor e Brown, 1999). A natureza química das sinapses foi demonstrada por Otto Loewi. Em um experimento clássico, ele estimulou o nervo vago do coração perfundido de uma rã e permitiu que o líquido de perfusão entrasse em contato com o coração de outra rã. Como resultado, a atividade do coração da rã receptora foi diminuída através da ação da “substância do vago”, denominada por ele de parassimpática. Posteriormente a parassimpática passou a ser denominada Acetilcolina (ACh) (Brown, 2006).

A transmissão química é a principal forma de comunicação entre neurônios. Os eventos pré e pós-sinápticos são altamente regulados e sujeitos às modificações dependentes do uso, que são a base da plasticidade sináptica. A neurotransmissão química clássica requer os seguintes passos: 1-Síntese do neurotransmissor no terminal pré-sináptico; 2-Estocagem do neurotransmissor em vesículas sinápticas; 3-Liberação regulada de neurotransmissor na fenda sináptica; 4-A presença de receptores específicos para o neurotransmissor no terminal pós-sináptico; 5-Uma forma de terminar a ação do neurotransmissor (Taylor e Brown, 1999).

Um dos grandes desafios da neurociência é explicar como diferentes padrões de atividade de sistemas de neurotransmissores coordenam comportamentos complexos, e como alterações nesses sistemas participam de processos patológicos.

## 1.2. A neurotransmissão colinérgica

A ACh foi proposta como mediadora da função celular por Hunt, em 1907. Em 1914, Dale demonstrou que sua ação era capaz de mimetizar a estimulação de nervos parassimpáticos (Dale, 1914). Loewi, em 1921, forneceu evidências claras de que há liberação de ACh após estimulação nervosa (revisado por Brown, 2006). Quimicamente trata-se de um éster de ácido acético e colina, cuja simplicidade estrutural subestima a complexidade das ações que exerce.

A neurotransmissão colinérgica é essencial para o funcionamento do sistema nervoso. Seu bloqueio agudo é geralmente letal; enquanto sua perda gradual, como observada na Doença de Alzheimer (DA), é associada com a deterioração progressiva de funções neurais (Hoffman e Taylor, 2001). A ACh participa do controle central e periférico do movimento, funcionamento do sistema nervoso autônomo, regulação do sono e de múltiplos processos cognitivos como memória, atenção e aprendizado (Sarter e cols. 2005; Gold, 2003).

A ACh é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), a partir dos substratos colina e acetato, e posteriormente transportada para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Após ser liberada no terminal sináptico, a ACh interage com seus receptores e é hidrolisada em colina e acetato. A colina é então recaptada para o neurônio pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1), e utilizada para a síntese de novas moléculas de ACh (Ribeiro e cols., 2006; Prado e cols.; 2002) (figura1).

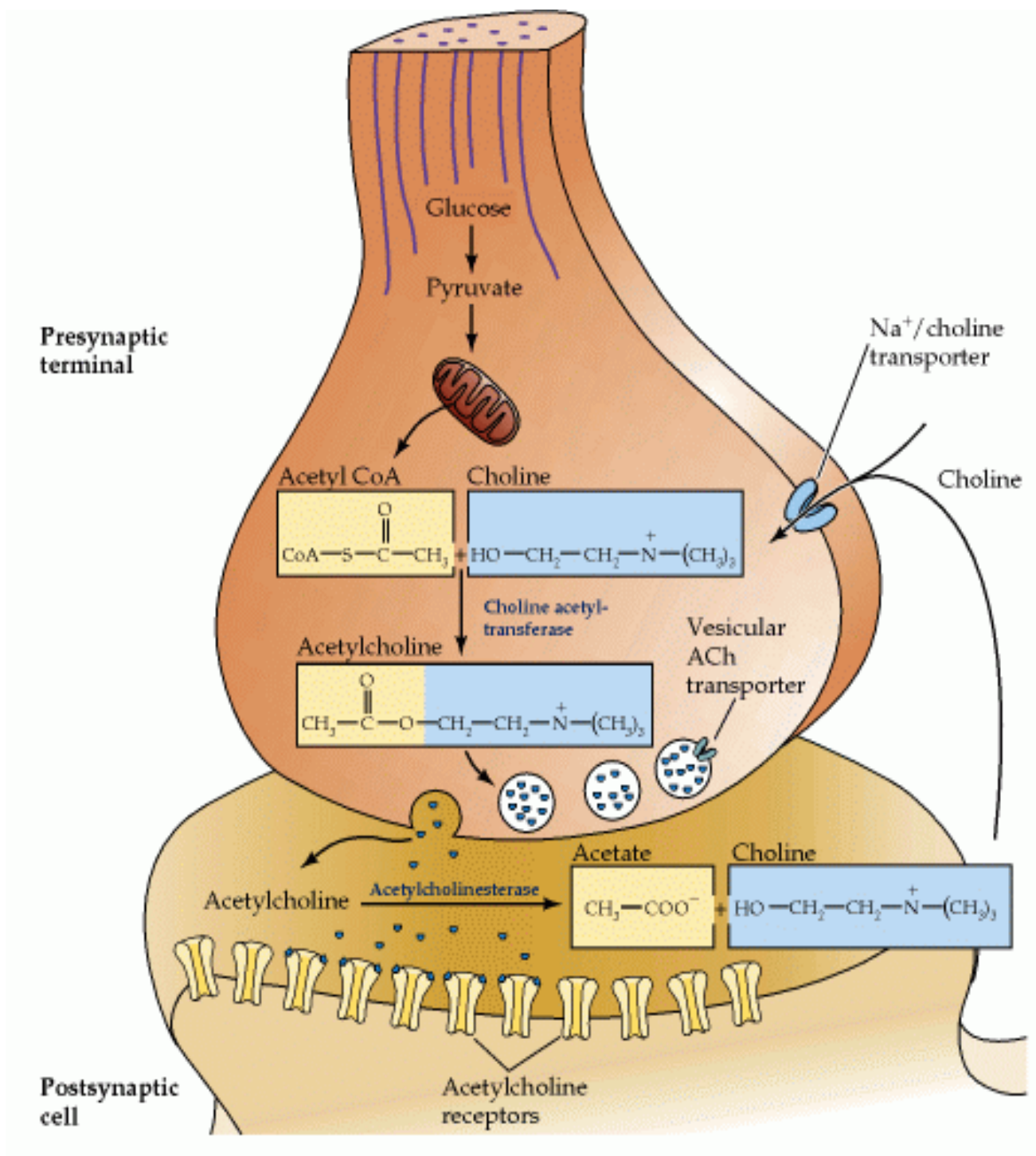


Figura1: Desenho esquemático representando a neurotransmissão colinérgica (modificado de Purves e cols., 2001).

### 1.2.1 Síntese de ACh

A ChAT é a enzima responsável pela síntese de ACh, catalisando a transferência de um grupo Acetil, proveniente de uma molécula de Acetil-CoA, para uma molécula de colina. A reação ocorre em um único passo; um contraste com a síntese de catecolaminas, que envolve reações sequenciais com diferentes substratos e enzimas. Os níveis de acetil-CoA são mantidos através do metabolismo da glicose, sob ação da enzima ATP-citrato liase, que interessantemente apresenta sua expressão aumentada em neurônios colinérgicos (Tomaszewicz e cols., 2003; Beigneux e cols., 2004). O suprimento de colina é provido principalmente da dieta, devido à incapacidade de neurônios em sintetizar colina (Fernstrom e cols., 1981; Zeisel e cols., 1981). A ChAT é encontrada predominantemente como uma proteína solúvel no citoplasma, com uma pequena parcela da população total da enzima associada a membranas ou ao núcleo (Gill e cols., 2003). A atividade da ChAT é influenciada por sua distribuição, interação com proteínas celulares e estado de fosforilação (Dobransky e Ryllet, 2005).

Ferramentas bioquímicas e farmacológicas indicam que a ChAT encontra-se em excesso cinético em relação aos seus substratos, sugerindo que sua ação não seja a etapa limitante da síntese de ACh (Blusztajn e Wurtman, 1983). Entretanto, uma redução da atividade da ChAT, encontrada em diferentes situações patológicas, pode reduzir a disponibilidade de ACh (Oda, 1999). Na DA, observa-se uma redução na concentração da ChAT no córtex cerebral e hipocampo (Mesulam, 2004). Na Doença de Huntington, embora a quantidade de neurônios colinérgicos no estriado esteja preservada, há uma redução significativa da atividade da ChAT. A redução na síntese de ACh parece ser parcialmente responsável pelos movimentos involuntários observados em pacientes afetados pela doença (Cichetti e cols., 2000). Mutações no gene da ChAT foram encontradas em uma forma de miastenia frequentemente fatal, denominada Síndrome miastênica congênita com episódios de apnéia. As mutações foram capazes de abolir ou reduzir a síntese de ACh (Ohno e cols., 2001; Kraner e cols., 2003).

### 1.2.2 Captação de colina pelo terminal pré-sináptico

A incapacidade de neurônios colinérgicos em realizar a síntese *de novo* de colina torna a captação da colina para o interior neuronal essencial para manter a síntese de ACh (Zeisel, 1981). Existem dois sistemas de transporte de colina bem caracterizados e distintos entre si. Em altas concentrações, a colina é transportada por um sistema de baixa afinidade ( $K_m$  de 100  $\mu\text{M}$ ), independente de íons sódio e inibido seletivamente por altas concentrações de hemicolínio-3 (HC-3), com  $K_i$  de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ . Esse sistema encontra-se distribuído em vários tipos celulares e parece estar envolvido com a síntese de fosfatidilcolina. O outro é um sistema de transporte de alta afinidade por colina, com  $K_m$  de 1 a 5  $\mu\text{M}$ , depende de sódio e cloreto, e inibido por baixas concentrações de HC-3 ( $K_i$  de 10-100 nM) (Okuda, *et al*, 2000; Ribeiro e cols., 2006). O sistema de alta afinidade está presente principalmente em neurônios colinérgicos e é responsável por suprir colina para a síntese de ACh. A captação de colina pelo sistema de transporte de alta afinidade é assumida como etapa limitante da síntese de ACh (Blakely e cols., 2004; Ribeiro e cols., 2006)

O transporte de colina de alta afinidade foi descrito nos anos de 1960. Entretanto, os genes para o transportador de colina de alta afinidade (CHT1) em ratos e *C. elegans* foram apenas recentemente clonados (Okuda e cols., 2000). O CHT1 de humanos, que codifica uma proteína de 580 aminoácidos, apresenta alta homologia com os genes de rato (98%) e camundongo (93%) (Apparsundaram e cols., 2000; Wang e cols., 2001; Guermonprez e cols., 2002). Modelos de estrutura secundária para o CHT1 predizem uma proteína transmembrana (contendo treze domínios transmembrânicos), com a porção amino-terminal com orientação extracelular e a região carboxi-terminal intracelular (Apparsundaram e cols., 2000). Confirmou-se a orientação extracelular da região amino-terminal através do uso de epitopos “FLAG” fundidos com a região amino-terminal do ChT1, que posteriormente foram detectados por anticorpos anti-“FLAG” em células vivas (Ribeiro e cols., 2005).

Surpreendentemente, o ChT1 localiza-se predominantemente em compartimentos intra-celulares. Várias estratégias experimentais distintas



indicam a presença do ChT1 em vesículas sinápticas (Ferguson e cols., 2003; Ribeiro e cols., 2003). A inesperada localização do CHT1 fornece um mecanismo capaz de explicar como alterações da atividade sináptica são capazes de gerar mudanças imediatas no transporte de colina. O aumento da atividade neuronal leva à fusão de vesículas sinápticas com a membrana, o que é capaz de aumentar a disponibilidade de moléculas de CHT1 na membrana neuronal. Como o CHT1 realiza o passo limitante para a síntese de ACh, o aumento da captação de colina poderia sustentar um aumento na síntese de ACh, necessária durante situações de alta atividade neuronal (Ribeiro e cols., 2006). Tal hipótese é sustentada por diferentes observações: a captação de colina é aumentada agudamente pelo aumento da atividade neuronal, de uma forma cálcio-dependente (Collier e Katz, 1974; Simon e Kuhar, 1975; Kuhar e Murrin 1978; O'Regan e Collier, 1981; Saltarelli e cols., 1987); a despolarização neuronal leva a um aumento na velocidade máxima de transporte (Simon e Kuhar, 1975; Simon e cols., 1976) e na quantidade de moléculas de ChT1 na membrana (Ferguson e cols., 2003); a redução da atividade colinérgica cerebral através da administração de fenobarbital induz redução da captação de colina com redução da síntese de ACh, enquanto o uso de um ativador colinérgico, Escopolamina, aumenta a velocidade máxima para o transporte de alta afinidade (Simon e cols., 1976).

Sugere-se portanto um elegante mecanismo de plasticidade sináptica. Um experimento recente demonstra a importância desse processo em cognição. Utilizando uma tarefa em ratos com alta demanda de atenção, Apparsundaram e cols., em 2005, demonstraram um aumento na velocidade máxima do transporte de colina de alta afinidade no córtex pré-frontal medial correlacionado com a performance dos animais. O resultado é condizente com dados anteriores, onde um aumento na liberação de ACh em estruturas corticais ocorre em tarefas com demanda de atenção (Sarter e cols., 2005).

### 1.2.3 Transporte de Acetilcolina para vesículas sinápticas

A ACh sintetizada no citoplasma deve ser transportada para o interior de vesículas sinápticas. Como a relação entre a concentração de ACh vesicular e citoplasmática é de 100:1, é necessário um mecanismo de transporte ativo para que a ACh seja transportada para o interior da vesícula. O VACHT é capaz de realizar esse transporte utilizando um gradiente de prótons gerado por uma ATPase do tipo V. O transporte realizado pelo VACHT possui uma relação estequiométrica de dois prótons por molécula de ACh (Parsons e cols., 2003). O VACHT é uma glicoproteína de 500-600 aminoácidos. A análise de hidrofobicidade da seqüência primária dos seus aminoácidos prediz uma macromolécula com 12 domínios transmembrana, flanqueados por domínios amino e carboxi-terminal citoplasmáticos (Alfonso e cols., 1993; Erickson e cols., 1994; Roghani e cols., 1994; Varoqui e cols., 1994).

Caracterizado inicialmente por sua atividade bloqueadora neuromuscular, o isômero levógiro da droga vesamicol é capaz de inibir de maneira estereo-seletiva o preenchimento de vesículas colinérgicas. Trata-se de uma inibição alostérica e não competitiva (Parsons, 1993).

Em 1993, Alfonso e cols. clonaram e sequenciaram o cDNA correspondente ao gene *unc-17* de *C. elegans*. Foi proposto que o produto deste gene poderia ser um transportador vesicular de acetilcolina, baseado em sua grande homologia com os transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs). Além disso, a expressão de mutantes do gene *unc-17* em *C. elegans* levou a fenótipos que indicam o comprometimento da função colinérgica. Em 1994, Varoqui e cols. identificaram o homólogo de *unc-17* expresso no órgão elétrico de Torpedo. Ainda em 1994, Erickson e Cols. e Roghani e cols. identificaram o homólogo das proteínas de *C. elegans* e Torpedo em rato. Erickson e cols. (1994) e Liu e Edwards (1997) demonstraram que essa proteína consiste em um transportador vesicular de acetilcolina funcional, através da reconstituição do transporte *in vitro*.

O gene do VACHT apresenta organização gênica particular, estando localizado no interior do primeiro íntron do gene que codifica a ChAT (Bejanin e cols. 1994). Acredita-se que os mRNAs de VACHT e ChAT são transcritos a

partir de um mesmo promotor e sofram processamentos alternativos, envolvendo excisões de seqüências de aproximadamente 1 a 7 Kilobases (Bejanin e cols. 1994; Cervini e cols. 1995). Essa disposição sugere que a regulação da expressão destes dois genes possa ser semelhante (Cervini e cols. 1995).

Diferentes abordagens fornecem indícios da capacidade do transporte vesicular em modular a quantidade de ACh liberada na fenda sináptica. O aumento na expressão do VAcHT na junção neuromuscular (JNM) imatura de *Xenopus* é capaz de duplicar o tamanho quantal. Já a expressão do VAcHT com mutações em resíduos de aspartato é capaz de reduzir o tamanho quantal (Song e cols., 1997). Epinefrina e derivados de AMPc são capazes de aumentar o tamanho quantal, um efeito que é bloqueado por vesamicol e inibidores da PKA. Tal efeito é observado na JNM de rã, mas não na JNM de camundongo (Van der Kloot, 1991).

Após o enchimento das vesículas sinápticas, essas são direcionadas para uma região subjacente à membrana sináptica denominada zona ativa. As vesículas são ancoradas à membrana sináptica e se tornam responsivas às mudanças na concentração intracelular de cálcio. Quando um potencial de ação atinge o terminal nervoso, canais de cálcio ativados por voltagem são abertos. As ondas de cálcio resultantes induzem a fusão de vesículas sinápticas com a membrana e a consequente liberação de ACh (Sudhof, 2004).

#### **1.2.4 A inativação da Acetilcolina**

Como neurotransmissor clássico, a ACh possui um mecanismo específico para o término de sua ação. Ao ser liberada na fenda sináptica, a ACh interage reversivelmente com receptores muscarínicos e nicotínicos pré e pós-sinápticos. Após dissociação dos receptores, a ACh é hidrolisada pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina (que é recaptada pelo CHT1 para a síntese de novas moléculas de ACh). Portanto, cabe à AChE limitar as concentrações de ACh na fenda sináptica. A hidrólise da ACh também pode ser catalisada por uma enzima relacionada à AChE, a Butilcolinesterase (BuChE). A BuChE apresenta menor especificidade para a

ACh que a AChE, e sua função ainda é pouco entendida (Darvesh e cols., 2003)

A inibição da AChE é capaz de aumentar a duração de ação do neurotransmissor. A AChE é inibida por um grande repertório de toxinas animais, inseticidas (organofosforados e carbamatos) e fármacos que aliviam os sintomas de patologias que vão de glaucoma à Doença de Huntington (Silman et al; 2006). Os inibidores da AChE são especialmente úteis no tratamento de duas doenças com diferentes formas de comprometimento do sistema colinérgico, DA e Miastenia.

Várias evidências sugerem que o principal sistema de neurotransmissor afetado na DA é o colinérgico. A hipótese colinérgica da DA sustenta que a redução da transmissão colinérgica possui uma relação direta com a deterioração cognitiva observada na doença (Terry e Buccafusco, 2003; Bales e cols., 2006 ). Baseado nessas observações, os inibidores da AChE passaram a ser utilizados para o tratamento da DA no final dos anos 1990. Para tal, foram selecionadas moléculas com lipossolubilidade suficiente para permitir a difusão através da barreira hemato-encefálica. As drogas atualmente utilizadas são Galantamina, Rivastigmina e Donepezil (Lleó e cols., 2006).

A administração de inibidores da AChE é útil no tratamento de diferentes formas de miastenia (Sieb, 2005). Por se tratar de uma doença da JNM, é necessária administração de um inibidor da AChE com polaridade suficiente para limitar sua ação a sítios periféricos. A Piridostigmina, um carbamato carregado positivamente, apresenta tal característica. O fármaco é amplamente utilizado no tratamento de miastenia (Thanvi e Lo, 2006).

Além de seu papel clássico, recentemente tem sido atribuído à AChE a participação em processos distintos, como neuritogênese, adesão celular, sinaptogênese, agrupamento de fibras amilóides e hematopoiese (Soreq e Seidman, 2001).

### 1.2.5 Camundongos geneticamente modificados e proteínas colinérgicas pré-sinápticas

Avanços recentes na manipulação molecular de genes de mamíferos permitem a alteração da expressão de genes específicos *in vivo*. O nocauteamento de genes é uma ferramenta poderosa para determinar o papel fisiológico de proteínas envolvidas no metabolismo de neurotransmissores, bem como os mecanismos adaptativos desencadeados por uma falta ou redução da expressão de tais proteínas.

A capacidade de manutenção da homeostase sináptica colinérgica é exemplificada pelo nocauteamento de dois genes essenciais para o funcionamento da maquinaria colinérgica: o gene da ChAT e o gene do CHT1. Enquanto camundongos nocaute da ChAT são natimortos, camundongos haploinsuficientes para a ChAT (com redução de aproximadamente 50% na atividade enzimática) surpreendentemente não apresentaram nenhuma alteração fisiológica aparente. A caracterização neuroquímica dos animais heterozigotos revelou um aumento na expressão do CHT1 de cerca de 50%. Sugere-se que o aumento na atividade do CHT1 foi capaz de aumentar a disponibilidade de colina para a ChAT remanescente e dessa forma manter os níveis de ACh normais (Brandon e cols., 2004). Já animais nocaute para o CHT1 morrem logo após o nascimento, enquanto animais haploinsuficientes para esse gene foram aparentemente normais. Observou-se nos animais heterozigotos uma taxa de transporte de colina equivalente à dos animais selvagens. Nesse caso, o mecanismo de adaptação envolve mecanismos pós-traducionais. Observou-se um aumento na proporção de CHT1 na membrana em relação a compartimentos intacelulares. O aumento do CHT1 localizado na membrana foi capaz de compensar a redução da expressão da proteína e manter o transporte de colina em níveis normais (Ferguson e cols., 2003).

## 1.3 Mecanismos efetores

A ACh exerce suas diversas ações fisiológicas através da interação com duas classes distintas de receptores: os nicotínicos (nAChRs) e os muscarínicos (mAChRs). Enquanto os nAChRs são canais iônicos ativados por ligante (Erausquin e cols., 2000), os receptores muscarínicos são membros da super-família de receptores acoplados à proteína G (Caulfield e cols., 1993).

### 1.3.1 Receptores nicotínicos

Os receptores nicotínicos fazem parte da superfamília de canais iônicos ativados por ligante, que também inclui receptores de ácido gama aminobutírico (GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>), glicina e receptores 5-HT<sub>3</sub> de serotonina (Changeux e Edelstein, 2005). Os receptores nicotínicos compreendem combinações pentaméricas de subunidades individuais (Nai e cols., 2003).

Baseado na distribuição anatômica e propriedades funcionais, podem ser divididos em três grupos: *receptores musculares*, encontrados na junção neuromuscular esquelética; *receptores ganglionares*, encontrados nos terminais pós-sinápticos dos gânglios autonômicos e *receptores neuronais*, amplamente distribuídos no sistema nervoso central (Hogg e cols. 2003).

O receptor nicotínico humano, expresso na junção neuromuscular de adultos, consiste de uma glicoproteína pentamérica constituída de duas subunidades  $\alpha$ , uma  $\beta$ , uma  $\delta$  e uma subunidade  $\epsilon$ . Todas cinco sub-unidades são homólogas, cada uma com quatro domínios transmembrana (M1 a M4). Quando cada subunidades  $\alpha$  é ocupada por uma molécula de acetilcolina, induz-se uma mudança para uma conformação com maior permeabilidade a cátions (Ruff e cols., 2003) (Fig. 2).

Os receptores nicotínicos são amplamente expressos no sistema nervoso central. A inervação colinérgica via receptores nicotínicos regula diferentes processos tais como liberação de neurotransmissores, excitabilidade celular,

integração neuronal. Tais ações implicam os receptores nicotínicos em funções e estados fisiológicos como sono, alerta, fadiga, ansiedade, processamento central da dor e uma série de funções cognitivas (Gotti et al; 2004).

A maior seletividade dos receptores nicotínicos ( $\alpha 7$ )<sub>5</sub> do sistema nervoso central ao cálcio permite que sejam desencadeadas, por esse íon, respostas a longo e médio prazo, como regulação da liberação de neurotransmissores, mecanismos de plasticidade neuronal e memória, adição a drogas, neuroproteção e morte celular (Role e Berg, 1996). Receptores nicotínicos de acetilcolina, localizados no córtex sensorial, contribuem para a atenção e outras funções cognitivas, como já foi demonstrado através de numerosos estudos comportamentais (Warburton, 1992; Turchi e cols. 1995; Rezvani e cols.,2002).

### **1.3.2 Receptores muscarínicos**

As ações muscarínicas da acetilcolina são mediadas por cinco subtipos distintos de receptores (Caulfield e Birdsall, 1998). Baseado na sua habilidade em ativar diferentes classes de proteína G heterotriméricas, os cinco subtipos podem ser agrupados em duas principais classes funcionais. Os receptores M2 e M4 mostram seletividade para proteínas G da família Gi, enquanto os receptores M1, M3 e M5 estão seletivamente acoplados à proteína G da família Gq. Diferentes abordagens experimentais têm demonstrado que receptores muscarínicos estão presentes em todos os órgãos, tecidos ou tipos celulares (Wolfe e Yasuda 1995; Levey 1993). Receptores muscarínicos periféricos estão envolvidos nas ações clássicas da ACh em tecidos ou órgãos que recebem inervação parassimpática (Caulfield 1993). Os mAChRs centrais participam da regulação de um grande número de funções cognitivas, comportamentais, sensoriais, motoras e autonômicas (Levine e Birdsall 2001; Felder e cols. 2000).

## 1.4 Neurotransmissão colinérgica central

Vias colinérgicas centrais são filogeneticamente antigas e anatomicamente distribuídas ao longo de praticamente todo encéfalo. Sua presença é identificada através de marcadores como acetilcolinesteras (AChE), receptores colinérgicos e colina acetiltransferase (ChAT). Baseado na nomenclatura proposta por Mesulam em 1983, há seis principais grupos celulares colinérgicos, nomeados de Ch1 até Ch6 (fig.2).

Ch1 refere-se às células colinérgicas situadas no núcleo septal medial que inervam o hipocampo. Neurônios colinérgicos que partem da extremidade vertical da área de Broca fornecem inervação para o hipocampo, hipotálamo, córtex cingulado e bulbo olfatório e são denominados Ch2. A maioria da inervação direcionada ao bulbo olfatório tem origem na extremidade horizontal da área de Broca, cujo grupo é denominado Ch3. O grupo celular Ch4, denominado núcleo basal magnocellular em ratos e núcleo basal de Meynert em primatas, fornece a principal projeção colinérgica para campos neocorticais e a amígdala. O grupo celular Ch5 origina-se do núcleo pedunculopontino do tronco cerebral rostral e em conjunto com neurônios Ch6, originados do núcleo tegmental laterodorsal, inerva os núcleos reticular intralaminar do tálamo.

Todos núcleos da base apresentam inervação colinérgica. A inervação colinérgica do estriado é principalmente intrínseca, constituída de interneurônios. A inervação de outras estruturas do núcleo basal, como o globus pallidus, o núcleo subtalâmico e a substância nigra pars compacta é exclusivamente extrínseca, originada principalmente dos grupos Ch5-Ch6.

No córtex cerebral de roedores, há interneurônios colinérgicos que respondem por aproximadamente 30% da inervação colinérgica em tal estrutura. Já o córtex cerebral de primatas parece não apresentar inervação colinérgica intrínseca (Mesulam, 1983).

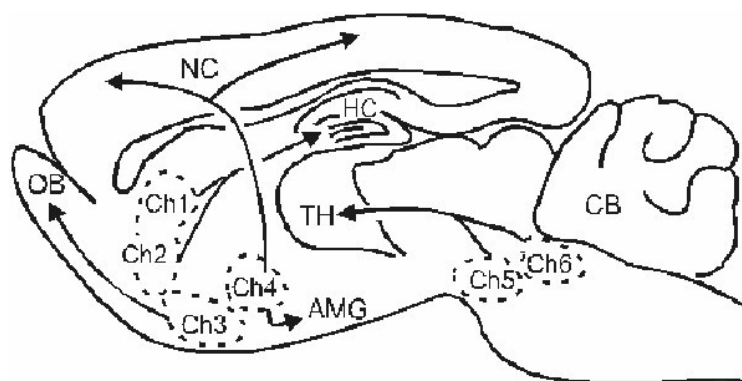


### 1.4.1 Acetilcolina e cognição

A disfunção colinérgica observada na Doença de Alzheimer (DA) fez crescer o interesse em se entender o envolvimento da acetilcolina em funções cognitivas (Mesulam e cols., 2004).

Experimentos de lesão e estudos com administração central de antagonistas muscarínicos indicam que receptores muscarínicos centrais localizados no hipocampo são de importância particular para processos de aprendizado e memória (Bartus cols., 1982; Fibiger e cols., 1991; Iversen e cols., 1997). Uma visão mais abrangente coloca a acetilcolina como um neuromodulador necessário para o processamento e consolidação de novas informações (Hasselmo e cols., 1999).

Capacidades atencionais são mediadas através de circuitos parietais e pré-frontais (Corbetta e cols., 2002). Projeções colinérgicas originadas do prosencéfalo basal representam um componente essencial do sistema de atenção no encéfalo (Everitt e Robbins, 1997; Sarter e cols., 2005). O aumento da liberação de acetilcolina, em eventos que demandam atenção, age amplificando o processamento cortical de sinais oriundos do tálamo (Sarter e cols., 2005). Interessantemente, observa-se um aumento do transporte de colina no córtex pré-frontal medial direito em ratos durante uma tarefa com alta demanda de atenção (Apparsundaram e cols., 2005). O prosencéfalo basal colinérgico é ativado por projeções provenientes de estruturas mesolímbicas, relacionando dessa forma a demanda de atenção com o estado motivacional do indivíduo (Sarter e cols., 2006).



**Figura 2:** Figura representativa da posição dos neurônios colinérgicos no sistema nervoso central de ratos

### 1.4.2. Acetilcolina e aprendizado motor

Na vida diária, nós utilizamos uma variedade de tarefas motoras que são adquiridas gradualmente através da prática e interação com o ambiente. Em animais e humanos, o aprendizado de tarefas motoras é normalmente medido pela redução no número de erros e/ou por uma mudança na cinemática e sinergia dos movimentos (Doyon e cols., 1997; Shadmehr e Holcomb, 1997; Karni e cols., 1996). A maioria das tarefas motoras são adquiridas implicitamente, de forma oposta a outras formas de memória que utilizam conhecimento explícito (memória episódica, por exemplo). Observa-se um padrão de aprendizado lento, que requer várias sessões de treinamento (Karni e cols., 1996). Modelos produzidos a partir de trabalhos realizados com humanos e animais sugerem a participação de diferentes estruturas encefálicas no aprendizado de tarefas motoras. As principais estruturas implicadas são o estriado, cerebelo e regiões motoras corticais (Doyon e cols., 2003)

Uma tarefa classicamente utilizada para avaliar aprendizado motor é o Rotarod acelerado. O animal é colocado sobre um cilindro rotatório que possui velocidade de rotação crescente. A latência para a queda do animal é medida. A avaliação da performance através de vários desafios fornece um índice de aprendizado motor. Defeitos cerebelares resultam em déficit no teste de Rotarod (Mason e Sotelo, 1997), o que foi recentemente confirmado pela inativação específica de células de Purkinje utilizando técnicas de recombinação gênica (Karpova, A. Y. e cols., 2005). Camundongos modelo da Doença de Huntington também apresentam reduzida capacidade de aprendizado nessa tarefa (Nguyen e cols., 2005). Animais nocaute da enzima adenil ciclase 5, uma isoforma relacionada à neurotransmissão dopaminérgica com expressão limitada ao estriado, apresentam aprendizado prejudicado dessa tarefa (Iwamoto e cols., 2003).

A participação da ACh no aprendizado de tarefas motoras ainda é controversa. Em estudo recente, foi demonstrado que lesão do núcleo basal magnocelular reduz as mudanças plásticas geradas no córtex pelo aprendizado de uma tarefa motora, tal déficit correlaciona-se com a dificuldade do aprendizado de tal tarefa nesses animais (Conner e cols., 2003). Uma redução

do conteúdo de acetilcolina estriatal foi observada em ratos com deprivação de vitamina A, esses animais foram incapazes de melhorar suas performances no rotarod (Carta e cols., 2006). Por outro lado, camundongos nocaute para receptores centrais nicotínicos apresentaram uma melhora no aprendizado de tal tarefa (Marubio e Paylor, 2004).

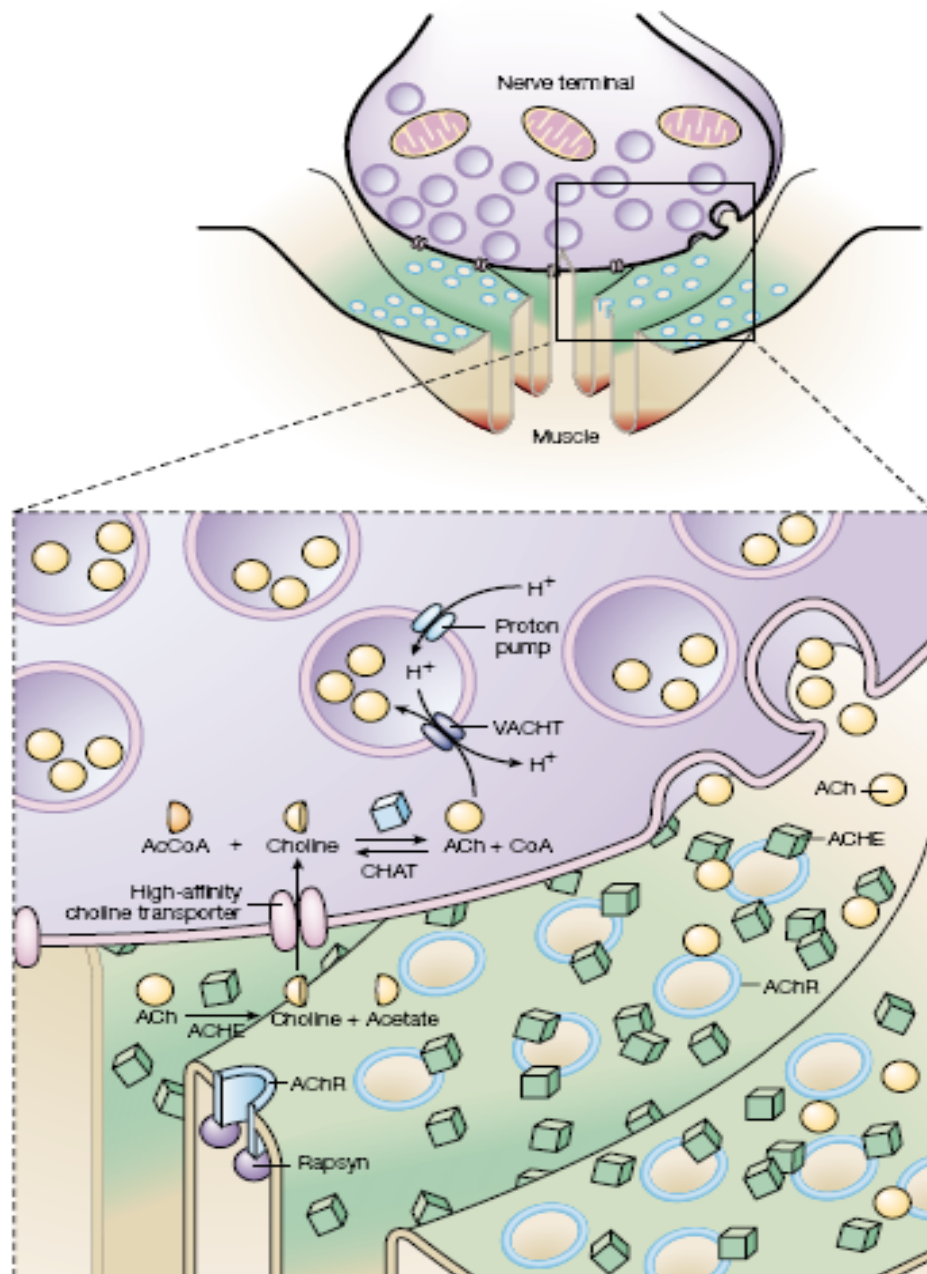
## **1.5 Acetilcolina e a Junção neuromuscular**

A JNM é uma sinapse especializada em transmitir impulsos nervosos do nervo motor, via um transmissor químico, para um órgão efector (Kandel, 2001).

A ACh é o neurotransmissor responsável pela sinalização química na JNM. No terminal do neurônio motor, a ACh está estocada em um grande número de vesículas sinápticas. Resultados de uma variedade de experimentos neurofisiológicos, em junções neuromusculares de rã, sugerem que há pelo menos três “pools” distintos de vesículas contendo ACh. O “pool” prontamente liberável refere-se às vesículas que são imediatamente liberadas sob estimulação. Essas vesículas estão ancoradas à membrana numa região sináptica denominada zona ativa, e correspondem a cerca de 2% das vesículas totais. As vesículas que mantêm a liberação sob estimulação moderada (fisiológica) pertencem ao pool de reciclagem, esse “pool” contem entre 5% e 20% das vesículas totais. As vesículas que são liberadas somente sob estimulação intensa e respondem por 80 a 90% das vesículas no terminal nervoso, são nomeadas como “pool” de reserva (Rizzoli e cols., 2005).

A transmissão na JNM é iniciada quando um potencial de ação axonal induz a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, principalmente do tipo P/Q. O aumento de cálcio resultante desencadeia a exocitose de vesículas sinápticas (McConville e Vincent, 2002; Sudhof, 1994). Um potencial de ação no terminal nervoso estimula a fusão de 50 a 300 vesículas sinápticas (Miledi e cols., 1979). Cada vesícula sináptica libera cerca de 10000 moléculas de ACh (Miledi e cols., 1983). A ACh liberada na fenda sináptica difunde até atingir os receptores nicotínicos. A abertura dos receptores permite a entrada de íons sódio, produzindo um potencial despolarizante, que se adequado levará à abertura de canais de sódio dependentes de voltagem tipo 1,4. O influxo de

íons sódio inicia a geração de um potencial de ação que se espalha rapidamente por todo sarcolema e estimula a liberação de cálcio proveniente de estoques intracelulares. O aumento de cálcio no citosol dá início aos mecanismos moleculares da contração muscular. Paralelamente, no terminal pré-sináptico, a abertura de canais de potássio dependentes de voltagem restaura o potencial de repouso da membrana (Ruff e cols., 2003) (Fig.3).



**Figura 3:** Esquema representando os eventos neuroquímicos envolvidos na transmissão sináptica neuromuscular (Engel A. G. e cols., 2003)

A hipótese da liberação quântica afirma que neurotransmissores são liberados em unidades discretas denominadas quanta (Fatt e Katz 1952), sendo que um quantum representa a exocitose de uma só vesícula sináptica. Apesar do termo “quanta” sugerir que a transmissão seja uniforme e fixa, a distribuição dos quanta exibe um grande coeficiente de variação (revisto por Van der Kloots., 2003). Essa distribuição pode refletir diferenças na quantidade de neurotransmissor presente em cada vesícula, quantidade de vesículas liberadas, e mesmo diferenças na sensibilidade da membrana pós-sináptica (Bekkers e cols. 1990). O interessante é que o tamanho do quanta muda em resposta à atividade (Naves e Van der 2001; Scheuss e cols. 2002) e também pode ser modulado por hormônios (Van der Kloots e cols., 1991). Variações na atividade e expressão de transportadores vesiculares podem representar uma fonte de variação no conteúdo quantal, e conseqüentemente na transmissão sináptica (Reimer e cols., 1998).

Foi demonstrado que receptores pré-sinápticos M1 e M2 presentes no terminal pré-sináptico da JNM podem modular a liberação de ACh. A ativação do receptor M1 geralmente aumenta a liberação, enquanto a ativação do receptor M2 a inibe. O balanço entre as ações modulatória desses dois receptores ainda permanece pouco entendida (Slutsky e cols., 1999; Minic e cols., 2002).

A área da membrana pós-sináptica é aumentada pelo dobramento da membrana em estruturas secundárias. Os receptores estão concentrados no topo dessas estruturas, firmemente ancorados ao complexo protéico relacionado à distrofina através da proteína Rapsina. Receptores de acetilcolina são continuamente reciclados, com receptores antigos internalizados, degradados e substituídos por novos receptores (McConville e cols., 2002). A ligação de anticorpos a receptores acelera a internalização, fato observado na patogenia de *miastenia gravis* (Richmam e cols., 2003).

A acetilcolinesterase, presente na lâmina basal da membrana pós-sináptica e na fenda sináptica, é responsável pelo término da ação da ACh. A concentração de AChE é de aproximadamente 3000 moléculas por micrômetro quadrado, de forma que a maioria da ACh que atinge a fenda sináptica é hidrolisada. A inibição da acetilcolinesterase prolonga a duração de ação da

ACh na membrana pós-sináptica, lentificando o decaimento da corrente de placa motora induzida pela ACh (Silman e cols., 2005).

Estudos de excitação muscular em indivíduos normais sugerem que falhas na transmissão neuromuscular raramente ocorrem, mesmo sob estimulação extrema. Tal confiabilidade da transmissão neuromuscular resulta da liberação de um quantidade de ACh maior que a necessária para iniciar um potencial de ação. O termo margem de segurança é usado como sinônimo desse excesso (Bewik e cols., 2006). Os fatores que governam a margem de segurança podem ser agrupados nas seguintes categorias: aqueles que afetam o número de moléculas de ACh por vesícula sináptica, fatores que afetam os mecanismos de liberação e a eficácia do quanta (Wood e Slater., 2001). Eles incluem variações no número e localização de receptores nicotínicos na placa motora, na distribuição e quantidade da AChE, na estrutura da placa motora, no tamanho do pool de vesículas e na probabilidade de liberação de vesículas contendo neurotransmissor (Maiselli e cols., 2006).

### **1.5.1. Disfunções colinérgicas na JNM**

Apesar da margem de segurança, a JNM pode tornar-se falha em uma variedade de desordens. Como a JNM representa o último elo entre o Sistema nervoso central e o início da atividade motora, doenças que afetam sua função apresentam sérias consequências clínicas (McConville e cols., 2002).

*Miastenia Gravis* é a desordem mais comum afetando a JNM. Fraqueza muscular e fadigabilidade são seus principais sintomas. A doença é causada, na maioria dos casos, por um ataque auto-imune contra receptores nicotínicos na JNM. Sendo o alvo, majoritariamente, o receptor nicotínico da placa motora. Células T helper e células B estão envolvidas na resposta auto-imune, mas o efetor responsável parece ser o anticorpo anti-nAChR (Engel e cols., 2003). Os mecanismos patogênicos envolvem bloqueio do receptor, aceleração da remoção de receptores da membrana pós-sináptica e ativação do sistema do complemento (Vincent e cols., 2005). Em cerca de 10% a 20% dos casos o ataque auto-imune não é direcionado contra nAChRs, mas contra a Proteína quinase músculo específica (Musk) (Hoch W e cols., 2001). Inibidores da AChE são úteis tanto no tratamento quanto no diagnóstico de *miastenia gravis*. O

fármaco Edrofônio, de ação extremamente rápida, é administrado intravenosamente e a melhora da força muscular do paciente é utilizada como critério para o diagnóstico da doença. Para o tratamento é utilizada a Piridostigmina, embora saiba-se que seu efeito seja apenas sintomático e incapaz de alterar a progressão da doença ( Richman e cols., 2003)

Um grupo de desordens heterogêneas denominadas conjuntamente de síndromes miastênicas congênitas (SMC) apresentam características bioquímicas, eletrofisiológicas e clínicas distintas da *miastenia gravis*. SMC podem ser identificadas a partir de sintomas que agravam com o aumento da atividade do indivíduo. Esses sintomas comumente aparecem no nascimento ou início da infância, e envolvem músculos oculares, craniais e dos membros. Casos de SMC são frequentemente acompanhados de um decaimento da resposta eletromiográfica ao potencial de ação muscular composto (PAMC), e de testes negativos para anticorpos contra o receptor nicotínico de acetilcolina, proteína quinase músculo – específica (MUSK) e canais de cálcio do tipo P/Q (Engel e cols., 2003).

Análises genéticas têm apontado alterações em proteínas pré e pós-sinápticas como responsáveis pela patogenia. Os diferentes mecanismos patológicos que levam às SMC são exemplos de como alterações pontuais em diferentes membros da maquinaria colinérgica podem superar os mecanismos de compensação e desencadear o aparecimento de déficits funcionais (Engel e cols., 2003).

A elucidação dos mecanismos patológicos de *miastenia gravis* tem sido obtida através da combinação de estudos clínicos, bioquímicos e principalmente através de modelos animais (Christadoss e cols., 2000; Tuzun e cols., 2006). Um entendimento detalhado de tais mecanismos fornece as bases para o desenvolvimento de uma terapêutica racional, o que vem sendo feito em *miastenia gravis* (Richman e Agius.,2003). Em Miastenia congênita, entretanto, o desenvolvimento de modelos animais ainda é limitado e o tratamento apenas empírico. A geração de animais com redução da liberação de ACh seria uma abordagem interessante, uma vez que em última instância a consequência de disfunções em miastenias congênitas pré-sinápticas são alterações na dinâmica de liberação desse neurotransmissor.

## 1.6 Modelos animais de hipofunção colinérgica

O interesse em se entender a participação da neurotransmissão colinérgica em processos comportamentais levou ao desenvolvimento de diferentes modelos animais. O uso de antagonistas muscarínicos e nicotínicos trouxe valiosas contribuições, mas as limitações geradas pela falta de seletividade e reprodutibilidade de parâmetros farmacocinéticos trouxe dados muitas vezes contraditórios (McGaughy e Sarter, 1998; Hikida e cols., 2001; McIntyre e cols., 2003; Kitabatake e cols., 2003; Hikida e cols., 2003; Gold e cols., 2004).

Uma outra abordagem foi realizada através do uso de excitotoxinas, mas a falta de seletividade contra neurônios colinérgicos limitou as conclusões obtidas a partir desses estudos (Flicker et al. 1983; Hepler et al. 1985). O desenvolvimento de toxinas seletivas para neurônios colinérgicos veio com o intuito de sanar tais limitações, mas a interpretação dos resultados ainda é controversa já que mesmo essas últimas parecem afetar outros grupos neuronais ou não inativam completamente neurônios colinérgicos (McGaughy e Sarter 1998; McGaughy e cols., 2000; Chang e Gold, 2004).

A utilização de camundongos geneticamente modificados em neurociência obteve um grande crescimento nos últimos anos, contribuindo para o conhecimento do papel de sistemas de neurotransmissores em processos comportamentais. As grandes vantagens geradas por essa técnica, especialmente ligadas à especificidade, trouxeram uma nova oportunidade de se gerar um animal modelo de disfunção colinérgica. Dessa forma, diferentes grupos de pesquisa realizaram a inativação de genes importantes para a maquinaria de síntese de ACh.

A inativação do gene responsável pela codificação da ChAT levou à morte precoce dos animais, fato também observado na inativação do gene do transportador de colina de alta afinidade. (Misgeld et al. 2002; Ferguson et al. 2004). Esse fato demonstra a importância da ACh na manutenção da homeostase corporal, porém torna inviável a análise de parâmetros motores e comportamentais nesses animais.



Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem estudado a biologia molecular e as vias celulares utilizadas pelo VACHT no seu direcionamento para vesículas sinápticas (Barbosa Jr e cols., 1999; Santos e cols., 2001; Barbosa e cols., 2002; Prado e cols., 2002; Prado e Prado, 2002). Esse transportador controla o último passo da armazenagem de ACh, representando um alvo ideal para que se obtenha um quadro de hipofunção colinérgica.

Com o objetivo de se obter um modelo de hipofunção colinérgica viável para estudos comportamentais, nosso grupo optou por obter um animal com redução da expressão do VACHT (knockdown), através da alteração da região 5' não traduzida do gene. Dessa forma, foram obtidos animais viáveis, heterozigotos (VACHT KD<sup>HET</sup>) e homozigotos (VACHT KD<sup>HOM</sup>). Animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentaram uma redução na expressão do VACHT de cerca de 45%, enquanto animais VACHT KD<sup>HOM</sup> tiveram uma redução próxima a 65% (Prado e cols., em anexo).

A análise da liberação quantal de ACh na JNM revelou uma pequena alteração na distribuição do tamanho quantal em animais VACHT KD<sup>HET</sup> sem alteração na frequência de MEPPs. Entretanto, observou-se uma redução na amplitude do quantum em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>, bem como uma redução na frequência de MEPPs (Prado e cols., no prelo). Utilizando a técnica de microdiálise, foi demonstrado que animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentaram uma redução de por volta de 30% na liberação de ACh *in vivo*, em estruturas como o estriado e córtex frontal (Prado e cols., em anexo).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as consequências da redução da expressão do transportador vesicular de acetilcolina sobre parâmetros motores em camundongos.

### **2.2. Objetivos específicos**

-Avaliar força muscular e resistência física em camundongos com redução da expressão do VACHT;

-Avaliar o aprendizado motor em camundongos com redução da expressão do VACHT.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1 Animais experimentais**

Foram utilizados camundongos adultos knockdown heterozigotos e homozigotos, e como controle camundongos C57BL/6 normais (wild type) da mesma geração e “background” genético.

Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais. Receberam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 h e escuro a partir das 19:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22°C. As caixas eram trocadas a cada 3 dias. O máximo de precaução foi deliberado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revisado em 1996).

## **3.2 Avaliação da força muscular**

### **3.2.1 Wire-hang**

Os experimentos de “wire-hang” foram realizados conforme descrito por Sango e cols. em 1996. Os animais foram habituados à sala de experimentação e manipulados pelo experimentador pelos menos duas horas antes do experimento. Como aparato, foi utilizada uma grade metálica com espaçamento de 1 cm entre barras de 0,8 mm de diâmetro. Inicialmente o animal foi colocado sobre a grade, a qual foi brevemente agitada para que o animal a agarrasse. A grade foi então invertida e mantida 20 cm acima de uma caixa preenchida com maravalha. Uma altura suficiente para fazer com que o animal se mantenha agarrado à grade, mas incapaz de feri-lo durante a queda. A latência para queda foi medida com o uso de um cronômetro. Para análise dos dados foi respeitado um teto de 60 segundos. Foram utilizados 20 animais selvagens, 12 VACHT KD<sup>HET</sup> e 8 VACHT KD<sup>HOM</sup>. Todos os animais utilizados eram machos e tinham idade entre 3 e 6 meses. A análise estatística foi realizada através do Anova de uma via seguido do teste post-hoc de Bonferroni.

### **3.2.2 Teste de força de agarre**

Para realizar o teste de força de agarre (Fowler e cols., 2002), utilizamos um transdutor de força conectado a um pequeno suporte metálico. O aparelho foi calibrado antes de cada experimento com o uso de pesos de 5, 10, 20, 50, 100 e 200 g. Os animais foram habituados à sala de experimentação 2 horas antes do experimento e manipulados pelo experimentador. Durante o teste, o experimentador manteve o animal seguro pela cauda e o permitiu agarrar o suporte com as patas dianteiras, mantendo o corpo sempre paralelo em relação à superfície. Após manter o animal por dois segundos nessa posição, o examinador aumenta a força continuamente (sempre paralela à superfície) até

que o animal solte o suporte. O pico de força máxima foi registrado automaticamente no momento em que o animal soltou o suporte e foi expresso em gramas força (gf). Cinco testes foram realizados por animal num período máximo de 50 segundos. O maior valor obtido por animal foi utilizado para análise. Foram utilizados 8 animais selvagens, 8 animais VACHT KD<sup>HET</sup> e 8 animais VACHT KD<sup>HOM</sup>. Para avaliar a resposta dos animais a inibidores da AChE, utilizamos outros animais selvagens e VACHT KD<sup>HOM</sup>. Para excluir a possibilidade dos efeitos serem devido à administração, realizamos o experimento 30 minutos após administração do veículo (salina). No dia posterior, o teste foi realizado 30 minutos após a administração de um inibidor da AChE. Foram utilizados os inibidores da AChE Fisostigmina (i.p. 1,0 mg/kg), Piridostigmina (i.p. 0,3 mg/ kg) e Galantamina (s.c 1,0 mg/Kg). Os princípios ativos foram dissolvidos em salina. Foram utilizados 8 animais WT e 8 VACHT KD<sup>HOM</sup> para testes com cada inibidor da AChE. Foram testados somente animais machos, com idade entre 3 e 6 meses. A análise estatística foi realizada através do Anova de uma via seguido do teste post-hoc de Bonferroni.

### **3.3 Aprendizado motor**

#### **3.3.1 Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod)**

Para avaliar o aprendizado motor, utilizamos o Rotarod (Insight Equipamentos. Ribeirão Preto, Brasil). O Rotarod é um cilindro rotatório com raio de espaço de aproximadamente 2,7 centímetros e altura de 40 cm. O aparelho possui 4 baias, com espaço de 3 centímetros para cada camundongo, de modo que quatro animais são avaliados por vez. O camundongo deve caminhar continuamente sobre o cilindro em rotação para evitar a queda. Os animais foram mantidos na sala de experimentação e manipulados pelo experimentador pelo menos 2 horas antes do experimento. Os animais foram inicialmente mantidos sobre os cilindros por 5 minutos, para habituação ao aparato. Cinco minutos após o período de habituação, os camundongos foram

novamente colocados sobre o Rotarod e a velocidade de rotação foi aumentada de 5 a 35 RPM num intervalo de 300 segundos. A latência para queda dos animais foi medida automaticamente através de um sensor mecânico localizado no chão do aparato. Foram realizados dez testes no primeiro dia e 4 testes no segundo, 24 horas após o último teste do primeiro dia. Foram utilizados intervalos de dez minutos entre os testes, com os animais sendo mantidos em suas caixas de origem durante esse tempo. No intervalo entre a troca dos animais o cilindro foi limpo com água. Os testes foram realizados nas últimas cinco horas da fase clara do ciclo circadiano. Foram utilizados 14 animais WT, 8 animais VChT KD<sup>HET</sup> e 8 animais VChT KD<sup>HOM</sup>, todos machos, com idade entre 3 e 6 meses. A análise estatística foi realizada através do Anova de uma via seguido do teste post-hoc de Bonferroni.

### **3.4 Resistência física**

#### **3.4.1 Esteira motorizada**

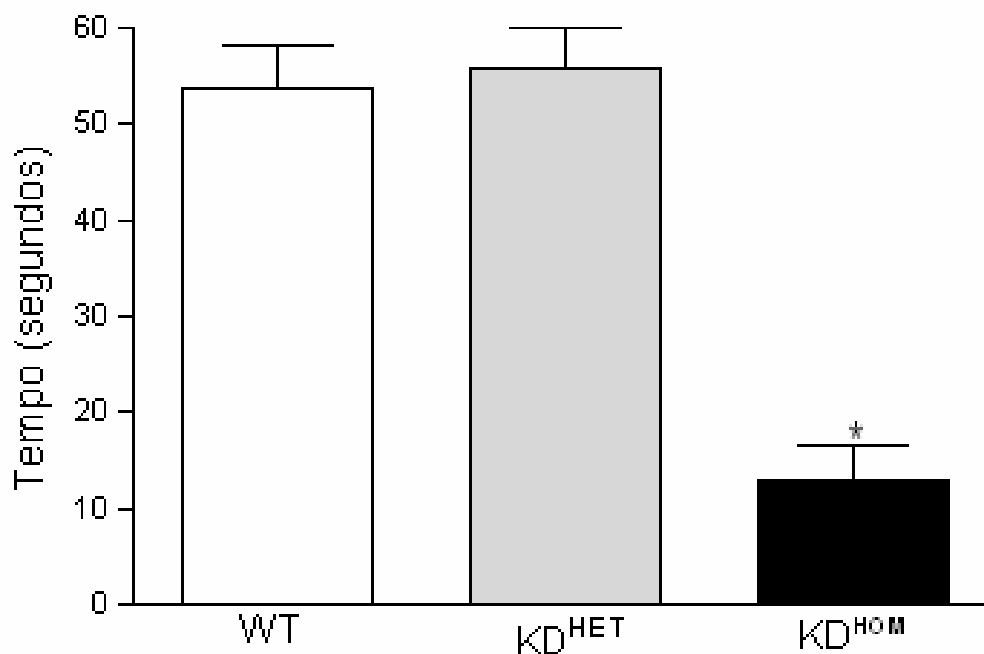
Para avaliar a resistência física dos animais, utilizamos um protocolo de exaustão na esteira motorizada (Insight Equipamentos. Ribeirão Preto, Brasil). Os animais foram mantidos na sala de experimentação e manipulados pelo experimentador pelo menos 2 horas antes do experimento. Os camundongos foram treinados por três dias (3 minutos por dia) e testados no quarto dia. A velocidade inicial e a inclinação da esteira foram gradualmente aumentadas durante o treinamento. No primeiro dia, a inclinação da esteira foi de 5°, com aumento de 5° em cada dia subsequente até que se atingiu 20° no dia de teste. A velocidade inicial de treino, no primeiro dia de teste, foi de 8 m/min com aceleração de 1m/min<sup>2</sup>. No segundo dia de treinamento, a velocidade inicial foi de 10m/min e de 11m/min no terceiro dia. Durante o teste, a velocidade inicial foi de 12 m/min, a qual foi aumentada de 1 m/min nos tempos 2,5,10,20,30,40,50, e 60 minutos após iniciar o exercício (Pederson e cols., 2005). Uma corrente elétrica de pequena intensidade, no fundo de cada baia, mantinha os animais correndo sobre a esteira. Os animais foram retirados da

esteira no momento em que tocavam o fundo das baias por duas vezes num intervalo menor que 5 segundos. O trabalho realizado pelo animal foi calculado através da seguinte fórmula  $W(J) = \text{massa corporal (Kg)} \times \cos 20^\circ \times 9.8 \text{ (J/kg} \times \text{m)} \times \text{distância (m)}$ . Foram utilizados 8 animais WT, 8 VACHT KD<sup>HET</sup> e 8 VACHT KD<sup>HOM</sup>, todos machos com idades entre 3 e 6 meses. A análise estatística foi realizada através do Anova de uma via seguido do teste post-hoc de Bonferroni.

## 4. Resultados

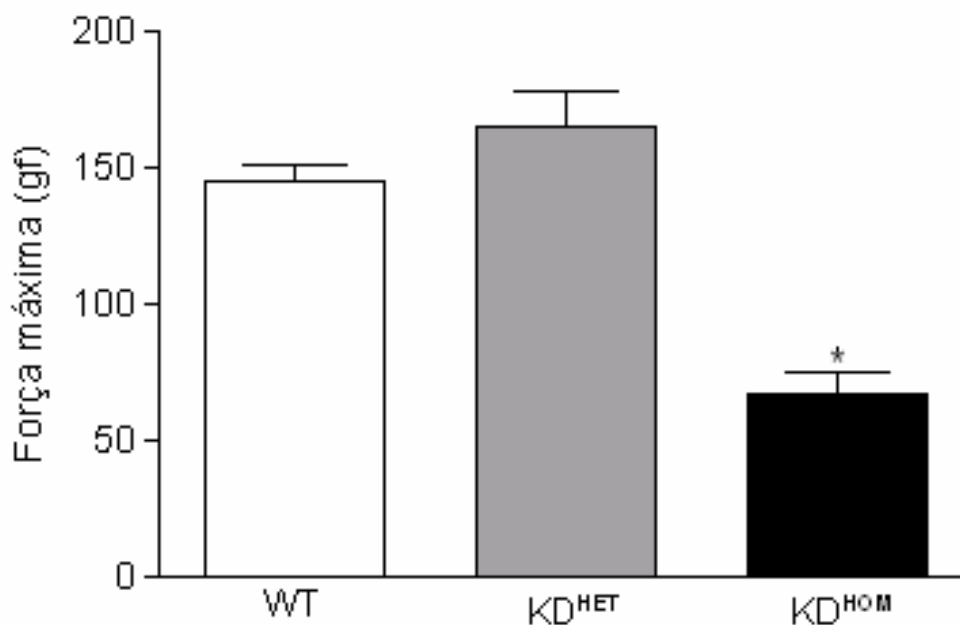
### 4.1 – Força muscular

Para avaliar se as alterações eletrofisiológicas observadas na junção neuromuscular de camundongos mutantes para o VACHT (Prado e cols., em anexo) levaram a alterações funcionais, testamos a performance de animais selvagens e geneticamente modificados em tarefas capazes de mensurar a força muscular. A tarefa de “wire hang” permite detectar anormalidades neuromusculares através da avaliação da capacidade do camundongo em sustentar seu próprio corpo, o que requer força muscular. Nossos resultados demonstraram que animais selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup> não apresentam diferença no parâmetro avaliado. Os animais desses dois genótipos são capazes de sustentar seus corpos por alguns minutos, embora para análise dos dados tenhamos utilizado um teto de 60 segundos. Entretanto, animais VACHT KD<sup>HOM</sup> apresentaram uma latência para queda de apenas cerca de 10 segundos (Fig. 4).



**Figura 4: Tempo dispendido por camundongos selvagens, VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup> sustentando seu próprio corpo** \* significa  $p < 0,05$  em relação a animais selvagens (Anova de uma via seguido por teste post- hoc de Bonferroni  $F[2,37] = 28.77$ ,  $p < 0.001$ ,  $N=20$  animais selvagens, 12 VACHT KD<sup>HET</sup> e 8 VACHT KD<sup>HOM</sup> ).

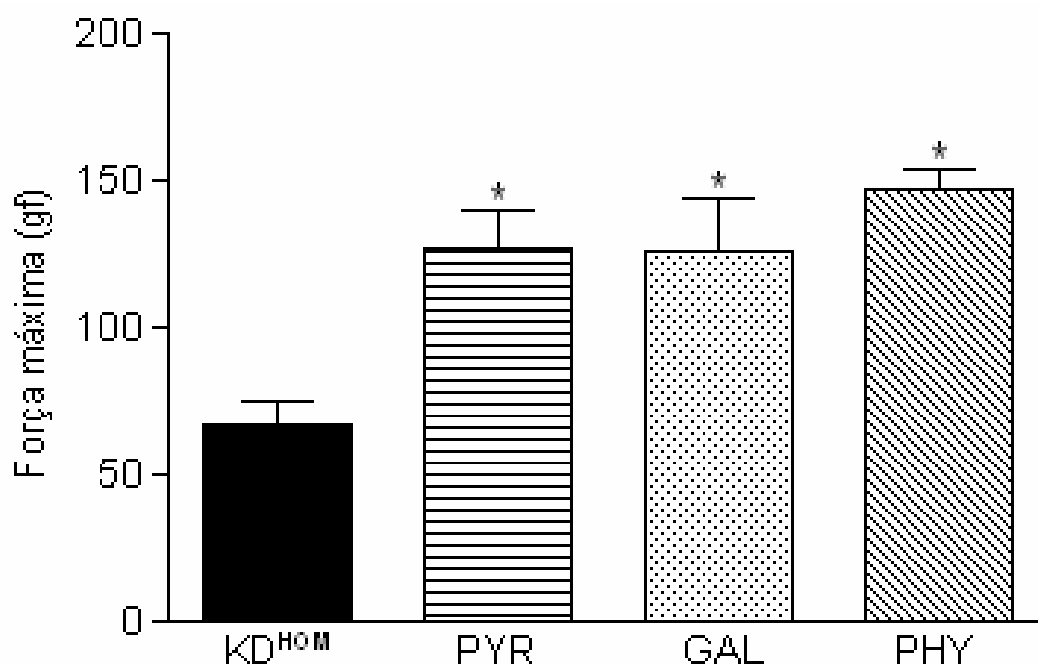
A profunda redução na latência para queda apresentada pelos animais VACHT KD<sup>HOM</sup> ( demonstrada pelo ANOVA de uma via seguido por teste post- hoc de Bonferroni  $F(2, 37) = 28.77$   $p < 0.001$  ) reforçou nosso interesse em utilizar um método de caráter mais quantitativo para avaliar a força muscular em camundongos. Para tal propósito, desenvolvemos junto ao Núcleo de Neurociências da UFMG a aparelhagem necessária para realizar o teste de Força de agarre. Os animais selvagens VACHT KD<sup>HET</sup> apresentaram um valor para a Força de agarre de cerca de 150 gf, não havendo nenhuma diferença estatística entre os grupos. A redução na força muscular em animais VACHT KD<sup>HOM</sup> já antecipada pelo “wire hang”, foi novamente observada pelo teste de Força de agarre ( demonstrado pelo ANOVA de uma via seguido por teste post- hoc de Bonferroni  $[F(3,48)=9.52$   $p < 0.001]$ ). Animais VACHT KD<sup>HOM</sup> foram capazes de desenvolver uma força de apenas 50 gf, aproximadamente (Fig. 4).



**Figura 5: Teste de Força de agarre para camundongos selvagens, VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup>, \* indica diferença estatística quando comparado com camundongos selvagens (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Bonferroni,  $F(3,48) = 9.52$ ,  $p < 0.001$ ). N=8 camundongos selvagens, 8 camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> e 8 camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>.**

A administração de diferentes inibidores da AChE, 30 minutos antes do teste, foi capaz de melhorar temporariamente o déficit observado no Teste de agarre em animais VACHT KD<sup>HOM</sup>. Galantamina (s.c, 1mg/Kg) e Fisostigmina (i.p, 0,3 mg/Kg), inibidores da da AChE de ação geral, levaram a força desenvolvida por esses animais a níveis superiores aos do VACHT KD<sup>HOM</sup> sem o tratamento, e similares aos animais selvagens. Piridostigmina (i.p., 1mg/Kg), um inibidor da AChE de ação predominantemente periférica, teve um efeito que não poder ser diferenciado do efeito gerado pelos outros dois fármacos. (fig 6). A administração de inibidores da AChE não alterou a performance dos animais selvagens (dados não mostrados).



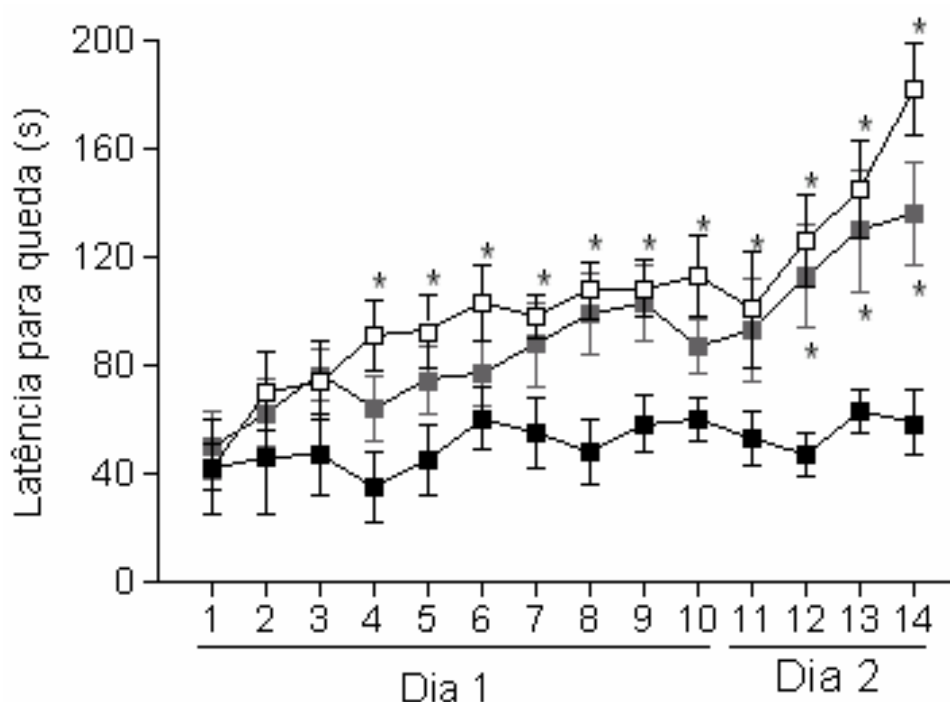


**Figura 6: Teste de Força de agarre para camundongos VChT KD<sup>HOM</sup>, após administração de salina e tratados com Piridostigmina (PYR), Galantamina (GAL) e Fisostigmina (PHY) 30 minutos antes do teste. \*** indica diferença estatística quando comparado com camundongos VChT KD<sup>HOM</sup> após administração do veículo ( ANOVA de uma via com teste post-hoc de Bonferroni ).

### 4.3 – Aprendizado motor

Para avaliar a capacidade de aprendizado de tarefas motoras, utilizamos a tarefa de “Rotarod”. A tarefa requer coordenação motora, capacidade de aprendizado motor e resistência física do animal. Observamos que os camundongos selvagens apresentaram uma melhora progressiva em suas performances ao longo dos “trials”. A análise estatística revela que a partir do quinto trial, a performance desses animais torna-se diferente da performance no primeiro trial (demonstrado pelo ANOVA de uma via com teste post hoc de Bonferroni,  $p < 0.05$ ). O grupo VChT KD<sup>HET</sup> também foi capaz de melhorar sua

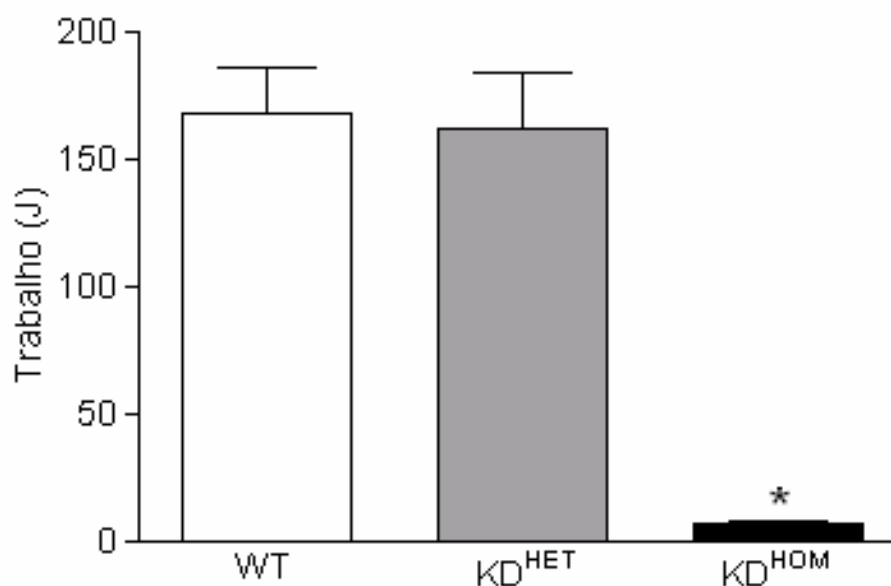
performance, porém só se observa uma melhora estatisticamente significativa no décimo segundo trial ( $F(2,434) = 60.16$ ,  $p < 0.05$  nos trials 12, 13 and 14, demonstrado pelo ANOVA de uma via seguido por teste post hoc de Bonferroni). Os animais VACHT KD<sup>HOM</sup> foram incapazes de melhorar a performance ao longo dos trials. Os três grupos iniciaram os testes com uma latência para queda por volta de 40 segundos, já no último trial avaliado a média de latência para animais selvagens foi de 170 segundos, para VACHT KD<sup>HET</sup> foi de 130 segundos, enquanto animais VACHT KD<sup>HOM</sup> mantiveram os 40 segundos iniciais (Fig 5)



**Figura 7: Performance de camundongos selvagens, VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup> no teste de Rotarod.** \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao primeiro trial de cada genótipo (ANOVA de medidas repetidas,  $p < 0.05$ ). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado à performance de camundongos selvagens (ANOVA de duas vias mostra um efeito do genótipo  $F(2,434) = 60.16$ ,  $p < 0.05$ )

#### 4.4 – Resistência física

A diferença de performance entre os genótipos observada no Rotarod pode refletir diferenças na resistência ao exercício físico prolongado. Para responder a essa pergunta, utilizamos a esteira motorizada. Animais selvagens e VACHT  $KD^{HET}$  foram capazes de permanecer normalmente na esteira por volta de 60 minutos, um valor que quando normalizado pelo peso dos animais corresponde a um gasto de energia de aproximadamente 150 J. Não houve diferença estatística quanto ao trabalho realizado por esses dois grupos. Entretanto, animais VACHT  $KD^{HOM}$  foram incapazes de permanecer sobre a esteira por mais que 5 minutos, em média. Um valor que corresponde a aproximadamente 10 J (Fig.8). Quando retirados da esteira, esses animais se mostraram altamente fadigados.



**Figura 8: Resistência física em camundongos selvagens, VACHT  $KD^{HET}$  e VACHT  $KD^{HOM}$ .** Os dados são expressos em joule. Enquanto animais selvagens e VACHT  $KD^{HET}$  permaneceram por volta de 60 minutos na esteira, camundongos VACHT  $KD^{HOM}$  foram incapazes de correr por mais que 5 minutos. A diferença entre VACHT  $KD^{HOM}$  e selvagens foi altamente significativa, como demonstrado pelo ANOVA de uma via seguido do teste post

hoc de Bonferroni [ $F(2,28)= 22.09$ ,  $p < 0.001$ ]  $N=14$  camundongos selvagens, 8 camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> e 8 camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>.

## 5. Discussão

Diversos estudos em animais e humanos têm demonstrado a intrincada rede de neurotransmissores envolvida com o aprendizado, consolidação e execução de funções motoras. Um balanço entre vários sistemas, principalmente o colinérgico, dopaminérgico e glutamatérgico, parece ser necessário para a manutenção da função motora em parâmetros normais (Hikosaka e cols., 2002). Disfunções colinérgicas centrais estão envolvidas com diferentes patologias com comprometimento motor, como Doença de Parkinson e Doença de Huntington (Quick e Mcintoshi., 2005). Por outro lado, alterações colinérgicas na junção neuromuscular estão presentes nas distintas formas de Miastenia (Sieb, 2005). O tratamento dessas patologias envolve fármacos capazes de atuar sobre a sinapse colinérgica (Rang e cols., 2004). A função da ACh na JNM é bem estabelecida, porém a relação entre hipofunção colinérgica e o aparecimento de déficits funcionais *in vivo* ainda não é bem estabelecida. A geração de animais com redução da expressão do VACHT nos permitiu observar a consequência de diferentes graus de hipofunção colinérgica sobre funções motoras.

Inicialmente, objetivamos avaliar qual o impacto da redução da expressão do VACHT sobre a força muscular. Dados eletrofisiológicos obtidos a partir da JNM do diafragma de animais dos três genótipos, nos deram indícios de um comprometimento relacionado aos níveis de expressão do VACHT. Animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentaram uma alteração moderada em relação ao tamanho do quantum, sem alterações na frequência de potenciais de placa motora em miniatura (MEPP). Já camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> tiveram uma redução significativa da frequência e amplitude do quantum, quando comparados a animais selvagens. A avaliação do processo de exocitose-endocitose de vesículas sinápticas nos três grupos foi incapaz de demonstrar qualquer diferença entre os genótipos. A associação desses dados indica a

ocorrência de uma falha no preenchimento das vesículas colinérgicas em camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>, com animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentando um preenchimento vesicular intermediário entre animais selvagens e VACHT KD<sup>HOM</sup>.

Utilizamos dois testes para avaliar qual o impacto das alterações eletrofisiológicas sobre um parâmetro funcional: a força muscular. Os animais selvagens apresentaram níveis de força muscular, detectados pelo teste de força de agarre, similares aos presentes na literatura para camundongos normais (Fowler e cols., 2002), demonstrando a confiabilidade do sistema desenvolvido no Núcleo de Neurociências. Fomos incapazes de detectar qualquer diferença entre os animais selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>, tanto no “wire hang” quanto no teste de agarre. Esses dados indicam, que embora camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> apresentem alterações eletrofisiológicas moderadas, a redução próxima de 45% na expressão do VACHT foi incapaz de superar a margem de segurança da JNM. A manipulação genética de outras proteínas importantes para a transmissão de sinais na JNM demonstram como pode haver um comprometimento eletrofisiológico sem se observar alterações funcionais. A expressão de canais de cálcio tipo P/Q mutados na JNM de camundongos leva à mudança de parâmetros eletrofisiológicos, como aumento na probabilidade de liberação de vesículas e do tamanho do pool prontamente liberável, porém não observam-se alterações evidentes quanto à força muscular (Kaja e cols., 2005). Alterações pós-sinápticas, através da expressão de receptores nicotínicos com menor probabilidade de abertura do canal, geraram camundongos anormalmente sensíveis ao curare, um antagonista de receptores nicotínicos. Porém, tais animais não apresentaram um quadro de fraqueza muscular (Gomez e cols., 1996).

Por outro lado, a aplicação do “wire hang” e do teste de agarre em animais VACHT KD<sup>HOM</sup> revelou uma redução extremamente significativa da força muscular, quando compara-se a performance desses camundongos à dos animais selvagens e heterozigotos. Camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> foram incapazes de sustentar seus corpos por mais de dez segundos, enquanto animais selvagens e heterozigotos foram capazes de fazê-lo por alguns minutos (embora tenhamos utilizado um teto de 60 segundos). A força de agarre dos camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> representa um terço,

aproximadamente, daquela dos animais selvagens e heterozigotos. Tais dados demonstram que uma redução próxima a 65% da expressão do VAcHT é capaz de gerar alterações na liberação de ACh suficientes para desencadear alterações funcionais. Quando analisa-se o fenótipo apresentado pelos três grupos, demonstra-se que há um nível de tolerância na JNM às reduções na atividade do VAcHT e conseqüentemente na liberação de ACh.

Uma pergunta que deve ser feita quando são observadas alterações funcionais geradas pela redução da liberação de um neurotransmissor “in vivo”, é se as alterações são decorrentes de adaptações ocorridas durante o desenvolvimento do animal ou à menor disponibilidade do neurotransmissor no momento em que a função é avaliada (Chapman, 2002). Nós respondemos a essa pergunta através da administração de fármacos capazes de aumentar temporariamente o nível de ACh na fenda sináptica. Uma classe de fármacos com tal capacidade são os inibidores da AchE. Utilizamos as drogas Galantamina e Fisiostigmina aplicadas 30 minutos antes do Teste de agarre, tanto em animais selvagens quanto em camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup>. Observou-se uma melhora temporária da fraqueza muscular em animais VAcHT KD<sup>HOM</sup>, que não pode ser atribuída a um efeito do veículo ou mesmo da administração da droga “per si”. Como o aumento agudo dos níveis de ACh sinápticos foi capaz de reverter o fenótipo temporariamente, podemos afirmar que o quadro de fraqueza observado é devido principalmente à redução na liberação de ACh e não à alterações desenvolvimentais. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de alterações morfológicas na JNM desencadeadas pela redução do tônus colinérgico, já que animais nocaute para a ChAT apresentaram alterações grosseiras na sinaptogênese neuromuscular (Misgeld e cols., 2002).

A Galantamina é uma droga utilizada no tratamento da DA, e além de inibir a AchE, é um modulador alostérico positivo de receptores nicotínicos (Wilcock e cols., 2000). A Fisiostigmina foi o primeiro fármaco utilizado no tratamento de Miastenia grave, e atualmente é utilizada clinicamente no tratamento de Glaucoma. Ambos fármacos são capazes de penetrar a barreira hematoencefálica (Hoffman & Taylor, 2001), e portanto possuem além de ações periféricas, ações centrais. Dessa forma, embora esses fármacos tenham esclarecido nossa dúvida quanto à origem do déficit apresentado, eles

são incapazes de responder a uma outra pergunta que deve ser feita: o déficit observado é devido à redução do tônus colinérgico central ou periférico? Para responder a essa pergunta, utilizamos a Piridostigmina, um inibidor da AchE de ação predominantemente periférica, utilizado no tratamento de Miastenias de diferentes etiologias. O fármaco, administrado 30 minutos antes do teste, foi capaz de aumentar a força muscular na mesma extensão dos outros inibidores. Por se tratar de uma droga com baixa distribuição no SNC (Hoffman & Taylor, 2001), sugere-se que o déficit apresentado pelos animais é devido, principalmente, à redução do tonus colinérgico na JNM, e não a alterações de origem central.

Para avaliar o desempenho de camundongos VACHT KD em uma tarefa que requer o aprendizado de tarefas motoras, nós utilizamos o Rotarod acelerado. Novamente, fomos capazes de reproduzir, em nossos animais selvagens, os valores obtidos por pesquisadores anteriormente. Os animais selvagens apresentaram um padrão de melhora gradual na performance, com diferença em relação ao primeiro trial já observada no quinto trial. Interessantemente, os animais selvagens foram capazes de manter a mesma performance 24 horas após o último trial. Observamos um aprendizado mais lento dos animais VACHT KD<sup>HET</sup> quando comparados aos animais selvagens, enquanto animais VACHT KD<sup>HOM</sup> foram incapazes de melhorar sua performance ao longo dos desafios. Como a performance no rotarod requer a capacidade de manter a atividade física por um tempo prolongado, o resultado observado poderia ser apenas uma consequência de uma fadigabilidade maior dos animais VACHT KD<sup>HET</sup> e VACHT KD<sup>HOM</sup>. Para excluir tal possibilidade, utilizamos a esteira motorizada. Nesse aparelho, os animais foram mantidos sob atividade até a exaustão. Enquanto os camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> e selvagens não apresentaram diferença em suas performances (por volta de 60 minutos na esteira), animais VACHT KD<sup>HOM</sup> foram incapazes de permanecer na esteira por mais que 5 minutos. Conclui-se, portanto, que o comportamento apresentado pelos animais VACHT KD<sup>HET</sup> no Rotarod foi devido a alterações em mecanismos de aprendizado motor, enquanto a excessiva fadigabilidade dos camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> impossibilita a análise do aprendizado desses animais através do rotarod. A fraca performance dos camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> na esteira pode ser justificada pela fraqueza muscular

observada nesses animais, mas não se deve desconsiderar a possibilidade de disfunções na adaptação autonômica ao exercício.

O déficit de aprendizado dos animais VAcHT KD<sup>HET</sup> correlaciona-se com a redução da liberação de ACh *in vivo*, observada através da técnica de microdiálise (Prado e cols., em anexo). Tais animais também apresentaram prejuízo na memória de reconhecimento social e de objetos, uma alteração de origem claramente central (Prado e cols., em anexo). Outras abordagens também têm demonstrado a importância do sistema colinérgico central no aprendizado de tarefas motoras. Lesões específicas do núcleo basal magnocelular reduz as mudanças plásticas geradas no córtex pelo aprendizado de uma tarefa motora, tal redução correlaciona-se com a dificuldade do aprendizado de tal tarefa nesses animais (Conner e cols., 2003). Em estudo recente, demonstrou-se uma relação entre deprivação de vitamina A e disfunção colinérgica estriatal, com conseqüente prejuízo na performance no rotarod (Carta e cols., 2006).

Os resultados obtidos com a avaliação dos três fenótipos demonstram como diferentes níveis de redução da expressão do VAcHT desencadeiam diferentes níveis de comprometimento neuromuscular. Uma redução de aproximadamente 45% nos níveis de VAcHT foi incapaz de desencadear alterações periféricas, embora precipite o aparecimento de déficits centrais, como observado pelo aprendizado mais lento no rotarod dos animais VAcHT KD<sup>HET</sup> e pelo prejuízo na memória de reconhecimento social. Já uma redução por volta de 65% nos níveis do VAcHT foi capaz de desencadear o aparecimento de sintomas miastênicos, como fraqueza muscular e fadiga frente ao esforço físico.

O animal VAcHT KD<sup>HET</sup> permitirá avaliar através de diferentes protocolos as conseqüências de uma hipofunção colinérgica moderada sobre o aprendizado e consolidação de tarefas motoras., bem como a adaptação da intrincada rede de neurotransmissores envolvidas no aprendizado motor à insuficiência do VAcHT. Já o animal VAcHT KD<sup>HOM</sup> pode representar um novo modelo para o estudo de disfunções que levam à redução da liberação de ACh, como as síndromes miastênicas congênitas pré-sinápticas. Trata-se de um grupo de desordens com diferentes mecanismos etiológicos, mas que convergem para uma redução na disponibilidade de ACh na JNM (Engel,



2003). Recentemente foram descritos dois pacientes portadores de SMC, cuja análise eletrofisiológica demonstrou a redução da liberação quantal de ACh. A análise de genes importantes para o funcionamento normal da maquinaria pré-sináptica foi incapaz de encontrar mutações que justifiquem o fenótipo (Milone e cols., 2006). Interessantemente, as tentativas de tratamento desses pacientes com Piridostigmina obtiveram sucesso apenas inicial, com desenvolvimento de tolerância após 2 meses de terapia. O tratamento crônico desses animais com Piridostigmina pode ser útil na descrição dos mecanismos adaptativos que levam à redução de eficácia do fármaco, e dessa forma contribuir para o desenvolvimento de novas formas de intervenção farmacológica.

## **6. Conclusões**

A avaliação de funções motoras de camundongos deficientes do VACHT permite concluir que:

- Diferentes níveis de deficiência do VACHT são capazes de gerar distintas formas de comprometimento motor;
- As sinapses colinérgicas centrais são mais vulneráveis à redução da expressão do VACHT que a junção neuromuscular;
- Uma redução na expressão do VACHT, capaz de superar a margem de segurança da junção neuromuscular, precipita o aparecimento de sintomas miastênicos;

## 7. Referências bibliográficas

1. Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, Han HP, Rand JB (1993) The Caenorhabditis-Elegans Unc-17 Gene - A Putative Vesicular Acetylcholine Transporter. *Science* 261: 617-619.
2. Apparsundaram S, Ferguson SM, George AL, Blakely RD (2000) Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 862-867.
3. Bales KR, Tzavara ET, Wu S, Wade MR, Bymaster FP, Paul SM, Nomikos GG (2006) Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-A beta antibody. *Journal of Clinical Investigation* 116: 825-832.
4. Barbosa J, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MAM (1999) Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *Journal of Neurochemistry* 73: 1881-1893.
5. Barbosa J, Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SSG, Prado MAM, Prado VF (2002) Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *Journal of Neurochemistry* 82: 1221-1228.
6. Beigneux AP, Kosinski C, Gavino B, Horton JD, Skarnes WC, Young SG (2004) ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *Journal of Biological Chemistry* 279: 9557-9564.
7. Bejanin S, Cervini R, Mallet J, Berrard S (1994) A Unique Gene Organization for 2 Cholinergic Markers, Choline-Acetyltransferase and A Putative Vesicular Transporter of Acetylcholine. *Journal of Biological Chemistry* 269: 21944-21947.
8. Bekkers JM, Richerson GB, Stevens CF (1990) Origin of Variability in Quantal Size in Cultured Hippocampal-Neurons and Hippocampal Slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 5359-5362.
9. Blusztajn JK, Wurtman RJ (1983) Choline and Cholinergic Neurons. *Science* 221: 614-620.
10. Brandon EP, Mellott T, Pizzo DP, Coufal N, D'Amour KA, Gobeske K, Lortie M, Lopez-Coviella I, Berse B, Thal LJ, Gage FH, Blusztajn JK (2004) Choline transporter 1 maintains cholinergic function in choline

acetyltransferase haploinsufficiency. *Journal of Neuroscience* 24: 5459-5466.

11. Brown DA (2006) Acetylcholine. *British Journal of Pharmacology* 147: S120-S126.
12. Carta M, Stancampiano R, Tronci E, Collu M, Usiello A, Morelli M, Fadda F (2006) Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience* 139: 1163-1172.
13. Caulfield MP, Birdsall NJM (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews* 50: 279-290.
14. Cervini R, Houhou L, Pradat PF, Bejanin S, Mallet J, Berrard S (1995) Specific Vesicular Acetylcholine Transporter Promoters Lie Within the First Intron of the Rat Choline-Acetyltransferase Gene. *Journal of Biological Chemistry* 270: 24654-24657.
15. Changeux JP (2003) Molecular mechanisms of nicotine dependence. *Biofutur* 22-25.
16. Chapman PF (2002) Giving drugs to knockout mice: can they do that? *Trends in Neurosciences* 25: 277-279.
17. Cicchetti F, Prensa L, Wu Y, Parent A (2000) Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Research Reviews* 34: 80-101.
18. Conner JM, Culberson A, Packowski C, Chiba AA, Tuszynski MH (2003) Lesions of the basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* 38: 819-829.
19. Darvesh S, Hopkins DA, Geula C (2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 131-138.
20. Dobransky T, Rylett RJ (2005) A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *Journal of Neurochemistry* 95: 305-313.
21. Doyon J, Owen AM, Petrides M, Sziklas V, Evans AC (1996) Functional anatomy of visuomotor skill learning in human subjects examined with positron emission tomography. *European Journal of Neuroscience* 8: 637-648.
22. Doyon J, Penhune V, Ungerleider LG (2003) Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia* 41: 252-262.

23. Engel AG, Ohno K, Sine SM (2003) Sleuthing molecular targets for neurological diseases at the neuromuscular junction. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 339-352.
24. Erickson JD, Varoqui H, Schafer MKH, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB (1994) Functional Identification of A Vesicular Acetylcholine Transporter and Its Expression from A Cholinergic Gene Locus. *Journal of Biological Chemistry* 269: 21929-21932.
25. Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annual Review of Psychology* 48: 649-684.
26. Ferguson SM, Blakely RD (2004) The choline transporter resurfaces: New roles for synaptic vesicles? *Molecular Interventions* 4: 22-37.
27. Ferguson SM, Savchenko V, Apparsundaram S, Zwick M, Wright J, Heilman CJ, Yi H, Levey AI, Blakely RD (2003) Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *Journal of Neuroscience* 23: 9697-9709.
28. Ferguson SM, Bazalakova M, Savchenko V, Tapia JC, Wright J, Blakely RD (2004) Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8762-8767.
29. Fernstrom JD (1981) Effects of Precursors on Brain Neurotransmitter Synthesis and Brain Functions. *Diabetologia* 20: 281-289.
30. Gold PE (2003) Acetylcholine: Cognitive and brain functions. *Neurobiology of Learning and Memory* 80: 177.
31. Gold PE (2003) Acetylcholine: Cognitive and brain functions. *Neurobiology of Learning and Memory* 80: 177.
32. Gold PE (2003) Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory* 80: 194-210.
33. Guermonprez L, O'Regan S, Meunier FM, Morot-Gaudry-Talarmain Y (2002) The neuronal choline transporter CHT1 is regulated by immunosuppressor-sensitive pathways. *Journal of Neurochemistry* 82: 874-884.
34. Hasselmo ME (1999) Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends in Cognitive Sciences* 3: 351-359.
35. Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H (2002) Central mechanisms of motor skill learning. *Current Opinion in Neurobiology* 12: 217-222.

36. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A (2001) Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nature Medicine* 7: 365-368.
37. Hoffman, B.B. & Taylor, P. *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York (2001).
38. Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol 147 2003 147: 1-46.
39. Iwamoto T, Okumura S, Iwatsubo K, Kawabe JI, Ohtsu K, Sakai I, Hashimoto Y, Izumitani A, Sango K, Ajiki K, Toya Y, Umemura S, Goshima Y, Arai N, Vatner SF, Ishikawa Y (2003) Motor dysfunction in type 5 adenylyl cyclase-null mice. *Journal of Biological Chemistry* 278: 16936-16940.
40. Kaja S, Van de Ven RCG, Broos LAM, Veldman H, Van Dijk JG, Verschuuren JJGM, Frants RR, Ferrari MD, Van den Maagdenberg AMJM, Plomp JJ (2005) Gene dosage-dependent transmitter release changes at neuromuscular synapses of Cacna1a R192Q knockin mice are non-progressive and do not lead to morphological changes or muscle weakness. *Neuroscience* 135: 81-95.
41. Karpova AY, Tervo DGR, Gray NW, Svoboda K (2005) Rapid and reversible chemical inactivation of synaptic transmission in genetically targeted neurons. *Neuron* 48: 727-735.
42. Kitabatake Y, Hikida T, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2003) Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 7965-7970.
43. Kraner S, Laufenberg I, Strassburg HM, Sieb JP, Steinlein OK (2003) Congenital myasthenic syndrome with episodic apnea in patients homozygous for a CHAT missense mutation. *Archives of Neurology* 60: 761-763.
44. Levey AI, Wainer BH, Mufson EJ, Mesulam MM (1983) Co-Localization of Acetylcholinesterase and Choline-Acetyltransferase in the Rat Cerebrum. *Neuroscience* 9: 9-22.
45. Liu YJ, Edwards RH (1997) Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporters in PC12 cells but not CHO cells. *Journal of Cell Biology* 139: 907-916.
46. Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH (2006) Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annual Review of Medicine* 57: 513-533.

47. Marubio LM, Paylor R (2004) Impaired passive avoidance learning in mice lacking central neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 129: 575-582.
48. McConville J, Vincent A (2002) Diseases of the neuromuscular junction. *Current Opinion in Pharmacology* 2: 296-301.
49. McGaughy J, Sarter M (1998) Sustained attention performance in rats with intracortical infusions of 192 IgG-saporin-induced cortical cholinergic deafferentation: Effects of physostigmine and FG 7142. *Behavioral Neuroscience* 112: 1519-1525.
50. McGaughy J, Everitt BJ, Robbins TW, Sarter M (2000) The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins. *Behavioural Brain Research* 115: 251-263.
51. Mesulam M (2004) The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: Pivotal factor or side show? *Learning & Memory* 11: 43-49.
52. Mesulam M (2004) The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: Pivotal factor or side show? *Learning & Memory* 11: 43-49.
53. Minic J, Molgo J, Karlsson E, Krejci E (2002) Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase. *European Journal of Neuroscience* 15: 439-448.
54. Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR (2002) Roles of neurotransmitter in synapse formation: Development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36: 635-648.
55. Nai Q, McIntosh JM, Margiotta JF (2003) Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. *Molecular Pharmacology* 63: 311-324.
56. Naves LA, Van der Kloot W (2001) Repetitive nerve stimulation decreases the acetylcholine content of quanta at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology-London* 532: 637-647.
57. Nguyen T, Hamby A, Massa SM (2005) Clioquinol down-regulates mutant huntingtin expression in vitro and mitigates pathology in a Huntington's disease mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11840-11845.
58. Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B, Beyring R, Robb S, Kirkham FJ, Engel AG (2001) Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans (vol 98, pg 2017, 2001). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 5369.

59. Okuda T, Haga T (2000) Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *Febs Letters* 484: 92-97.
60. Parsons SM, Bahr BA, Rogers GA, Clarkson ED, Noremborg K, Hicks BW (1993) Acetylcholine Transporter Vesamicol Receptor Pharmacology and Structure. *Progress in Brain Research* 98: 175-181.
61. Parsons SM (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB Journal* 14: 2423-2434.
62. Prado MAM, Reis RAM, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG (2002) Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International* 41: 291-299.
63. Prado MAM, Reis RAM, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG (2002) Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International* 41: 291-299.
64. Ribeiro FM, Black SAG, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SSG, Prado MAM (2006) The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *Journal of Neurochemistry* 97: 1-12.
65. Ribeiro FM, Black SAG, Cregan SP, Prado VF, Prado MAM, Rylett RJ, Ferguson SSG (2005) Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *Journal of Neurochemistry* 94: 86-96.
66. Richman DP, Agius MA (2003) Treatment principles in the management of autoimmune myasthenia gravis. *Myasthenia Gravis and Related Disorders* 998: 457-472.
67. Rizzoli SO, Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 57-69.
68. Role LW, Berg DK (1996) Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16: 1077-1085.
69. Ruff RL (2003) Neurophysiology of the neuromuscular junction: Overview. *Myasthenia Gravis and Related Disorders* 998: 1-10.
70. Santos MS, Barbosa J, Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SSG, Prado VF, Prado MAM (2001) Trafficking of green fluorescent protein tagged-vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *Journal of Neurochemistry* 78: 1104-1113.
71. Sarter M, Parikh V (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 48-56.
72. Sarter M, Hasselmo ME, Bruno JP, Givens B (2005) Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between

signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Research Reviews* 48: 98-111.

73. Scheuss V, Schneggenburger R, Neher E (2002) Separation of presynaptic and postsynaptic contributions to depression by covariance analysis of successive EPSCs at the calyx of Held synapse. *Journal of Neuroscience* 22: 728-739.
74. Shadmehr R, Holcomb HH (1997) Neural correlates of motor memory consolidation. *Science* 277: 821-825.
75. Sieb JP (2005) Myasthenia gravis: emerging new therapy options. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 303-307.
76. Sieb JP (2005) Myasthenia gravis: emerging new therapy options. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 303-307.
77. Silman I, Sussman JL (2005) Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 5: 293-302.
78. Slutsky I, Parnas H, Parnas I (1999) Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Physiology-London* 514: 769-782.
79. Song HJ, Ming GL, Fon E, Bellocchio E, Edwards RH, Poo MM (1997) Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* 18: 815-826.
80. Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2: 294-302.
81. Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience* 27: 509-547.
82. Taylor e Brown (1999) *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects sixth edition*, Lippincott Williams & Wilkins.
83. Terry AV, Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306: 821-827.
84. Tomaszewicz M, Rossner S, Schliebs R, Cwikowska J, Szutowicz A (2003) Changes in cortical acetyl-CoA metabolism after selective basal forebrain cholinergic degeneration by 192IgG-saporin. *Journal of Neurochemistry* 87: 318-324.
85. Van der Kloot W, Benjamin WB, Balezina OP (1998) Calcitonin gene-related peptide acts presynaptically to increase quantal size and output at frog neuromuscular junctions. *Journal of Physiology-London* 507: 689-695.



86. Van der Kloot W (2003) Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology* 71: 269-303.
87. Vincent A, Leite MI (2005) Neuromuscular junction autoimmune disease: muscle specific kinase antibodies and treatments for myasthenia gravis. *Current Opinion in Neurology* 18: 519-525.
88. Wess J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44: 423-450.
89. Wilcock GK, Lilienfeld S, Gaens E (2000) Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *British Medical Journal* 321: 1445-1449.
90. Wolfe BB, Yasuda RP (1995) Development of Selective Antisera for Muscarinic Cholinergic Receptor Subtypes. *Diversity of Interacting Receptors* 757: 186-193.
91. Wood SJ, Slater CR (2001) Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology* 64: 393-429.
92. Zeisel SH (1981) Dietary Choline - Biochemistry, Physiology, and Pharmacology. *Annual Review of Nutrition* 1: 95-121.