

Sinaptogénese: do cone de crescimento à sinapse neuromuscular

Tiago Henriques-Coelho*, José Soares Fortunato**, Adelino F. Leite-Moreira***

Resumo

A sinapse neuromuscular é abordada relativamente à sua diferenciação, maturação, manutenção e reparação. Os mioblastos diferenciam-se em miotúbulos depois de receberem do meio sinais apropriados. Os axónios dos neurónios motores são guiados para as suas fibras musculares alvo por pistas de orientação, que podem ser atractivas ou repulsivas e livres ou membranares. Após o contacto entre o terminal axonal e a fibra muscular ocorrem inúmeras modificações, nomeadamente o aumento da produção de receptores de acetilcolina e o seu agrupamento ao nível do local da sinapse, induzidas por várias moléculas como é o caso da agrina. Após um período de proliferação dos neurónios motores segue-se um período de apoptose neuronal que depen-

de de vários factores (de salientar a competição por substâncias tróficas). No período pós-natal ocorre a eliminação sináptica durante a qual são removidos os terminais axonais em excesso, permanecendo apenas um. Esta parece realizar-se segundo os princípios Hebbianos apesar de evidências recentes apontarem para a participação de proteases e seus inibidores neste processo. Mesmo após atingirem a maturidade, as sinapses neuromusculares continuam em remodelação contínua. Quando há axotomia ou desnervação parcial de um músculo maduro, as células de Schwann terminais desempenham um papel crucial na reinervação e regeneração neuronal.

Palavras-chave: Sinaptogénese; Sinapse neuro-muscular; Regeneração axonal.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm sido inúmeros os progressos no conhecimento da formação do sistema nervoso. A tecnologia do DNA recombinante, as técnicas de imunofluorescência e de imunocitoquímica têm possibilitado a identificação de novos genes e moléculas. A constatação de que os mecanismos do desenvolvimento do sis-

* Monitor de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

** Professor Associado, Director do Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

*** Professor Auxiliar de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

tema nervoso foram conservados durante a evolução, permitiu o seu estudo em organismos inferiores.

Para descrever o rápido progresso nesta área, o neurologista Martin Raff escreveu *"It is tempting to think that the main principles of neural development will have been discovered by the end of this century and that the cellular and molecular basis of the mind will be the main challenge for the next. An alternative view is that this feeling that understanding is just a few steps away is a recurring and necessary delusion that keeps scientists from dwelling on the extent of the complexity they face and how much more remains to be discovered"*.

Descreve-se, de seguida, a formação, a maturação, a manutenção e a regeneração das sinapses neuromusculares, uma vez que grande parte dos estudos nesta área são realizados com neurónios motores periféricos, principalmente por facilidades técnicas.

Após a formação do neurónio, este migra para novo local e estende o seu axónio em direcção à sua fibra muscular alvo. O cone de crescimento é guiado por várias moléculas que actuam como atractivas e repulsivas. Uma vez atingida a célula, o axónio ramifica-se e estabelece sinapses com a célula muscular. A apoptose (morte celular programada) de neurónios motores e a eliminação sináptica (remoção de terminais pré-sinápticos em excesso) contribuem para o refinamento dos contactos neuronais iniciais e parecem ocorrer por um fenómeno de competição. Mesmo nas sinapses maduras ocorrem modificações pelo uso e muitas destas alterações

sinápticas parecem depender de substâncias tróficas libertadas quer pelas fibras musculares quer pelas células de Schwann terminais.

2. FORMAÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES

A formação da sinapse neuromuscular implica, por um lado, o crescimento do axónio do neurónio motor desde a medula espinal até ao seu músculo-alvo e, por outro, a formação da fibra muscular, fenómenos estes que têm uma concordância temporal.

Os mioblastos esqueléticos têm origem a partir de sómitas específicos numa fase precoce da embriogénese. São estes mioblastos que dão origem às fibras musculares. Assim, os mioblastos condensam-se em miotúbulos num processo que envolve duas fases:

1. Produção de miotúbulos primários que são inervados posteriormente por axónios de neurónios motores;
2. Produção de miotúbulos secundários, que parece estar dependente da actividade neuronal e da actividade eléctrica dos miotúbulos primários.

No entanto, os mioblastos só se diferenciam depois de receberem sinais apropriados do meio. Encontram-se descritos para os mamíferos quatro factores – Myf5, MyoD, miogenina e MRF4 – codificados pela família de genes dos factores reguladores do músculo (MRF). Alguns dos estádios da miogénese são determi-

nados por um único factor miogénico mas existe muitas vezes uma certa sobreposição de acções. Assim, o Myf5 é o primeiro a ser expresso, mesmo antes da diferenciação muscular. O MyoD surge após a forma de mioblasto. A miogenina aparece na altura da fusão dos mioblastos e parece ser mais importante nas fases mais tardias da miogénese⁽¹⁾, não exercendo auto-regulação sobre o seu gene, ao contrário do que se pensava⁽²⁾. Na determinação miogénica, a miogenina e o Myf5 têm funções sobreponíveis⁽³⁾. O MRF4 só é expresso mais tarde, já a nível dos miotúbulos, e o seu promotor é activado pela miogenina e pelo factor de transcrição MEF2⁽⁴⁾. O MRF4 pode activar a sua própria expressão durante os estádios mais precoces da embriogénese⁽⁵⁾. Por outro lado, sabe-se também que a proteína muscular LIM funciona como um co-factor para o MyoD, para a miogenina e para o MRF4, incrementando a interacção destes com elementos reguladores específicos do DNA⁽⁶⁾.

Actualmente, coloca-se também a hipótese da influência hormonal sobre as miofibrilas. Assim, pensa-se que as hormonas tireoideias regulam directamente as famílias de genes para as proteínas contrácteis e para os factores reguladores do músculo e in-duzem interacções do factor de transcrição dos receptores da hormona tireoideia sobre a expressão genética⁽⁷⁾.

Quanto ao tipo de fibras que se formam, podemos considerar, de forma genérica, que os miotúbulos primários tendem a expressar as isoformas lentas da miosina e, por isso,

constituem a maioria das fibras de contracção lenta, enquanto que os miotúbulos secundários tendem a diferenciar-se em fibras de contracção rápida⁽⁸⁾.

Quanto à estrutura, as técnicas de imunofluorescência permitiram identificar que as fibras dos tipos I e IIa (fibras de contracção lenta e rápida respectivamente, resistentes à fadiga) possuíam sinapses neuromusculares (SNMs) menos complexas que as fibras do tipo IIb e IIx6 (fibras de contracção rápida de resistência à fadiga nula ou intermédia, respectivamente) e que existia uma grande sobreposição dos elementos pré- e pós-sinápticos nas placas motoras das fibras de tipo I e IIa⁽⁹⁾.

A constatação de que o modo de distribuição das fibras lentas e rápidas se apresenta igual no feto antes do rearranjo sináptico, ou mesmo em músculos fetais sem inervação⁽¹⁰⁾, sugere que a uniformidade das fibras numa unidade motora reflecte a inervação selectiva de um tipo de fibras pelo neurónio motor (em vez de uma determinação do tipo de fibras pelo nervo). Em mamíferos pós-natais, antes do rearranjo/eliminação sináptica há um forte enviezamento para um dos tipos de fibras e, após secção do nervo em ratos pós-natais, a reinervação por qualquer axónio apresenta uma certa selectividade para apenas um dos tipos de fibras musculares⁽¹¹⁾. Mesmo em adultos, existe um marcado enviezamento na reinervação de um tipo de fibras presente na unidade motora, o que poderá indicar uma combinação de inervação selectiva e conversão de fi-

bras musculares para um tipo predominante⁽¹²⁾.

3. CRESCIMENTO AXONAL

Durante o desenvolvimento embrionário do sistema nervoso, os axónios, por intermédio dos seus cones de crescimento, percorrem distâncias variáveis para encontrarem os seus alvos. O crescimento axonal pode ser caracterizado por dois tipos de comportamento celular: crescimento linear simples ao longo de segmentos, os quais estão interpostos pelos chamados "locais de decisão" onde os axónios podem mudar de direcção. Os primeiros axónios que se desenvolvem, viajam por um meio

livre de axónios mas a maioria dos axónios encontra um meio de expansão já definido pelos primeiros – este crescimento de axónios guiado por pistas de outros axónios denomina-se formação selectiva de fascículos.

Os cones de crescimento (extremidades distais dos axónios em crescimento) parecem ser guiados por quatro mecanismos⁽¹³⁾:

1. atracção por contacto,
2. atracção química,
3. repulsão por contacto,
4. repulsão química.

Deste modo, os axónios respondem a quatro tipos de pistas de orientação: pistas atractivas e repulsivas que podem ser de longo ou de curto alcance (Figura 1). Nas pistas de longo alcance, podemos distinguir a

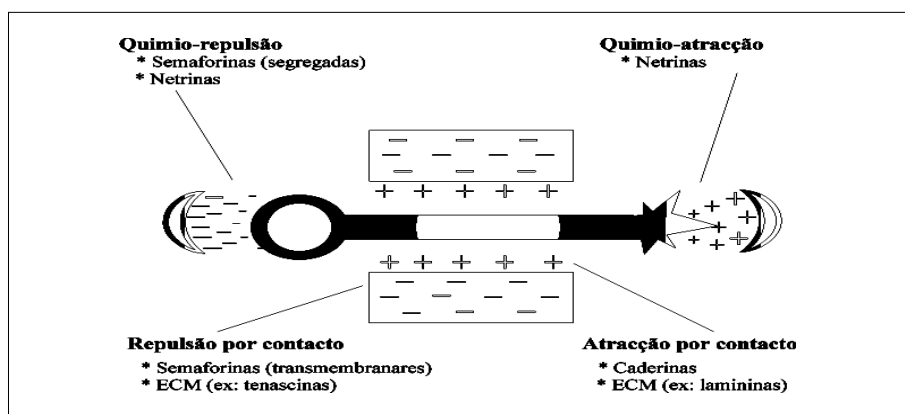


Figura 1 - Quatro tipos de mecanismos que contribuem para a orientação dos cones de crescimento: atracção por contacto, atracção química, repulsão por contacto e repulsão química. O termo atracção (+) refere-se aos efeitos atractivos e permissivos e o termo repulsão (-) aos efeitos inibitórios e repulsivos. São dados alguns exemplos de moléculas implicadas na mediação de cada um dos mecanismos. Algumas são bifuncionais (simultaneamente atractivas e repulsivas). Todas as forças representadas actuam conjuntamente para assegurar uma orientação adequada do cone de crescimento. ECM - Moléculas da matriz extracelular. [A partir de Tessier-Lavigne e Goodman⁽¹³⁾].

atração química – processo mediado por substâncias quimioatrativas segregadas pelas células-alvo (finais ou intermédias) – e a repulsão química – processo mediado por factores segregados pelos tecidos dos quais o axónio se afasta. Os axónios podem também ser guiados a curto alcance por mecanismos de contacto que envolvem moléculas não difusíveis da matriz extracelular e da superfície das células. O axónio em crescimento necessita de um substrato simultaneamente adesivo e permissivo ao seu crescimento. O processo de atração por contacto está também envolvido na formação de fascículos e a repulsão por contacto pode bloquear a migração do axónio⁽¹³⁾. Recentemente demonstrou-se que, na presença de factores que modulam a actividade neuronal pela via do AMPc, a mesma pista de orientação pode desencadear comportamentos diferentes do cone de crescimento⁽¹⁴⁾.

As moléculas envolvidas na orientação axonal, sumariadas no Quadro I, não parecem estar agrupados nas quatro classes de processos considerados anteriormente.

As **netrinas** são moléculas bifuncionais, isto é, são atractivas para alguns axónios e repulsivas para outros⁽¹⁵⁾. Estão já identificados dois genes, o DCC (*deleted in colon carcinoma*) e o Neogenin, candidatos a receptores das netrinas⁽¹⁶⁾.

As **semaforinas** são uma família de moléculas com mais de 30 membros que estão implicadas na orientação do cone de crescimento e podem ser agrupadas estruturalmente em

cinco tipos que incluem formas segregadas (livres) e formas membranares⁽¹⁶⁾. A semaforina I é uma molécula transmembranar que actua como factor repulsivo ou atractivo, de acordo com o subtipo de neurónios⁽¹⁶⁾. A semaforina II actua como inibidor selectivo das arborizações sinápticas⁽¹⁵⁾. A semaforina III (colapsina-1 nos galináceos e semaforina D nos roedores) actua como repulsor químico para populações específicas de neurónios⁽¹⁵⁾ e parece actuar por intermédio de pequenas proteínas da família rho ligadas ao GTP presentes no cone de crescimento⁽¹⁷⁾. As neurofilinas (receptores das semaforinas) são expressas nos axónios que respondem às semaforinas e participam nas interacções axónio-axónio e axónio-célula alvo.

A família **Eph** dos receptores com actividade cínase da tirosina (RTKs) incluem 14 membros classificados em dois grupos (A e B). Os seus ligandos, as **Efrinas**, são também proteínas membranares e subdividem-se em classes A (ligada à membrana pelo glicosilfosfatidilinositol-GPI) e B (transmembranar). Deste modo, as interacções ligando-receptor ocorrem por contacto célula-célula⁽¹⁸⁾. Os receptores Eph e as efrinas participam nas interacções celulares por contacto e estão implicadas na orientação dos axónios entre os pontos de decisão, na fasciculação axonal, na selecção do alvo e na restrição da comunicação intercelular permitindo a manutenção da identidade de populações celulares adjacentes^(19,20). As vias de sinalização activadas pelos recep-

Quadro I. Moléculas envolvidas nos processos de crescimento e orientação axonal
[elaborado a partir de Tessier-Lavigne e Goodman⁽¹³⁾ e actualizado^(16,18)]

<i>Ligandos e/ou receptores implicados na orientação do axónio</i>	<i>Exemplos</i>	<i>Funções desempenhadas</i>
Netrinas e seus receptores		Substâncias bifuncionais segregadas (capazes de atrair alguns axónios e de repelir outros)
Semaforinas e seus receptores (neurofilinas)	Semaforina I	Funções de atracção e repulsão
	Semaforina III	Forte quimiorrepulsor segregado
RPTKs	Receptores Eph e Efrinas	Repulsão por contacto
RPTPs	RPTP β e contactina	Adesão celular e crescimento neuronal
CAMs	N-caderinas, N-CAM e glicoproteínas L1	Sinalização e formação de fascículos
ECMs e seus receptores	ECMs: Laminina, Tenascina, Colagénio, Tombospondina, Fibronectina, Vitronectina	ECMs participam na orientação do axónio Laminina funciona como um substrato permissivo para alguns axónios
	Receptores de ECMs: Integrinas, Imunoglobulinas, Proteoglicanos	Proteoglicanos têm funções de ligandos inibidores à extensão axonal

CAMs, Cell Adhesion Molecules; bFGF, basic Fibroblast Growth Factor; RPTKs, Receptor Protein Tyrosine Kinases; RPTPs, Receptor Protein Tyrosine Phosphatases; ECMs, Extracellular Matrix Molecules.

tores Eph culminam provavelmente na regulação da arquitectura do citosqueleto e das propriedades adesivas das células. A ligação das efrinas da classe B aos seus receptores causa agrupamento mútuo de proteínas, conduzindo à fosforilação da tirosina

em ambas as células, desencadeando uma sinalização bidireccional^(18,21). Relativamente às efrinas da classe A pensa-se que actuam através de cína-ses da família Src⁽¹⁸⁾.

O RPTP β é um membro da família de receptores com actividade

fosfatase da tirosina (RPTPs) e as suas formas membranares e segregadas são expressas pelas células gliais. Ligam-se a um complexo de membrana no neurónio constituído por três componentes: a contactina, a molécula relacionada com a NCAM (NrCAM) e a proteína Caspr⁽¹⁸⁾. A contactina é uma proteína ligada ao GPI e parte das alterações induzidas pela sua ligação ao RPTPb (adesão celular e crescimento neuronal) são mediadas pela Caspr. Por outro lado, esta ligação também pode desencadear um sinal nas células gliais – sinalização bidireccional.

As moléculas cito-adesivas (CAMs) solúveis parecem ter a capacidade de estimular o crescimento neuronal, pelo que estão a ser testadas como agentes terapêuticos na estimulação da regeneração nervosa⁽¹⁷⁾.

A fasciculação selectiva é mediada, em parte, por interações adesivas entre os axónios. As moléculas de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas (ex: L1, NCAM), as caderinas e as moléculas de adesão ao substrato (SAMs) promovem o crescimento e a associação axonal pela activação de cascatas de segundos mensageiros a nível dos neurónios. As acções da NCAM, L1 e N-caderina dependem do receptor do factor de crescimento fibroblástico (FGFR), pela activação directa da actividade de cínase da tirosina^(22,23). Por outro lado, os RTKs e os RPTPs controlam simultaneamente a orientação e a fasciculação, o que sugere a existência de vias intracelulares comuns. A diferença poderá dever-se à actuação

ao nível do cone de crescimento (acção orientadora) ou ao longo do axónio em crescimento (acção estabilizadora, promotora da fasciculação)⁽²³⁾.

Evidências genéticas sugerem que as cínases das tirosinas (TKs) e as fosfatases da tirosina (PTPs) participam na orientação dos cones de crescimento, modificando o seu grau de fosforilação⁽¹⁹⁾.

Os cones de crescimento reorganizam selectivamente o citoesqueleto de actina permitindo um crescimento direccionado. Actualmente, existe grande evidência de que as proteínas da família rho, ligadas ao GTP, estão envolvidas na transdução do sinal dos receptores de membrana para as pistas de orientação e na regulação do citoesqueleto de actina. Os mecanismos de conexão entre as proteínas ligadas ao GTP, os receptores e o citoesqueleto permanecem desconhecidos⁽²¹⁾.

Ao nível dos locais de decisão e plexos, os axónios têm de desfascicular. Sabe-se que ao nível de um plexo, a separação dos vários axónios é muito influenciada pelo grau de poli-sialização dos diferentes axónios. O ácido poli- α 2,8 N-acetil-neuramínico ou ácido poli-siálico (PSA) é um hidrato de carbono de cadeia longa que se liga a moléculas de adesão (como a NCAM). O principal papel do ácido poli-siálico na orientação ao nível dos plexos é permitir que os axónios, por ramificação dos fascículos, respondam melhor a outras moléculas de orientação e aumentem a sua capacidade de estabelecer novos arranjos axonais. Deste modo, níveis

elevados de NCAM nos axónios de neurónios motores sem PSA promovem a formação de fascículos axonais e inibem a ramificação. Por outro lado, níveis elevados de NCAM ligada ao PSA (PSA-NCAM) promovem a ramificação dos fascículos axonal e conduzem a um aumento da ramificação ao nível da fibra-alvo⁽²⁴⁾. O modelo proposto para o papel da PSA-NCAM no crescimento axonal considera que esta atenua as interacções entre as células. Este mecanismo parece estar relacionado com as propriedades físicas do PSA, nomeadamente a sua carga e o seu grau de hidratação. Assim, pensa-se que uma "nuvem" de hidratação diminui as interacções entre as células por interferir com a aposição de membranas de células adjacentes e/ou por prevenir associações moleculares no plano da membrana que são necessárias na adesão eficiente das células⁽²⁵⁾.

O cone de crescimento neuronal é uma estrutura altamente móvel. É um local de sofisticada transdução do sinal, sendo capaz de reconhecer os sinais extra-celulares de orientação e de os transformar directamente em crescimento. A integração de pistas atractivas ou repulsivas de longo ou de curto alcance resulta em formas clássicas de crescimento do cone como avanço, mudança de direcção, afastamento e reconhecimento do alvo⁽²⁴⁾. Os dois componentes principais do citosqueleto são a actina filamentosa (F-actina), com localização predominante no domínio citoplasmático periférico, e os microtúbulos, que se distribuem pelo domínio citoplasmático

central. A motilidade do domínio periférico baseia-se no complexo actina-miosina e envolve três processos distintos: (a) construção de filamentos no *filopodium* principal, (b) fluxo retrógrado de F-actina e (c) reciclagem proximal de F-actina na zona de transição entre os domínios central e periférico (onde há sobreposição de microtúbulos e filamentos de actina). Quando um cone de crescimento se dirige para um substrato atractivo, os seus receptores ligam-se a este, estabelecendo uma ligação funcional com o citosqueleto de actina subjacente, estabilizando-o e atenuando o fluxo retrógrado. A estabilização da actina localizada distalmente gera tensão entre os domínios central e periférico, o que promove o alongamento dos microtúbulos e do *filopodium* principal⁽²⁵⁾. Deste modo, os cones de crescimento podem utilizar CAMs e proteínas de ligação ao citosqueleto para mediar a união substrato-citosqueleto e, assim, regular a direcção e o grau de crescimento. Novas evidências sugerem que as proteínas da família Rho ligadas ao GTP funcionam como agentes de sinalização ligados a pistas extracelulares e de regulação do citosqueleto de actina do cone de crescimento⁽²⁶⁾. As moléculas Cdc 42 e Rac1 parecem estar envolvidas na formação dos *filopodia* e dos *lamellipodia*, respectivamente, enquanto que a RhoA pode estar envolvida na contractilidade da miosina^(27, 28).

Os cones de crescimento expressam também moléculas exploratórias ao nível da membrana para identificarem as pistas de orientação. Deste

modo, o aparelho sensor do cone de crescimento é continuamente renovado por novas moléculas produzidas pelo neurónio e alterações na expressão destas moléculas podem ter um impacto directo sobre a função exploratória do cone de crescimento⁽²⁹⁾.

4. CONTACTO NEUROMUSCULAR

O estabelecimento do contacto neuromuscular parece depender de uma sequência orquestrada de alterações na concentração de moléculas de adesão do nervo e do músculo, que encaminha os axónios às regiões certas das fibras musculares. Este processo pode ser resumido da seguinte forma⁽³⁰⁾:

- a) Desfasciculação axonal no local correcto:
 - moléculas adesivas e anti-adesivas (ex: NCAM; PSA, fasciculina II)
- b) Invasão e fixação ao músculo:
 - factores de crescimento e de *stop* (ex: neurotrofina 3, factor de crescimento neuronal, colapsina 1, efrina A5)
- c) Estabelecimento da localização topográfica correcta dos axónios:
 - efrinas e carboidratos (ex: efrina A2, efrina A5, galactina1)
- d) Ramificação dos axónios no músculo correcto:
 - pistas atractivas e repulsivas (ex: efrinas, caderinas, glúco-conjugados).

- e) Identificação das células musculares correctas pelos axónios:
 - netrinas, conectinas, semaforina II, fasciculina II).

O reconhecimento correcto das células-alvo envolve, provavelmente, um reconhecimento molecular altamente específico enquanto a formação e a localização de possíveis sinapses adicionais são reguladas por *feedback* da fibra muscular. Quando os axónios atingem a célula alvo, param de crescer até que ocorram alterações a nível da expressão de moléculas de adesão celular: há uma expressão aumentada de NCAM e L1 e, mais importante ainda, um aumento da polissialização das NCAMs, o que faz diminuir a adesão entre axónios. Em consequência deste fenómeno, há ramificação dos fascículos do axónio que aumenta ao longo do músculo. O crescimento axonal para as regiões musculares de contracção rápida ou para as regiões de contracção lenta pode ser diferente, reflectindo-se nos diferentes níveis de PSA do nervo⁽²⁴⁾.

A diferenciação estrutural e funcional da SNM é induzida por sinais recíprocos entre o axónio e a fibra muscular: o aumento da libertação pré-sináptica de ACh e de Ca^{2+} livre no axónio é desencadeado por moléculas de membrana ainda não identificadas⁽³¹⁾ e a diminuição da libertação pré-sináptica do neurotransmissor pode ser induzida pela fibra muscular⁽³²⁾; a expressão da proteína cínase C na fibra muscular é regulada trans-sinápticamente pelo terminal nervoso⁽³³⁾.

Mesmo antes dos cones de crescimento contactarem com o músculo alvo são capazes de libertar, espontaneamente ou de forma evocada, os seus neurotransmissores. Uma vez que as células musculares já possuem receptores de ACh (AChRs) por toda a membrana, as respostas pós-sinápticas ocorrem logo após o contacto nervo-músculo, apesar de não haver ainda especializações pós-sinápticas nos locais de libertação⁽³⁴⁾.

A distribuição, estrutura e propriedades biofísicas dos AChRs modificam-se marcadamente durante o desenvolvimento (Figura 2). Os AChRs embrionários têm uma condutância menor mas um tempo de abertura maior, relativamente aos AChRs maduros. A longa duração do período de abertura dos receptores embrionários amplifica muito as correntes sinápticas. No início do desenvolvimento, esta potenciação da eficácia

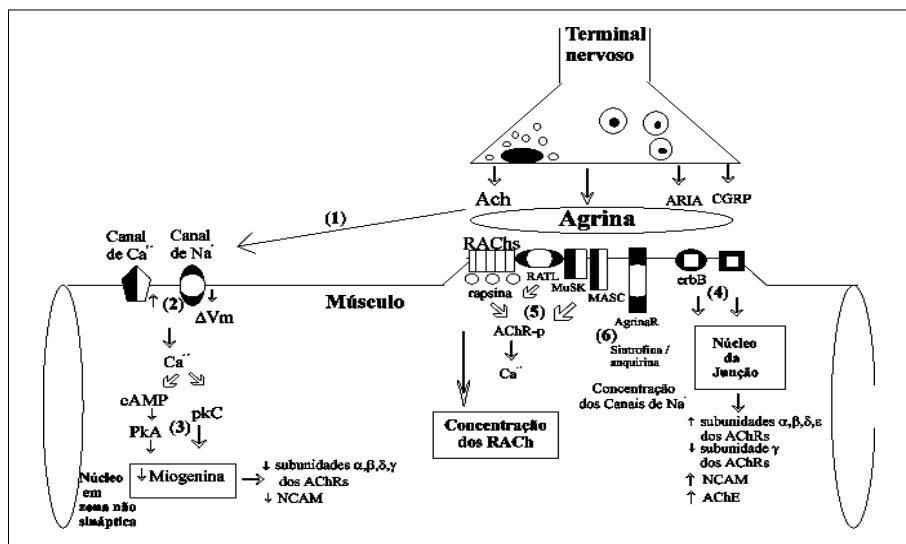


Figura 2 – Passos sequenciais da sinaptogênese. A - À medida que os axónios motores crescem para o músculo, os mioblastos fundem-se em miotúbulos os quais começam a expressar AChRs à sua superfície; o cone de crescimento é capaz de libertar neurotransmissor. B - No contacto inicial, as membranas do botão terminal e da célula muscular ficam em contacto estreito; devido aos AChRs pré-existentes, a libertação de neurotransmissor pelo cone de crescimento desperta potenciais pós-sinápticos cuja amplitude é aumentada pelas propriedades dos AChRs embrionários. C - Os AChRs começam a concentrar-se na sinapse e a lâmina basal começa a formar-se na fenda sináptica com um importante número de moléculas específicas das sinapses (como a agrina). D - Axónios adicionais formam terminações no mesmo local e a lâmina basal diferencia-se; os AChRs tornam-se mais concentrados e mais estáveis na membrana e começam a expressar a forma madura dos receptores; as SCs revestem os terminais. E - A sinapse atinge a maturidade, várias semanas depois do nascimento; apenas um terminal foi mantido; as pregas da sinapse desenvolveram-se pós-sinápticamente e os AChRs estão na forma madura. [A partir de Grinnell (8)].

sináptica, combinada com o acoplamento eléctrico entre as células musculares, é importante para a diferenciação e estabilização da sinapse (provavelmente devida à entrada facilitada de cálcio). Os AChRs têm 5 subunidades: a forma embrionária é formada pelas subunidades α (duas), β , δ e γ enquanto que a forma madura é constituída pelas subunidades α (duas), β , δ e ϵ . A alteração da expressão genética da forma γ para a forma ϵ dos AChRs requer a inervação e parece ser devida à actividade eléctrica da fibra muscular bem como aos factores tróficos neuronais. Antes da inervação, todos os núcleos dos miotúbulos expressam RNAm para as subunidades α , β , δ e γ . Depois da inervação funcional, os núcleos da zona da sinapse aumentam a sua expressão de RNAm das subunidades α , β e δ e deixam de produzir a subunidade γ para começarem a expressar a subunidade ϵ ; os restantes núcleos cessam a produção de RNAm para todas as subunidades dos AChRs. Se ocorrer a desnervação, os núcleos fora da sinapse começam novamente a sintetizar RNAm para as subunidades α , β , δ e γ dos AChRs. Os núcleos da sinapse continuam a produzir RNAm para a subunidade ϵ (e restantes, excepto para a γ) e um conjunto de AChRs da forma ϵ e da forma γ são inseridos na zona da sinapse, a qual mantém uma concentração elevada de AChRs. Depois da reinervação, os receptores extra-sinapse são novamente perdidos, a produção da subunidade γ é suprimida e os AChRs maduros restringem-se à placa motora.

Na SNM madura, os AChRs estão agrupados com alta densidade nas cristas das pregas pós-sinápticas em concordância com os locais pré-sinápticos de libertação de ACh. Nas invaginações das pregas localizam-se os canais de sódio (com uma densidade dez vezes superior à da membrana não sináptica).

O nervo motor é o principal responsável pela acumulação de AChRs na zona da sinapse (Figura 3). A repressão dos genes dos AChRs nas áreas não sinápticas é claramente mediada por uma transmissão colinérgica convencional⁽³⁵⁾. A estimulação neuronal da expressão dos genes dos AChRs é realizada pela proteína ARIA (*AChRs-Inducing Activity*), pelo peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e pelo ácido ascórbico⁽³⁵⁾.

A ARIA é uma proteína da família das neuregulinas (que engloba também o factor de crescimento glial, a heregulina e o factor de diferenciação *neu*) que se acumula na lâmina basal da fenda sináptica⁽³⁶⁾ e que parece actuar sobre a fibra muscular por intermédio do receptor erbB (um RTK)^(35,37). Induz selectivamente o aumento da expressão dos genes das subunidades dos AChRs maduros nos núcleos da sinapse⁽³⁸⁾ através da activação das vias Ras/Proteína activada pelo mitogénio (MAP) e cínase do 3-fosfatidilinositol.

O CGRP estimula a síntese de AChRs através da proteína G ao nível da fibra muscular e induz a expressão de acetilcolinesterase (AChE) na sua forma inactiva^(35,39).

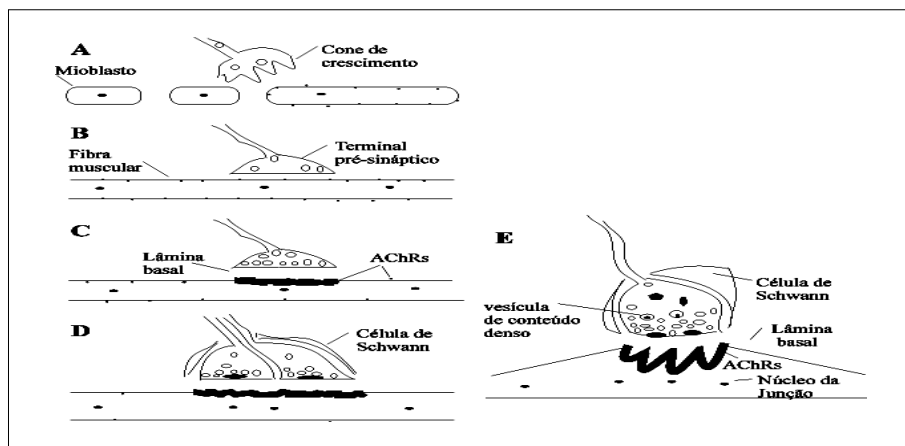


Figura 3 – Diagrama resumo de alguns dos factores que regulam a expressão genética dos AChRs e outras interações tróficas a nível das sinapses neuromusculares de vertebrados. (1) Os terminais nervosos libertam acetilcolina (ACh) a qual, através dos AChRs, despolariza a fibra muscular e permite a entrada de algum cálcio. (2) O ião cálcio actua através da proteína cínase A (PKA) e da proteína cínase C (PKC) para diminuir a expressão dos genes reguladores da miosina nos núcleos extra-sinápticos. (3) Supressão da produção dos AChRs fora da sinapse (a inactividade devido à desnervação ou bloqueio farmacológico reverte esta supressão e leva à produção das subunidades α , β , δ , e γ dos AChRs). (4) Os terminais libertam inúmeras outras moléculas. A destacar, o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e a proteína ARIA (AChRs-Inducing Activity) que actuam através de receptores específicos (o erbB no caso da ARIA), controlando a produção das subunidades dos AChRs maduros pelos núcleos da zona sináptica. (5) A agrina activa o receptor MuSK (receptor cínase da tirosina) que tem como co-receptor o MASC (Myotube-Associated Specificity Component) que está conectado à rapsina pela RATL (Rapsyn Associated Transmembrane Link), conduzindo à fosforilação da tirosina dos AChRs da sinapse (AChRs-p). Um passo dependente do cálcio parece ser importante para o agrupamento dos AChRs. (6) A agrina é também o estímulo que inicia o agrupamento de canais de sódio, provavelmente através da interacção com o receptor da agrina (agrinaR). A sintrofina e a anquirina participam na ancoragem dos canais ao citoesqueleto. NCAM - molécula cito-adesiva neuronal; AChE - acetilcolinesterase [modificado de Grinnell (8)]

Vários estudos demonstram que o nervo induz a redistribuição de AChRs das áreas não sinápticas para os locais de sinapse, conduzindo à sua concentração subsináptica. A agrina é o principal candidato para esta função^(40,41,42,43,44,45,46). A agrina é um proteoglicano de sulfato de heparano, produzido quer pelos neurónios motores quer pelas células musculares, necessário para a formação, organiza-

ção e manutenção das SNMs. Apesar de ambas as isoformas da agrina (neuronal e muscular) poderem contribuir para a diferenciação da SNM⁽⁴¹⁾, provou-se recentemente que a agrina neuronal z+ (contém os exões z) é o indutor crítico da diferenciação pós-sináptica. A isoforma neuronal y+ (contém o local de ligação à heparina) e as isoformas musculares são dispensáveis nas principais fases da sinapto-

génese⁽⁴²⁾. Após libertação pelo neurónio motor, a agrina liga-se à lâmina basal pelo seu terminal amina⁽⁴³⁾; o terminal carboxilo parece ser importante na inibição do crescimento do axónio para permitir o seu ancoramento à placa motora e na indução do agrupamento dos AChRs⁽⁴⁴⁾. A agrina activa um receptor complexo que se pensa ser constituído por um receptor cínase da tirosina (MuSK) e por um componente acessório ainda não identificado mas designado por MASC (*Myotube-Associated Specificity Component*)^(45,46,47,48). A agrina tem múltiplos locais de ligação na célula muscular, incluindo o α -distroglicano, a NCAM, a molécula associada ao crescimento ligada à heparina e certas integrinas. Permanece por estabelecer se algum destes corresponde ao MASC. O α -distroglicano liga-se à laminina extracelularmente e à distrofina intracelularmente, formando uma ligação transmembranar entre a lâmina basal e o citoesqueleto e participa também na ancoragem e acumulação dos AChRs⁽⁴⁹⁾. As integrinas constituem uma classe de receptores transdutores de sinais de proteínas da matriz extracelular. Estudos recentes apontam a integrina $\alpha 7 \beta 1$ como um modulador da transdução do sinal da agrina⁽⁵⁰⁾. O MuSK está ligado à rapsina por uma proteína transmembranar, a RATL (*Rapsyn Associated Transmembrane Link*). A rapsina é uma proteína intracelular periférica que se distribui pelos mesmos locais dos AChRs. Para fosforilar os AChRs necessita, por um lado, da actividade catalítica do MuSK e, por

outro, da rapsina⁽⁵¹⁾. A cínase responsável por esta fosforilação ainda não foi identificada mas a Src é um candidato potencial. Após a fosforilação dos AChRs, a cínase Fyn e a proteína Grb2 podem iniciar outras vias de sinalização intracelulares. A rapsina, para além da função já referida, é capaz de agrupar AChRs por uma via independente da agrina⁽⁵²⁾. A laminina-1 actua por um mecanismo que é independente do utilizado pela agrina mas requer o α -distroglicano⁽⁵³⁾.

A agrina é também o estímulo que inicia o agrupamento dos canais de sódio nas pregas sinápticas, provavelmente através de um receptor específico. A sintrofina e a anquirina estabelecem a ligação dos canais de cálcio com a distrofina e com o citoesqueleto de actina⁽⁴⁵⁾. Outras funções da agrina passam pela activação da transcrição dos AChRs pelos núcleos subsinápticos e pela indução da produção de um sinal trans-sináptico pela fibra muscular que informa o axónio para parar o seu crescimento e se diferenciar num terminal pré-sináptico^(46,47).

Os complexos proteicos associados à distrofina (ex: utrofina) estão altamente concentrados nas SNM. No entanto, a sua importância no agrupamento pós-sináptico dos AChRs foi posta em causa com os resultados de experiências recentes que demonstram que ratos mutantes sem distrofina nem utrofina apresentam SNM praticamente normais em termos morfológicos⁽⁴⁵⁾.

Membros da família das cínases

membranares associadas ao guanilato (MAGUP), como a proteína DLG (dyscs-large), desempenham um papel chave na localização de diversas moléculas na SNM, incluindo receptores, canais iónicos e moléculas de adesão⁽⁵⁴⁾.

As moléculas envolvidas em todo o processo de sinaptogénese encontram-se referenciadas no Quadro II.

Durante o desenvolvimento das SNMs, para além da acumulação dos AChRs, ocorrem outras especializações pós-sinápticas. A acumulação de acetilcolinesterase (AChE) na lâmina basal da fenda sináptica tem como pré-requisito a acumulação de AChRs⁽⁵⁷⁾. A sua síntese está aumentada após a desnervação^(58,59). A nível ultra-estrutural e usando técnicas de imunocitoquímica, verificou-se que

na zona subsináptica da fibra muscular existe um tipo de aparelho de Golgi altamente diferenciado que assegura a maturação das proteínas sinápticas⁽⁶⁰⁾. Também nas vesículas sinápticas variam as moléculas expressas ao longo da sinaptogénese. Assim, enquanto que a syntaxina é importante na formação da SNM, a dinamina é importante na maturação da sinapse⁽⁶¹⁾.

5. APOPTOSE NEURONAL

Após um período de proliferação dos neurónios motores segue-se um período de apoptose, durante o qual um elevado número de neurónios motores morre. Este fenómeno de apoptose parece estar dependente de

Quadro II. **Moléculas concentradas na SNM** [adaptado de Grinnell (8) e actualizado (55, 56, 61)]

<i>Localização e Molécula</i>	<i>Função</i>
Membrana pré-sináptica	
Canais de Ca^{2+} (tipo P nos mamíferos)	Entrada de cálcio para desencadear resposta
Transportador de colina	Recaptação de colina
Canais de K^{+} sensíveis ao Ca^{2+}	Resposta abreviada
Receptores de toxinas	Dispara a libertação de Ca^{2+} (neurexina) ou proteólise do VAM
	SNAP-25 (toxina do tétano)
Receptores para moduladores peptídicos	Modulação da libertação
Membrana das vesículas	
Transportador vesicular de ACh	Captação de ACh pelas vesículas
Dinamina	Reciclagem de vesículas ⁽⁶¹⁾
Syntaxinas	Revestimento de vesículas ⁽⁶¹⁾
Sinaptofisina	Função indeterminada (ancoragem e exocitose de vesículas?) ⁽⁵⁶⁾
	Exocitose de vesículas ⁽⁵⁶⁾
Sinaptobrevina (VAMPs)	Inibidor da exocitose dependente do Ca^{2+}
Sinaptotagmina (p65)	

Quadro II. *continuação*

<i>Localização e Molécula</i>	<i>Função</i>
SV2 Rab3A Proteína com cadeia de cisteína Sinapsina I	Transportador de neurotransmissor Facilita a ancoragem Proteína de fusão membranar Ancoragem das vesículas ⁽⁵⁶⁾ ; maturação dos mecanismos de libertação quântica de neurotransmissor ⁽⁵⁵⁾
ATPase de protões	Condução do transporte do neurotransmissor
Citoplasma do terminal pré-sináptico	
Acetiltransferase da colina	Síntese da ACh
CGRP	Funções tróficas e indutoras
Complexo de ancoragem das vesículas (incluindo o NSF e as SNAPs)	Ancoragem e fusão
Clatrina	Endocitose das vesículas
Região de sinapse da célula muscular	
AChRs	Resposta pós-sináptica
Proteínas de ancoragem dos AChRs (43, 58 e 87 KDa e β -espectrina)	Ancoragem dos AChRs ao citoesqueleto
Proteína 41 KDa	Estabilização dos AChRs
NCAM	Orientação e adesão
Canais de Na ⁺ dependentes da voltagem	Potencial de acção do músculo
Ancirina	Ancoragem dos canais de Na ⁺
Integrinas	Adesão e alinhamento com as ECMs
Proteínas do citosqueleto ligadas às Integrinas (vinculina, talina, paxilina e α -actina)	Ancoragem das Integrinas
Distrofina, Utrofina, β -Distroglicano e complexo de proteínas relacionadas	Citosqueleto muscular-Lâmina basal
Camcinese II	Fosforilações e recrutamento de vesículas
Lâmina basal da sinapse	
AChE	Hidrólise do transmissor
Agrina	Agregação dos AChRs
Sulfato de heparina	Ancoragem da AChE e da agrina
Colagénio tipo IV	Principal ECM das junções
Laminina A	Estimula o crescimento axonal
S-laminina	Liga-se ao axónio e inibe o crescimento
Sulfato de condroitina (TAP-I)	Molécula da matriz extracelular
Entactina sináptica	Desconhecida
Proteína ligada à aglutinina	Desconhecida (provavelmente condução axonal)
Nexina protease 1	Protecção das proteinases
α -Distroglicano	Ancoragem dos AChRs

ACh, acetilcolina; CGRP, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina; AChRs, receptores de ACh; NCAM, molécula cito-adesiva neuronal; AChE, acetilcolinesterase; ECM, molécula da matriz extracelular.

vários factores, como a actividade sináptica, a actividade da fibra muscular e a presença de factores tróficos, produzidos não só pela célula muscular mas também por outras células não neuronais (nomeadamente pelas células gliais). Deste modo, potenciando a libertação de neurotransmissor pelos terminais axonais em animais neonatais, os neurónios motores ficam com maior resistência à lesão⁽⁶²⁾. As neurotrofinas constituem uma família de factores tróficos que influenciam marcadamente a sobrevivência e a diferenciação do sistema nervoso: o factor derivado do cérebro (BDNF) e a neurotrofina-3 (NT-3) aumentam a sobrevivência dos neurónios embrionários de *Xenopus* a nível da espinal medula^(63,64).

Quando os neurónios ficam desprovidos de factores tróficos, é iniciada uma cascata de fenómenos que inclui a diminuição da síntese de macromoléculas, a elevação do c-jun e da ciclina D1 e a activação da BAX. O passo final desta sequência é a activação de caspases, a qual marca o ponto de não retorno a partir do qual os neurónios não podem ser poupados pela elevação de factores tróficos. Estudos recentes sugerem que componentes da apoptose celular possam desempenhar um papel crítico nas doenças neurodegenerativas⁽⁶⁵⁾.

6. ELIMINAÇÃO SINÁPTICA

Após o período de apoptose neuronal, continuam a formar-se fibras musculares secundárias e as ar-

borizações axonais aumentam até as fibras musculares estarem inervadas por três a cinco axónios diferentes na mesma sinapse. Nos mamíferos, durante as primeiras semanas após o nascimento ocorre uma diminuição do número de células musculares inervadas por um dado axónio⁽⁶⁶⁾.

O processo que ocorre a nível das sinapses neuromusculares no sentido de transformar fibras poli-inervadas em mono-inervadas, denomina-se *eliminação sináptica* e funciona como um refinamento da uniformidade das unidades motoras (Figura 4). Nos mamíferos, antes de ocorrer a eliminação sináptica, as unidades motoras contêm fibras de contracção rápida e lenta (apesar de haver normalmente, um forte enviezamento para um tipo de fibras, como já foi referido). Este processo conduz à homogeneização das unidades moto-ras.

Parecem estar envolvidos dois processos: por um lado, a tendência intrínseca para o axónio retirar algumas das suas terminações em excesso e, por outro, a interacção competitiva entre terminais diferentes.

A partir de estudos sobre a remoção de terminais (realizados em animais vivos), verificou-se que, antes dos botões terminais serem retirados, a densidade dos AChRs começava a diminuir pós-sinápticamente. O desmantelamento coordenado das zonas pré- e pós-sinápticas é repetido inúmeras vezes até que permaneça apenas uma sinapse, sendo as restantes removidas. Estas observações implicam três conclusões⁽⁶⁶⁾:

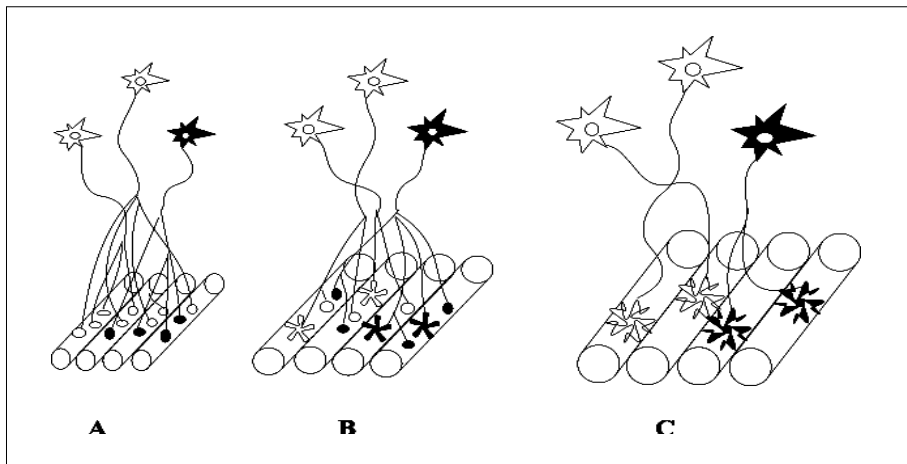


Figura 4 – Fenómeno de eliminação sináptica nas fibras musculares esqueléticas de um mamífero. (A) Ao nascimento, cada placa motora apresenta múltiplos terminais axonais. Após o nascimento, o número de terminais axonais vai diminuindo (B) até que todas as fibras musculares fiquem com apenas um terminal axonal (C) [A partir de Nguyen e Lichtman (58)]

1. Na eliminação sináptica ocorrem alterações pré e pós-sinápticas de forma coordenada;
2. As modificações pós-sinápticas precoces sugerem que o músculo é um intermediário neste processo;
3. A remoção dos terminais não é causa mas sim consequência da eliminação sináptica.

Um modelo para explicar o processo competitivo na perda da inervação polineuronal é o mecanismo *Hebbiano* em que o terminal axonal que despolariza de forma síncrona com a fibra muscular é estabilizado, enquanto que aquele que não despolariza simultaneamente com a célula muscular é removido ⁽⁶⁷⁾. Cada

neurónio tenta manter-se estável e, simultaneamente, destabilizar os seus competidores. Quando dois neurónios inervam uma célula muscular, a estimulação repetida de um dos neurónios conduz à diminuição da força da sinapse do outro neurónio; quando ambos os neurónios são estimulados ou inactivados sincronamente são mantidos os dois ^(66, 67).

Se as diferenças na actividade dos *inputs* que convergem para uma célula-alvo regulam a competição sináptica, então os agentes que modificam a intensidade dos *inputs* que competem terão um papel muito importante. Alguns estudos apontam para a hipótese de que as células musculares e/ou células de suporte da sinapse possam condicionar a activi-

dade sináptica pela libertação de factores difusíveis por retroacção. Foram propostos vários mensageiros (Quadro III). O óxido nítrico (NO), radical livre implicado em várias formas de plasticidade, parece também afectar o desenvolvimento das sinapses neuromusculares (SNMs)⁽⁶⁸⁾. Outros factores, incluindo o ácido araquidónico, a neurotrofina 3 (NT3), o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o factor neurotrófico ciliar (CNTF) e o CGRP participam na modulação da actividade sináptica⁽⁶⁹⁾.

Por outro lado, parece também ocorrer um fenómeno de competição entre os vários terminais nervosos pelos factores tróficos produzidos pelas fibras musculares. Assim, à medida que o nível de produção ou de libertação dos factores de crescimento pelo músculo diminui, estes começam a ser insuficientes para manter todos os terminais e, aqueles que não podem obter o factor em quantidades adequadas, retraem-se⁽⁶⁶⁾.

A evidência de que as proteases e seus inibidores possam estar envolvidos na modificação da força sináptica, implica algumas modificações dos princípios Hebbianos. O modelo protease/inibidor sugere que a célula pós-sináptica activada liberta proteases indiscriminadamente, o que resulta numa perda global da força dos *inputs*. Por seu lado, o terminal pré-sináptico liberta localmente inibidores de proteases (como a nexina I). Os axónios "vencedores" serão aqueles que estão activos mais

vezes e que se conseguem proteger⁽⁷⁰⁾. Recentemente demonstrou-se que a expressão de trombina (produzida pela fibra muscular na forma de protrombina) atinge o seu pico no máximo da remodelação sináptica, e que o seu inibidor hirudina retarda a eliminação sináptica⁽⁷¹⁾.

A eliminação sináptica independente da actividade ocorre na secção do axónio (axotomia). Deste modo, a reinervação de um músculo maduro recapitula o processo de desenvolvimento de inervação múltipla das fibras musculares por diferentes axónios, seguindo-se a eliminação sináptica da maioria destes *inputs*. Esta reinervação é imprecisa e pode ser explicada pela inervação polineuronal das fibras musculares e pela dependência da estabilidade sináptica na actividade. Assim, quando os axónios reinervam a segunda ou terceira junções numa fibra, fazem-no com menos precisão porque a actividade de reconstrução pela reinervação da primeira sinapse torna as restantes junções menos estáveis ou menos atractivas⁽⁷²⁾.

Para além das alterações no grau de poli-inervação, as placas motoras sofrem a maturação das suas propriedades contrácteis: as fibras de contracção lenta e rápida são poli-inervadas de uma forma similar durante as fases inicial e intermédia da eliminação sináptica, o que sugere que é a tensão específica e não a poli-inervação que é diferente entre as fibras de contracção rápida e lenta durante este processo⁽⁷³⁾.

Quadro III. Factores que influenciam a eliminação sináptica [adaptado de Nguyen e Lichtman (66)]

<i>Factor</i>	<i>Nível do factor</i>	<i>Eliminação sináptica</i>	<i>Eficácia</i>	<i>Libertação espontânea</i>	<i>Modelo experimental</i>
Actividade					
Actividade total	↑ ↓	↑ ↓			Roedor Roedor
Actividade do axónio	↑ ↓ ↓	↓ ↑ ↓			Roedor Roedor Roedor
Actividade da célula pós-sináptica	↑ ↓	↑ ↓			Cultura de Xenopus Roedor
Actividade de uma única placa motora	↑+↓	↑			Roedor
Reguladores da eficácia					
NO	↑ ↓	↓ ↑		↓	Cultura de Xenopus Cultura de Xenopus
ATP	↑			↑	Cultura de Xenopus
AA/5-HPETE	↑ ↓		↓	↑ ↓	Cultura de Xenopus Cultura de Xenopus
NT-3	↑		↑	↑	Cultura de Xenopus
BDNF	↑		↑	↑	Cultura de Xenopus
CNFT	↑			↑	Cultura de Xenopus
CGRP	↑	↑			Cultura de Xenopus
Substâncias tróficas					
LIF	↑ ↓	↓ ↑			Roedor Roedor
CTNF	↑	↓			Roedor
OSM	↑	↓			Roedor
bFGF	↑	↓			Roedor
Androgénios	↑ ↓	↓ ↑			Roedor Roedor
Proteases e seus inibidores					
CANP	↑ ↓	↑ ↓			Roedor Roedor
Trombina	↑ ↓	↑ ↓			Roedor Roedor
PNI	↑	↓			Roedor
PA	↑	↑			Cultura de Roedor

AA, ácido araquidónico; BDNF, factor neurotrófico derivado do cérebro; bFGF, factor de crescimento fibroblástico básico; CANP, protease neutral activada pelo cálcio; CGRP, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina; CNTE, factor neurotrófico ciliar; 5-HPETE, 5-hidroxi-6,8,11,14-ácido eicosatetraenóico; LIF, factor inibidor da leucemia; NT-3 neurotrofina-3; OSM, oncostatina M; PA, activador do plasminogénio; PNI, protease nexina I.

7. PLASTICIDADE NEUROMUSCULAR

Mesmo depois da eliminação sináptica, as sinapses neuromusculares mostram uma remodelação contínua com botões axonais que desaparecem e outros que se formam. De facto, as SNMs continuam a mostrar crescimento, retracção e outras formas de remodelação ao longo da vida. As unidades motoras mais fortes contêm muito mais fibras e de dimensões superiores às unidades motoras mais fracas. Além disso, as fibras musculares maiores tendem a ser inervadas por terminais maiores. Deste modo, alguns neurónios motores formam arborizações terminais muito maiores e tendem a ter as junções mais fortes⁽⁷⁴⁾. A força sináptica é, primeiramente, uma função do conteúdo quântico, isto é, do número de quanta de neurotransmissor libertado na excitação pré-sináptica. Em princípio, o tamanho quântico pode ser modificado, para se adaptar às necessidades sinápticas (vários estudos mostram a tendência das fibras grandes terem também tamanhos quânticos unitários grandes)⁽⁷⁵⁾. Por exemplo, o aumento marcado do exercício de um músculo e, conseqüentemente, da actividade neuromuscular modula a expressão de AChE, conduzindo a um aumento adaptativo desta enzima⁽⁷⁶⁾. Durante o período pós-embrionário, as fibras musculares aumentam de tamanho, necessitando de correntes sinápticas maiores. O aumento da corrente sináptica é assegurado pelo aumento do botão pré-sináptico, bem

como pelo aumento do número total dos locais pré-sinápticos activos⁽⁷⁷⁾.

A regeneração nervosa após lesão do neurónio motor depende de múltiplos factores intrínsecos e extrínsecos. Os neurónios axotomizados têm de transitar de um estado de transição para uma situação de crescimento e, portanto, exprimem proteínas associadas com o crescimento como a GAP-43, a tubulina e a actina, bem como novos neuropeptídeos e citocinas, todas com o potencial de promover a regeneração axonal⁽⁷⁸⁾. As fibras musculares em regeneração também emitem um sinal que induz o crescimento direccionado de terminais vizinhos intactos⁽⁷⁹⁾. A própria matriz extra-celular parece contribuir para a regeneração axonal de animais adultos – demonstrou-se que a laminina, o colagénio tipo IV e o proteoglicano sulfato de heparano suportam o crescimento neuronal e que o factor de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1) estimula a regeneração *in vivo*⁽⁸⁰⁾.

Papel indiscutível neste processo têm as células de Schwann (SCs) terminais não mielínicas⁽⁸¹⁾. Estas células são sensíveis à transmissão sináptica que ocorre na SNM e, quando há desnervação do músculo por axotomia, as SCs terminais emitem filamentos para as placas motoras adjacentes, formando uma rede de interligação das placas motoras desnervadas. Os axónios que degeneram crescem em direcção ao músculo, seguindo o endoneuro, reocupam a placa motora mas continuam o crescimento para outras placas motoras

através dos filamentos das SCs^(81,82). Nos músculos parcialmente desnervados (nos quais apenas uma parte das SNMs estão desnervadas, enquanto que a restante permanece inervada), os filamentos das SCs terminais crescem desde as placas motoras desnervadas até às junções que permanecem inervadas (Figura 5). Quando um filamento de uma SC

contacta um terminal inervado induz, normalmente a ramificação do axónio e um ramo deste cresce ao longo do processo até à placa motora onde forma uma nova sinapse^(81,82).

Ao contrário do que acontece nos adultos, a reinervação dos músculos neonatais desnervados é deficiente, não há ramificação axonal e as SCs terminais sofrem um rápido proces-

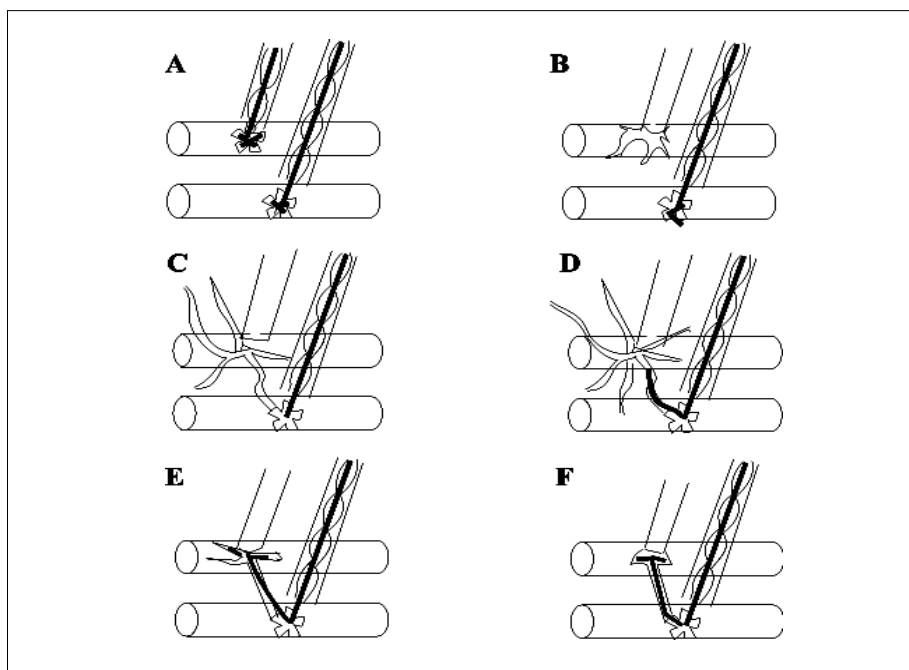


Figura 5 - Papel das células de Schwann terminais (SCs) na estimulação e orientação do crescimento do axónio. **A** - Fibra muscular normal com duas fibras musculares inervadas por dois axónios diferentes; cada axónio está envolvido por uma bainha de mielina até ao terminal onde as ramificações se encontram cobertas por SCs terminais. **B** - A degeneração de um axónio inicia alterações na expressão genética e na estrutura das células de Schwann terminais, as quais começam a desenvolver processos ao longo do eixo da fibra desnervada e em direcção às junções vizinhas. **C** e **D** - Os processos da SCs "activadas" estabelecem contactos com o terminal intacto e induzem o seu crescimento ao longo dos seus processos e em direcção à placa motora desnervada; **E** - Esta fica inervada pelo axónio da fibra vizinha; **F** - Reconversão das células de Schwann "activadas" em células de Schwann terminais. [(72)].

so de apoptose, processo este dependente das interações entre os axónios e as SCs^(81,83). O mediador candidato para esta interacção parece ser o factor de crescimento glial-2 (GGF-2) produzido pelos neurónios motores que actua sobre o seu receptor expresso pelas SCs^(81,84,85). Estes resultados sugerem que as interações tróficas axónio-SC desempenham um papel no desenvolvimento normal do sistema neuromuscular⁽⁸³⁾. Estudos com anticorpos monoclonais mostraram que as SCs sintetizam uma molécula implicada na alteração da expressão das colinesterases sinápticas que parece também implicar as SCs na maturação da SNM⁽⁸⁶⁾.

8. CONCLUSÃO

A sinapse neuromuscular não está ainda totalmente compreendida mas o seu estudo continua a fornecer importantes conhecimentos acerca dos mecanismos envolvidos na comunicação entre nervo e célula muscular-alvo, que resulta na especificidade de conexões e no ajustamento da estrutura e função da sinapse às alterações do meio.

A intensa investigação nesta área do conhecimento conduziu a algumas implicações clínicas e terapêuticas. Deste modo, algumas das moléculas de sinalização identificadas estão a ser testadas na potenciação da regeneração axonal. Vários resultados apontam no sentido do desenvolvimento de estratégias anti-apoptóticas, tendo como alvo a caspase-1, para o tratamento da doença de Alzheimer.

Apesar de se ter avançado consideravelmente no conhecimento dos mecanismos básicos, o futuro passará pela identificação das moléculas envolvidas em todos estes processos, bem como pela clarificação das interações entre elas. Muito está ainda por esclarecer e, provavelmente, por descobrir.

Abstract

We describe the formation, maturation, elimination, maintenance and regeneration of the neuromuscular junction. After receiving appropriate signals from the environment, myoblasts differentiate into myotubes. The growth cones are guided by, at least, four different mechanisms: contact attraction, chemoattraction, contact repulsion, and chemorepulsion. After the contact between the nerve and the muscle, many changes occur, specially an increase in the number of acetylcholine receptors and their clustering on the synaptic area. Different molecules (like agrin) seem to induce these changes. The neural apoptosis occurs after the state of cellular proliferation and depends on many factors, mainly the competition for trophic molecules. After birth, there is synaptic elimination that consists in the removal of the terminals in excess. This seems to occur by an Hebbian mechanism but, recent evidence suggests that proteases and their inhibitors may be involved. The mature synapses are permanently being remodelled. The terminal Schwann cells have an important role in neuronal regeneration of adult neuromuscular junctions of damaged nerves or partially denervated muscles.

Key-words: *Synaptogenesis; Neuromuscular junction; Axonal regeneration.*

BIBLIOGRAFIA

1. Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein WH. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol* 1995; 128: 563-76.
2. Cheng TC, Tseng BS, Merlie JP, Klein WH, Olson EN. Activation of the myogenin promoter during mouse embryogenesis in the absence of positive autorregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 561-5.
3. Wang Y, Jaenisch R. Myogenin can substitute for Myf5 in promoting myogenesis but less efficiently. *Development* 1997; 124: 2507-13.
4. Naidu PS, Ludolph DC, To RQ, Hinterberger TJ, Konieczny SF. Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2707-18.
5. Zhu Z, Miller JB. MRF4 can substitute for myogenin during early stages of myogenesis. *Dev-Dyn* 1997; 209: 233-41.
6. Kong Y, Flick MJ, Kudla AJ, Konieczny SF. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4750-60.
7. Muscat GE, Downes M, Dowhan DH. Regulation of vertebrates muscle differentiation by thyroid hormone: the role of the myoD gene family. *Bioessays* 1995; 17: 211-8.
8. Grinnell AD. Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junctions. *Physiological Reviews* 1995; 75: 789-834.
9. Sieck GC, Prakash YS. Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Can J Appl Physiol* 1997; 22: 197-230.
10. Buckingham M. Which myogenic factors make Muscle?. *Curr Biol* 1994; 4: 61-63.
11. Soileau LC, Silberstein L, Blau HM, Thompson WJ. Reinnervation of muscle fibre types in newborn rat soleus. *J Neurosci* 1987; 7: 4176-4194.
12. Ungeiz GA, Bodine-Fowler S, Roy RR, Pierotti DJ, Edgerton VR. Evidence of incomplete neural control of motor unit properties in cat tibialis anterior after self-reinnervation. *J Physiol Lond* 1993; 472: 103-125.
13. Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science* 1996; 274: 1123-33.
14. Song HJ, Ming GL, Poo MM. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 1997; 388: 275-9.
15. Culotti JG, Kolodkin AL. Functions of netrins and semaphorins in axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 81-88.
16. Cook G, Tannahill D, Keynes R. Axon guidance to and from choice points. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 64-72.
17. Jin Z, Strittmatter SM. Rac1 mediates Collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* 1997; 17: 6256-63.
18. Holland SJ, Peles E, Pawson T, Schlesinger J. Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinase and receptor protein tyrosine phosphatase b. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 117-27.
19. Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 1999; 400: 77-81.
20. Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson DG. In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature* 1999; 399: 267-71.

21. Desai CJ, Sun Q, Zinn K. Tyrosine phosphorylation and axon guidance: of mice and flies. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 70-4.
22. Wash FS, Meiri K, Doherty P. Cell signalling and CAM-mediated neurite outgrowth. *Soc Gen Physiol Ser* 1997; 52: 221-6.
23. Vactor DV. Adhesion and signaling in axonal fasciculation. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 80-6.
24. Rutishanuser U, Landmesser LT. Polysialic acid on the surface of axons regulates patterns of normal and activity-dependent innervation. *Trends Neurosci* 1991; 14: 528-532.
25. Fryer HJL, Hockfield S. The role of polysialic acid and other carbohydrate polymers in neural structural plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 113-118.
26. Luo L, Jan LY, Jan YN. Rho family small GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 81-6.
27. Suter DM, Foscher P. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 106-16.
28. Lin C-H, Thompson CA, Foscher P. Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4: 640-47.
29. Vogt L, Giger RJ, Ziegler U, Kunz B, Buchstaller A, Hermens WTJMC, et al. Continuous renewal of the axonal pathway sensor molecules into the growth cone membrane. *Curr Biol* 1996; 6: 1153-8.
30. Holt CE, Harris WA. Target selection: invasion, mapping and cell choice. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 98-105.
31. Daniels MP. Intercellular communication that mediates formation of the neuromuscular junction. *Mol Neurobiol* 1997; 14: 143-70.
32. Cash S, Zucker RS, Poo MM. Spread of synaptic depression mediated by presynaptic cytoplasmic signaling. *Science* 1996; 272: 998-1001.
33. Hilgenberg L, Yearwood S, Milstein S, Miles K. Neural influence on protein kinase C isoform expression in skeletal muscle. *J Neurosci* 1996; 16: 4994-5003.
34. Chow I, Young SH, Grinnell AD. Target cell contact modulates spontaneous quantal and non-quantal acetylcholine release by *Xenopus* spinal neurons. Plenum Publishing Corporation 1988.
35. Sanes JR. Genetic analysis of postsynaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 93-100.
36. Goodearl AD, Yee AG, Sandrock AW, Corfas G, Fischbach GD. ARIA is concentrated in the synaptic basal lamina of the developing chick neuromuscular junction. *J Cell Biol* 1995; 130: 1423-34.
37. Gassmann M, Lemke G. Neuregulin receptors in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 87-92.
38. Ruegg MA. Agrin, laminin b2 (s-laminin) and ARIA: their role in neuromuscular development. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 97-103.
39. Choi RC, Leung PW, Dong TT, Wan DC, Tsim KW. Calcitonin gene-related peptide increases the expression of acetylcholinesterase in cultured chick myotubes. *Neurosci Lett* 1996; 217: 165-8.
40. Denzer AJ, Hauser DM, Gesemann M, Ruegg MA. Synaptic differentiation: the role of agrin in the formation and maintenance of the neuromuscular junction. *Cell Tissue Res* 1997; 290: 357-65.
41. Godfrey EW, Roe J, Heathcote RD. Overexpression of agrin isoforms in *Xenopus* embryos alters the distribu-

- tion of synaptic acetylcholine receptors during development of the neuromuscular junction. *Dev Biol* 1999; 205: 22-32.
42. Burgess RW, Nguyen QT, Son YJ, Lichtman JW, Sanes JR. Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction. *Neuron* 1999; 23: 33-44.
 43. Denzer AJ, Brandenberger R, Gessmann M, Chiquet M, Ruegg MA. Agrin binds to the nerve-muscle basal lamina via laminin. *J Cell Biol* 1997; 137: 971-83.
 44. Chang D, Woo JS, Campanelli J, Scheller RH, Ignatius MJ. Agrin inhibits neurite outgrowth but promotes attachment of embryonic motor and sensory neurons. *Dev Biol* 1997; 181: 21-35.
 45. Colledge M, Froehner SC. Signals mediating ion channel clustering at the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 357-63.
 46. Ruegg MA, Bixby JL. Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* 1998; 21: 22-7.
 47. Wells DG, Fallon JR. Neuromuscular junctions: The state of union. *Curr Biol* 1996; 6: 1073-5.
 48. Glass DJ, Apel ED, Shah S, Bowen DC, DeChiara TM, Stitt TN, Sanes JR, et al. Kinase domain of the muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) is sufficient for phosphorylation but not clustering of acetylcholine receptors: required role for the MuSK ectodomain?. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8848-53.
 49. Cohen MW, Jacobson C, Godfrey EW, Campbell KP, Carbonetto S. Distribution of α -dystroglycan during embryonic nerve-muscle synaptogenesis. *J Cell Biol* 1995; 129: 1093-101.
 50. Martin P, Sanes J. Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Dev Suppl* 1997; 124: 3909-17.
 51. Glass DJ, Yancopoulos GD. Sequential roles of agrin. MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 379-84.
 52. Gautam M, Noakes PG, Mudd J, Nichol M, Chu GC, Sanes JR, et al. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 1995; 377: 232-6.
 53. Sugiyama JE, Glass DJ, Yancopoulos GD, Hall ZW. Laminin-induced acetylcholine receptor clustering: an alternative pathway. *J Cell Biol* 1997; 139: 181-91.
 54. Broadie K. Forward and reverse genetic approaches to synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 128-38.
 55. Valtorta F, Iezzi N, Benfenati F, Lu B, Poo MM, Greengard P. Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 261-70.
 56. Walch-Solimena C, Jahn R, Sudhof TC. Synaptic vesicle proteins in exocytosis: what do we know?. *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3: 329-36.
 57. De La Porte S, Chaubourt E, Fabre F, Poulas K, Chapron J, Eymard B et al. Accumulation of acetylcholine receptors is a necessary condition for normal accumulation of acetylcholinesterase during in vitro neuromuscular synaptogenesis. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 1631-43.
 58. Rimer M, Randall WR. Denervation of chicken skeletal muscle causes an increase in acetylcholinesterase mRNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 251-5.
 59. Tsim KW, Choi RC, Dong TT, Wan DC. A globular, not asymmetric, form of acetylcholinesterase is expressed in

- chick motor neurons: down-regulation toward maturity and after denervation. *J Neurochem* 1997; 68: 479-87.
60. Antony C, Huchet M, Changeux JP, Cartaud J. Developmental regulation of membrane traffic organization during synaptogenesis in mouse diaphragm muscle. *J Cell Biol* 1995; 130: 959-68.
 61. Noakes PG, Chin D, Kim SS, Liang S, Phillips WD. Expression and localisation of dynamin and syntaxin during neural development and neuromuscular synapse formation. *J Comp Neurol* 1999; 410: 531-40.
 62. Greensmith L, Dick J, Emanuel AO, Vrbova G. Induction of transmitter at the neuromuscular junction prevents motoneuron death after a axotomy in neonatal rats. *Neuroscience* 1996; 71: 213-20.
 63. Ming G, Lohof AM, Zheng JQ. Acute morphogenic and chemotropic effects of neurotrophins on cultured embryonic *Xenopus* spinal neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 7860-71.
 64. Johnson F, Hohmann SE, DiStefano PS, Bottjer. Neurotrophins suppress apoptosis induced by deafferentation of an avian motor-cortical region. *J Neurosci* 1997; 17: 2101-2111.
 65. Bergeron Louise, Yuan J. Sealing one's fate: control of cell death in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 55-63.
 66. Nguyen QT, Lichtman JW. Mechanism of synapse disassembly at the developing neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6:104-12.
 67. Jennings CG, Burden SJ. Development of neuromuscular synapse. *Curr Opin Biol* 1993; 3: 75-81
 68. Wang T, Xie Z, Lu B. Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. *Nature Lond* 1995; 374: 262-66.
 69. Fitzsimonds RM, Poo M-M. Retrograde signaling in the development and modification of synapses. *Physiol Rev* 1998, 78: 143-70.
 70. Liu Y, Fields RD, Fitzgerald S, Festoff BW, Nelson PG. Proteolytic activity, synapse elimination and the Hebb synapse. *J Neurosci* 1994; 25: 325-35.
 71. Zoubine MN, Ma JY, Smirnova IV, Citron BA, Festoff BW. A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev Biol* 1996; 179: 447-57.
 72. Astrow SH, Pitaevski V, Herrera AA. Precision of innervation and synaptic remodeling observed in neuromuscular junction of living frogs. *J Neurosci* 1996; 16: 5130-40.
 73. Cramer KS, Van Essen DC. Maturation of fast and slow motor units during synapse elimination in rabbit soleus muscle. *Dev Biol* 1995; 171: 16-26.
 74. Grinnell AD. Synaptic plasticity following motor nerve injury in frogs. *Current Status Peripheral Nerve Regeneration* 1988; 223-34.
 75. Wilkinson RS, Lunin SD, Stevermer JJ. Regulation of single quantal efficacy at the snake neuromuscular junctions. *J Physiol Lond* 1992; 448: 413-436.
 76. Sveistrup H, Chan RY, Jasmin BJ. Chronic enhancement of neuromuscular activity increases acetylcholinesterase gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995; 269: C856-62.
 77. Davis GW, Goodman CS. Genetic analysis of synaptic development and plasticity: homeostatic regulation of synaptic efficacy. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 149-56.
 78. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol* 1997; 14: 67-116.

79. Van Meir P, Lichtman JW. Regenerating muscle fibers induce directional sprouting from nearby nerve terminals: studies in living mice. *J Neurosci* 1994; 14: 5672-86.
80. Tonge DA, Golding JP, Edbladh M, Kroon M, Ekstrom PE, Edstrom A. Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals *in vitro*. *Exp Neurol* 1997; 146: 81-90.
81. Balice-Gordon RJ. Schwann cells: dynamic roles at the neuromuscular junction. *Curr Biol* 1996; 6: 1054-6.
82. Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci* 1996; 19: 280-5.
83. Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junction is regulated by glial growth factor. *Nature* 1996; 379: 174-7.
84. Trachtenberg JT, Thompson WJ. Nerve terminal withdrawal from rat neuromuscular junctions induced by neuregulin and Schwann cells. *J Neurosci* 1997; 17: 6243-55.
85. Mahanthappa NK, Anton ES, Matthew WD. Glial growth factor 2, a soluble neuregulin, directly increases Schwann cell motility and indirectly promotes neurite outgrowth. *J Neurosci* 1996; 16: 4673-83.
86. Chapron J, De La Porte S, Delépine, Koeing J. Schwann cells modify expression of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase at rat neuromuscular junctions. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 260-70.