

ALTERAÇÕES DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR EM MIOPATIAS EXPERIMENTAIS NO CAMUNDONGO

LUIZ FERNANDO BLEGGI TORRES *

RESUMO — As alterações morfológicas observadas em junção neuromuscular de dois modelos de miopatia em camundongos são estudadas por métodos histoquímicos para demonstrar atividade da enzima acetilcolinesterase e por microscopia eletrônica. Em ambas as situações os resultados obtidos são similares, indicando que a junção neuromuscular permanece intacta mesmo quando a fibra que inerva está sofrendo necrose. Em fibras musculares regeneradas há acentuada simplificação das pregas pós-sinápticas, com redução de até 50% dos valores normais, comprovado por estudos morfométricos. A ausência de repercussões fisiológicas ou clínicas detectáveis nesses modelos, apesar da significativa hipotrofia da membrana pós-sináptica, sugere que a exuberante quantidade de pregas pós-sinápticas normalmente encontradas nas junções mioneurais pode representar mecanismo anatômico de segurança na transmissão química neuromuscular.

The neuromuscular junction in experimental myopathies in the mouse.

SUMMARY — Morphological abnormalities of the neuromuscular junction in two murine models with primary myopathy were studied by combined cholinesterase-silver impregnation techniques and electron microscopy. In both situations the results were similar showing that the neuromuscular junction remained unaffected even when innervating necrotic muscle fibres. In regenerated muscle fibres, however, there was marked simplification of the post-synaptic membrane with reduction in number and depth of folds up to 50% of normal values confirmed by morphometric analysis. Since after regeneration succeeded no detectable clinical or physiological alterations were observed in these experiments it seems reasonable to assume that the prominent branching of post-synaptic folds in normal skeletal muscles might represent an increased anatomical safety mechanism in chemical transmission.

A junção neuromuscular (JNM) é região especializada de transmissão do potencial de ação do nervo periférico para a musculatura esquelética. O conhecimento de seus mecanismos de adaptação e plasticidade diante de diversas doenças neuromusculares permanece no campo especulativo. No presente estudo demonstramos alterações morfológicas significativas observadas na JNM de fibras musculares esqueléticas em dois modelos experimentais, o camundongo mutante 'mdx' portador de uma miopatia congênita⁴¹ e camundongos tratados com fração fosfolipásica do veneno da serpente do mar *Enhydryna schistosa*⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais — Um total de 29 camundongos 'mdx' com idades variando de 3 semanas a 12 meses e 27 camundongos C57B1/10 controles foram incluídos neste estudo. Além destes animais 24 camundongos Balb C adultos receberam doses intramusculares de 0,03 microgramas de fosfolipase A2 derivada do veneno da serpente *Enhydryna schistosa* diluídos em 1 ml

* PhD, Professor Adjunto do Departamento de Patologia Médica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná.

de solução de Ringer. Para respectivo grupo controle, 18 camundongos receberam solução de Ringer em iguais volumes. Todos os animais controles foram, dentro do possível, ajustados para sexo e idade (39).

Demonstração de atividade da enzima acetilcolinesterase — Foi realizada pelos métodos de Namba et al. (30) e de Pestronk e Drachman (33). Os animais profundamente anestesiados foram perfundidos pelo ventrículo esquerdo com formol-cálcio gelado. Os músculos gastrocnêmio, plantaris e soleus foram dissecados e retirados dos animais sendo cortados em criostato a 20 e 30 micrômetros e respectivamente corados pelos métodos do iodeto de acetilcolina e acetato de bromoindoxil para demonstrar a atividade da colinesterase, seguidos por impregnação argêntica para axônios.

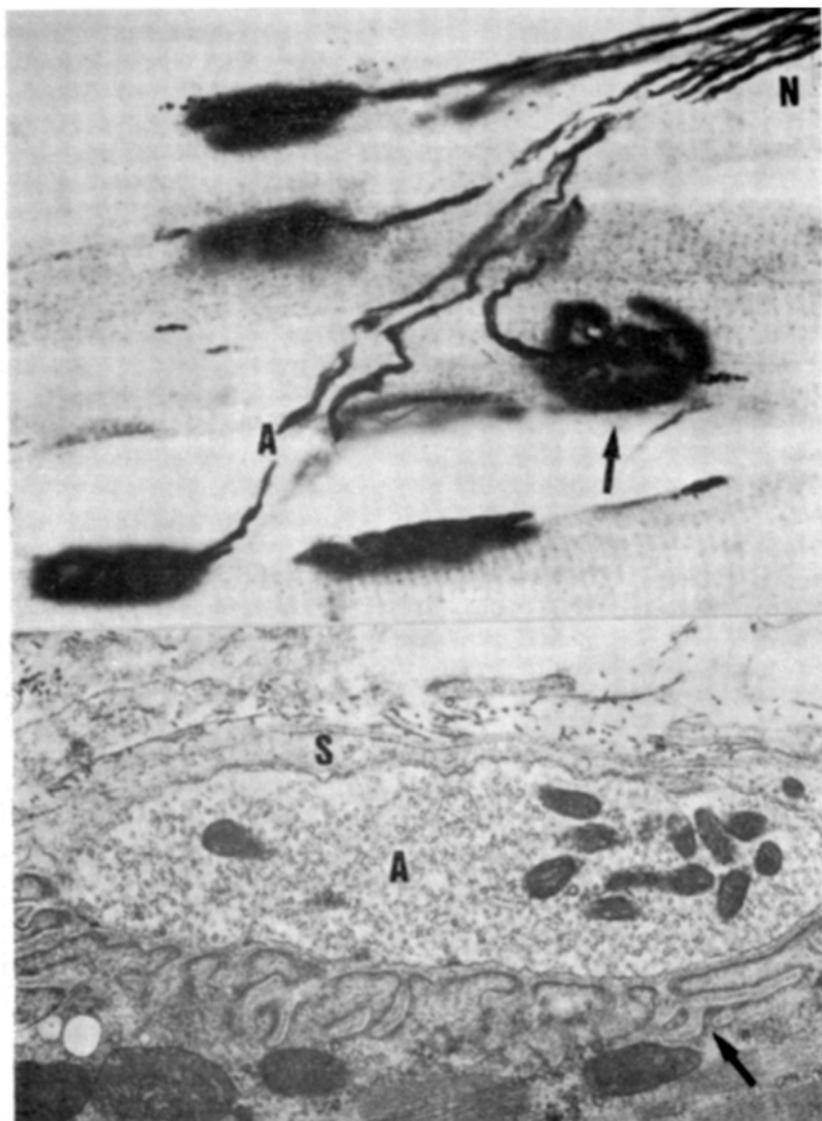
Microscopia eletrônica — Para estudos ultraestruturais o fixador utilizado foi solução modificada de Karnovsky (26), por perfusão intracardíaca. Fragmentos de soleus foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em álcool, processados e incluídos em araldite. Cortes longitudinais e transversais com 1 micrômetro foram corados com azul de toluidina e, após seleção da área apropriada, os cortes ultrafinos obtidos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico JEOL 100CX com voltagem de aceleração de 80 kV.

Métodos morfométricos para JNM — A análise de um número de parâmetros definidos por Engel e Santa (15) e Santa e Engel (35) foi realizada em cortes ultrafinos de músculo soleus. Estes cortes foram ajustados no microscópio eletrônico para altura e magnificação constante e calibrados com uma gradícula padrão contendo 2160 linhas/mm. Cada JNM observada em cortes seriados a intervalos de 100 micrômetros foi fotografada e as fotos ampliadas a magnificação final de 20000. Cada axônio terminal, considerado neste estudo como uma JNM individual, bem como sua respectiva membrana pós-sináptica, foram estudados com auxílio de analisador de imagem Kontron-MOP AM-3 ligado a microcomputador RML 380Z especialmente programado para este fim (39).

RESULTADOS

1. Aspectos normais da JNM — A inervação motora de fibras musculares extrafusais em camundongos tem várias similaridades com aquela observada em outras espécies de mamíferos (6). Nervos mistos sensitivo-motores penetram pelo hilo vâsculo-nervoso e, após dividirem-se repetidamente, atingem a porção média entre a origem e inserção do músculo. Neste ponto os fascículos nervosos espalham-se num leque de fibras mielinizadas pré-terminais, cada uma das quais indo inervar uma única fibra muscular. O axônio pré-terminal perde sua capa de mielina e penetra na JNM (também conhecida como placa terminal). Preparações demonstrando a atividade da enzima acetilcolinesterase (Fig. 1), a qual concentra-se normalmente nas gotelras da JNM, permitem avaliação adequada do padrão de inervação motora muscular, bem como a estrutura do aparelho subneuronal de Couteaux (11), o qual varia em forma e tamanho conforme o tipo de fibra muscular a que pertença. Os principais aspectos ultraestruturais de JNM foram extensivamente revistos por diversos autores (6,10,15,18,32). O axônio terminal, contendo grande quantidade de vesículas sinápticas e mitocôndrias, repousa numa depressão da membrana sarcolemal que é acentuadamente pregueada (Fig.1). A superfície externa do axônio é recoberta por citoplasma da célula de Schwann e há grande quantidade de membrana basal preenchendo a goteira sináptica. Usualmente, observa-se aglomerado de núcleos e de organelas sarcoplasmáticas subjacentemente à JNM. Existem diferenças ultraestruturais entre JNM de fibras de contração lenta e rápida. Nas primeiras, os axônios terminais são menores e arredondados e o sarcoplasma da placa terminal contém maior quantidade de organelas e menor número de pregas pós-sinápticas (9,12,22,42).

2. Alterações na JNM observadas na fase aguda — Neste grupo enquadrámos os animais 'mdx' jovens com predomínio de lesões musculares necrotizantes agudas e os camundongos Balb C tratados com fosfolipase A2 e estudados de 30 minutos a 48 horas após a injeção intramuscular da toxina. Portanto, todas as fibras musculares selecionadas apresentavam alterações necróticas estabelecidas como desorganização de linhas Z, formação de coágulos retracionais, degeneração mitocondrial, dilatação de retículo sarcoplasmático e ruptura de plasmalema. Tanto no camundongo mutante 'mdx' quanto nos animais tratados com fosfolipase A2 não se observou modificação no padrão de inervação dos músculos estudados, apesar de graus variados de necrose. Em nenhum estágio verificou-se alteração na distribuição de axônios pré-terminais, os quais sempre inervavam fibras musculares individuais mesmo quando necróticas. Preparações para demonstrar atividade da enzima acetilcolinesterase possibilitaram identificar, em ambas as situações estudadas, preservação da ação desta enzima nos aparelhos subneurais, apesar de extensa necrose muscular subjacente (Fig. 2). A nível ultraestrutural



g. 1 — Em cima, corte por congelamento de músculo da perna de camundongo corado para demonstrar acetilcolinesterase e axônios pelo método de Pestronk e Drachman(33): nervo intramuscular (N) divide-se em inúmeros axônios pré-terminais (A), os quais inervam fibras musculares individualmente; na junção neuromuscular, o aparelho subneural de Couteaux é indicado pela deposição de produto opaco azul escuro (seta); notar que o padrão normal é deposição contínua ao longo de todo o aparelho subneural ($\times 400$). Em baixo, microscopia eletrônica de junção neuromuscular de soleus de comundongo adulto normal: axônio terminal (A), coberto por processos da célula de Schwann (S), repousa numa depressão da membrana sarcolemal a qual é acentuadamente pregueada (seta); o axônio terminal contém mitocôndrias e vesículas sinápticas e, no sarcoplasma, observa-se acúmulo de mitocôndrias e retículo endoplasmático ($\times 20000$).

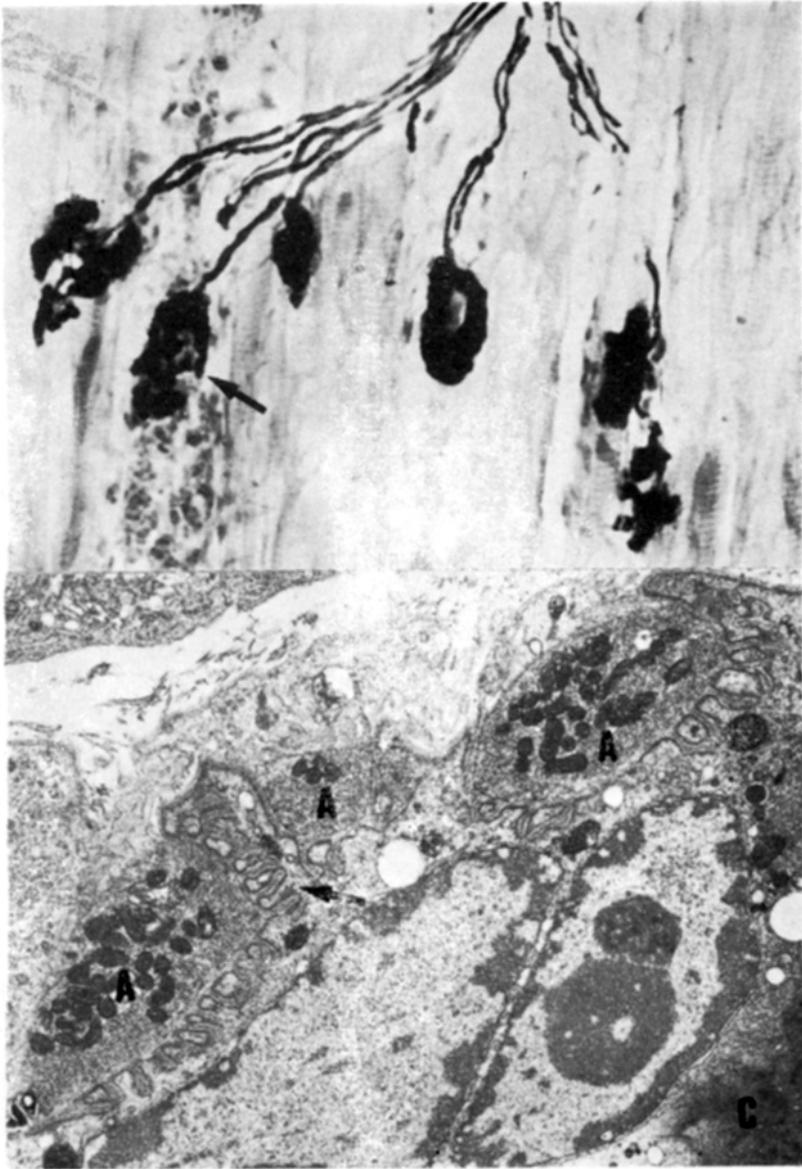


Fig. 2 — Em cima, preparação para demonstrar acetilcolinesterase e axônios pelo método de Namba et al.(30) em músculo de camundongos tratados com 0,03 microgramas de fosfolipase A2 48 horas após injeção intramuscular desta toxina; o padrão de inervação permanece normal e, mesmo em fibras musculares necróticas, a atividade da enzima permanece visível (seta) ($\times 300$). Em baixo, microscopia eletrônica de junção neuromuscular em fibra necrótica pós-injeção de fosfolipase A2; apesar da acentuada desorganização da fibra que contém mitocôndrias anormais e coágulo retracional (C), o axônio terminal (A) permanece intacto bem como as pregas pós-sinápticas parecem resistir ao processo degenerativo (seta) ($\times 10000$).

de JNM notou-se que, em ambos os experimentos, fibras musculares em graus avançados de necrose e desorganização interna permaneciam quase sempre inervadas por axônios terminais aparentemente normais (Fig. 2). Estes terminais nervosos contêm mitocôndrias, vesículas sinápticas e outras organelas de aspecto habitual e as pregas pós-sinápticas da membrana sarcolema permaneciam aparentemente inalteradas pelo processo degenerativo. Nos animais tratados com fosfolipase A2 intramuscular notaram-se ocasionais indentações da membrana axonal e raras vesículas encapadas, nunca a um grau tão severo como observado em animais tratados com doses sistêmicas desta toxina (8).

3. Alterações observadas na JNM na fase crônica — Neste grupo incluímos animais tratados com fosfolipase A2 e estudados de 4 semanas a 3 meses após intoxicação, bem como camundongos 'mdx' adultos com miopatia avançada, com grande percentagem de fibras musculares regeneradas (41). Em ambas as situações, as fibras musculares selecionadas apresentavam-se em fase avançada de regeneração com internalização nuclear (que persiste no camundongo como sinal de degeneração muscular prévia) e proliferação de organelas intracitoplasmáticas. Preparações coradas para demonstrar atividade da acetilcolinesterase confirmaram que o padrão de inervação motora permanece inalterado apesar do grau avançado destas miopatias. Entretanto, a morfologia do aparelho subneuronal de Cousteaux sofreu acentuada modificação, o padrão contínuo observado em placas terminais normais sendo totalmente substituído por padrão fragmentado em pequenos grupos de máculas colinesterase-positivas, intercalados por áreas desprovidas de atividade enzimática (Fig. 3). Apesar disto, estas subunidades persistiram inervando fibras musculares individuais e não se evidenciou inervação colateral. A nível ultraestrutural observou-se diminuição no número e complexidade das pregas pós-sinápticas de fibras musculares regeneradas (Fig. 3). O grau desta alteração pareceu ser diretamente proporcional à fase regenerativa muscular, sendo mais acentuado nos processos avançados. Estudos morfométricos com auxílio de analisador de imagem e microcomputador vieram a confirmar estatisticamente as observações morfológicas obtidas a nível ultraestrutural, conforme demonstrado na tabela 1. Os resultados indicam que não há diferença significativa no tamanho de axônios terminais, densidade de vesículas sinápticas e comprimento pré-sináptico entre os animais estudados e respectivos grupos controles. Entretanto, em ambas as miopatias experimentais estudadas no presente trabalho, o comprimento pós-sináptico (que reflete o número e profundidade das pregas), a área pós-sináptica do sarcoplasma e a relação entre o comprimento das membranas pós e pré-sinápticas atingiram valores marcadamente reduzidos, às vezes representando somente 50% do normal. É importante salientar ainda que raras placas terminais, mesmo em fibras regeneradas, apresentavam aparência normal.

	mdx	controle	FLA-IM	controle
número JNM	37	72	62	44
área pré-sináptica	6,4 + 5,9	7,8 + 6,1	6,5 + 5,5	7,8 + 6,7
área pós-sináptica	2,1 + 1,5**	4,2 + 2,5	1,3 + 1,2**	3,6 + 3,2
área mitocondrial	0,8 + 0,9	1,0 + 1,1	0,8 + 0,9	1,1 + 1,2
comprimento pré-sináptico	5,7 + 2,5	6,3 + 3,2	5,6 + 3,4	6,5 + 3,9
comprimento pós-sináptico	10 + 6,1**	21,3 + 11,3	8,3 + 5,8**	16,9 + 15,1
número de vesículas	374 + 280	470 + 338	269 + 163	454 + 359
densidade vesicular	66 + 30	75 + 82	50 + 20	71 + 34
comprimento pós/pré-sináptico	1,7 + 0,7**	3,5 + 1,4	1,4 + 0,3**	2,4 + 1,0

Tabela 1 — Análise morfométrica da junção neuromuscular (JNM): mdx, camundongo mutante 'mdx'; FLA-IM, camundongos injetados via intramuscular com 0,03 microgramas de fosfolipase A2 em 1 ml de solução de Ringer; valores, média + desvio padrão; **, $p < 0,001$, Mann-Whitney; áreas, micrômetros quadrados; comprimentos, micrômetros.



Fig. 3 — Em cima, preparação demonstrando acetilcolinesterase e axônios em músculo do camundongo 'mdx' com 4 meses de idade; notar que as diversas junções neuromusculares apresentam-se anormais e divididas em pequenas máculas e subunidades colinesterase positivas (setas), ao invés do padrão contínuo normal; o padrão de inervação permanece normal (Namba et al. $\times 400$); Em baixo, microscopia eletrônica de placa mioneural em camundongo 4 meses pós-injeção de fosfolipase A2 intramuscular; o axônio terminal (A) é normal contendo mitocôndrias e vesículas sinápticas; entretanto, a membrana pós-sináptica é acentuadamente simplificada com redução do número e complexidade das pregas (seta) ($\times 20000$).

COMENTÁRIOS

Existem vários tipos de miopatias em animais laboratoriais, atualmente classificados em três grandes grupos de origem: nutricionais, tóxicas e hereditárias 5,7,24,25,38. As miopatias nutricionais foram produzidas em quase todos os tipos de mamíferos e aves, utilizando-se deficiências dietéticas de vitamina E, ácidos graxos não saturados, potássio, selênio e amino ácidos sulfurados, entre outros 5. As miopatias tóxicas podem ser induzidas por miotoxinas primárias, tais como aquelas derivadas de bactérias, artrópodes e cobras ou por diversas drogas, como hormônios, antimaláricos, antibióticos, anestésicos, narcóticos, catecolaminas 25. As miopatias hereditárias ocorrem em diversas espécies animais, muitas das quais são afetadas por desordens concomitantes dos

nervos periféricos⁴⁰. O camundongo mutante 'mdx' é particularmente valioso por ser modelo laboratorial afetado por processo miopático puro sem envolvimento do sistema nervoso central ou periférico³⁹⁻⁴¹. A grande maioria das miopatias mencionadas, apesar de geradas por mecanismos totalmente distintos, determina reações patológicas básicas semelhantes a nível de fibras musculares. Nessas situações ocorre degeneração muscular com alterações de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e miofibrilas, com eventual formação de coágulos retracionais. Tal agressão muscular é seguida por fagocitose de restos celulares, proliferação de células satélites com formação de mioblastos, os quais se fundem para regenerar fibras musculares utilizando o arcabouço delimitado pela membrana basal muscular raramente afetada em tais processos.

A nível de junção neuromuscular as alterações observadas nos dois modelos miopáticos estudados no presente trabalho foram semelhantes entre si. Durante episódios de necrose muscular os axônios terminais permaneceram intactos, apesar de as fibras musculares que eles inervavam estarem totalmente desestruturadas. Em estádios mais avançados dessas miopatias, observou-se alteração em JNM envolvendo fibras musculares regeneradas (persistência de núcleos centralizados, por distribuição irregular de acetilcolinesterase e significante redução no número e complexidade das pregas pós-sinápticas da membrana sarcolemal. Alterações semelhantes foram descritas em outras situações experimentais, como após injeção de crotoxina³⁴, cardiotoxina¹³, bupivacaína²³, no camundongo mutante 'dystrophia muscularis'^{2,14,28,31}, bem como em pacientes humanos com distrofia muscular tipo Duchenne^{16,21}. Um denominador comum à maioria das situações mencionadas é que fibras musculares foram submetidas a episódios de necrose seguidos por regeneração. Este fato permite especular que a falta de diferenciação da membrana sarcolemal, com consequente atrofia nas pregas pós-sinápticas, pode ser consequência direta da regeneração muscular. Estudos realizados no modelo 'mdx' e em camundongos tratados com fosfolipase A2 demonstraram ausência de alterações clínicas, morfológicas e eletrofisiológicas indicativas de comprometimento neurogênico simultâneo nessas miopatias^{8,39,41}. Portanto, nossas observações favorecem ainda mais a presente hipótese de que as alterações observadas em JNM são provavelmente secundárias a necrose e regeneração muscular.

Os mecanismos de modulação e plasticidade da JNM permanecem desconhecidos. Sabe-se que alterações na forma e estrutura da JNM ocorrem regularmente e podem ser decorrência de influências hormonais, senilidade, doenças ou desuso¹⁹. Por exemplo, Snell e McIntyre^{36,37} e Koenig²⁷ demonstraram que, após denervação, há perda e anormalidades progressivas nos locais de atividade da acetilcolinesterase muscular. Fahim e Robbins¹⁷ e Banker et al.¹ demonstraram alterações ultraestruturais na morfologia da JNM em camundongos idosos, com idade variando de 27 a 34 meses. Entre diversos fatores influenciando a reorganização da JNM, a membrana basal parece desempenhar papel importante^{4,29}. A constituição molecular da membrana basal junctional é diferente daquela em regiões distantes da JNM. Na área sináptica há maior concentração de receptores de acetilcolina e canais de sódio^{3,29}. Implantação de fibras nervosas motoras em áreas aneurais de fibras musculares esqueléticas induz modificação da membrana basal com formação de JNM^{6,20}. Nos modelos experimentais aqui estudados não há evidência clínico-laboratorial de denervação^{8,41}. Portanto apesar de atrofia significativa das pregas pós-sinápticas sarcolemais devida a regeneração muscular, parece haver mecanismo adaptativo da membrana basal junctional nesses animais, a qual possivelmente concentra quantidade suficiente de receptores de acetilcolina e canais iônicos para manutenção da fisiologia normal de transmissão neuromuscular.

Finalmente, parece razoável aceitar que, em vista das observações relatadas, a exuberante quantidade de pregas pós-sinápticas normalmente encontrada nas JNM deve representar mecanismo anômico de segurança na transmissão química nervosa. Esta hipótese explicaria porque fibras musculares, contendo aproximadamente metade do comprimento de membrana pós-sináptica, são ainda capazes de manter função aparentemente normal.

Agradecimentos — Este trabalho resulta de observações feitas durante Tese de PhD realizada no Departamento de Neuropatologia, Instituto de Neurologia, Universidade de Londres, Inglaterra, com apoio financeiro do CNPq. Agradecemos profundamente a supervisão do Prof. L.W. Duchesne, aos Drs. G. Brook e P. Gopalakrishnakone, por estudos colaborativos.

REFERÊNCIAS

1. Banker BQ, Kelly SS, Robbins N — Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol* 339:355, 1983.
2. Banker BQ, Hirst NS, Chester CS, Fok RY — Histometric and electron cytochemical study of muscle in the dystrophic mouse. *Ann New York Acad Sci* 317:374, 1979.
3. Beam KG, Caldwell JH, Campbell DT — Na channels in skeletal muscle concentrated near the neuromuscular junction. *Nature* 313:588, 1985.
4. Betz W, Sakmann B — Effects of proteolytic enzymes on function and structure of frog neuromuscular junctions. *J Physiol* 230:673, 1973.
5. Blaxter KL — Myopathies in animals. In Walton J: *Disorders of Voluntary Muscle*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1974.
6. Bowden, REM, Duche LW — The anatomy and pathology of the neuromuscular junction. In Zaimis E: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Berlin, 1976.
7. Bradley R, Fell BF — Myopathies in animals. In Walton J: *Disorders of Voluntary Muscle*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.
8. Brook G, Torres LF, Gopalakrishnakone P, Duchen LW — Effects of phospholipase of *Enhydrina schistosa* venom on nerve, motor end-plate and muscle of the mouse. *Quart J Experi Physiol* 72:571, 1987.
9. Buchthal F, Schmalbruch H — Motor unit of mammalian muscle. *Physiol Rev* 60:90, 1980.
10. Coers C — Morphologie de la jonction neuro-musculaire. *Arch Biol (Liege)* 75 (suppl): 905, 1964.
11. Couteaux R — Morphological and cytochemical observations on the post-synaptic membrane at motor end-plates and ganglionic synapses. *Exper Cell Res* 5 (suppl):294, 1958.
12. Duchen LW — An electron microscopic comparison of motor end-plates of slow and fast skeletal muscle fibres of the mouse. *J Neurol Sci* 14:37, 1970.
13. Duchen LW, Excell BJ, Patel R, Smith B — Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre necrosis and regeneration: a light and electron microscopic study of the effects of the depolarizing fraction of *Dendroaspis jamesoni* venom. *J Neurol Sci* 21:391, 1974.
14. Ellisman MH — The membrane morphology of the neuromuscular junction, sarcolemma, sarcoplasmic reticulum and transverse tubule system in murine muscular dystrophy studied by freeze-fracture electron microscopy. *Brain Res* 214:261, 1981.
15. Engel AG, Santa T — Histometric analysis of the ultrastructure of the neuromuscular junction in myasthenia gravis and in the myasthenic syndrome. *Ann New York Acad Sci* 183:46, 1971.
16. Engel AG, Jerusalem F, Tsujihata M, Gomez MR — The neuromuscular junction in myopathies: a quantitative ultrastructural study. *Recent Advances in Myology* 360:132, 1974.
17. Fahim MA, Robbins N — Ultrastructure studies of young and old mouse neuromuscular junctions. *J Neurocytol* 11:641, 1982.
18. Fardeau M — Ultrastructure des jonctions neuromusculaires dans la musculature squélettique du cobaye. In Israel M, Manaranche R: *La Transmission Cholinergique de L'Excitation*. Inserm, Paris, 1973.
19. Grinnell AD, Herrera AA — Specificity and plasticity of neuromuscular connections: long-term regulation of motor neuron function. *Progress in Neurobiol* 17:203, 1981.
20. Gwyn DG, Aitken JT — The formation of new end-plates in mammalian skeletal muscle. *J Anatomy* 100:116, 1966.
21. Harriman DGF — A comparison of the fine structure of motor end-plates in Duchenne dystrophy and in human neurogenic diseases. *J Neurol Sci* 28:233, 1976.

22. Hopkins WG, Brown MC, Keynes RJ — Postnatal growth of motor nerve terminals in muscles of the mouse. *J Neurocyt* 14:525, 1985.
23. Jirmanova I — Ultrastructure of motor end-plates during pharmacologically induced degeneration and subsequent regeneration of skeletal muscle. *J Neurocytol* 4:141, 1975.
24. Kakulas BA — Experimental Myopathies. In Walton J: Disorders of Voluntary Muscle. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.
25. Kakulas BA — Toxic and drug-induced myopathies. In Mastaglia FL, Walton J: Skeletal Muscle Pathology. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982.
26. Karnovsky MJ — A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137A, 1965.
27. Koenig J — Morphogenesis of motor end-plates 'in vivo' and 'in vitro'. *Brain Res* 62:361, 1973.
28. Law PK, Saito A, Fleischer S — Ultrastructural changes in muscle and motor end-plate of the dystrophic mouse. *Exper Neurol* 80:361, 1983.
29. McMahan UJ, Edgington DR, Kuffler DP — Factor that influence regeneration of the neuromuscular junction. *J Exper Biol* 89:31, 1980.
30. Namba T, Nakamura T, Grob D — Staining for nerve fibre and cholinesterase activity in fresh frozen sections. *Am J Clin Pathol* 47:74, 1967.
31. Ontell M, Haller E — Necrotic extrafusal muscle fibres of the dystrophic mutant mouse: the ultrastructure of the myoneural junction. *Anat Rec* 197:397, 1980.
32. Padykula HA, Gauthier GF — The ultrastructure of the neuromuscular junction of mammalian red, white and intermediate skeletal muscle fibres. *J Cell Biol* 46:27, 1970.
33. Pestronk A, Drachman D — A new stain for quantitative measurement of sprouting at neuromuscular junctions. *Muscle and Nerve* 1:70, 1978.
34. Queiroz LS — Effects of neurotoxins on muscle and nerve in the mouse: morphological and physiological studies. Tese PhD. Universidade de Londres, Inglaterra, 1981.
35. Santa T, Engel AG — Histometric analysis of neuromuscular junction ultrastructure in rat red, white and intermediate muscle fibres. In Desmedt JE: New Developments in EMG and Clinical Neurophysiology. Karger, Basel, 1973.
36. Snell RS, McIntyre N — Effect of denervation on the histochemical appearance of cholinesterase at the myoneural junction. *Nature* 176:884, 1955.
37. Snell RS, McIntyre N — Changes in the histochemical appearances of cholinesterase at the motor end-plate following denervation. *Br J Exper Pathol* 37 (1), 1956.
38. Telford IR, Einarson L — Experimental muscular dystrophies in animals. Charles Thomas, USA, 1971.
39. Torres LFB — Muscle, motor end-plate and nerves in hereditary and experimental myopathies in the mouse. Tese PhD. Universidade de Londres, Inglaterra, 1986.
40. Torres LFB — Inherited neuromuscular diseases in the mouse: a review of the literature. *Arq Neuro-Psiquiat* (São Paulo) 46:298, 1988.
41. Torres LFB, Duchon LW — The mutant 'mdx': inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain* 110:269, 1987.
42. Waerhaug O, Korneliusen H — Morphological types of motor nerve terminals in rat hindlimb muscles, possibly innervating different muscle fibre types. *Z Anat Entwicklungs-gesch* (Berlin) 144:237, 1974.