

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Gabriel Henrique Marques Teixeira

NOVAS TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA UMA SÍNDROME
MASTÊNICA CONGÊNITA PRÉ-SINÁPTICA

Belo Horizonte

2025

Gabriel Henrique Marques Teixeira

**NOVAS TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA UMA SÍNDROME
MIASTÊNICA CONGÊNITA PRÉ-SINÁPTICA**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dra. Cristina Guatimosim
Fonseca

Belo Horizonte

2025

043

Teixeira, Gabriel Henrique Marques.

Novas terapias farmacológicas para uma síndrome miastênica congênita pré-sináptica [manuscrito] / Gabriel Henrique Marques Teixeira. – 2025.
144 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Cristina Guatimosim Fonseca.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia celular. 2. Síndrome Miastênica Congênita. 3. Acetilcolina. 4. Formoterol. 5. Piridostigmina. I. Fonseca, Cristina Guatimosim. II. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



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

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

GABRIEL HENRIQUE MARQUES TEIXEIRA

2025
entrada
2º/2023
2023716726

Às **nove horas** do dia **01 de agosto de 2025**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"NOVAS TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA UMA SÍNDROME MIASTÊNICA CONGÊNITA PRÉ-SINÁPTICA"**, requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Cristina Guatimosim Fonseca**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG	
Marcondes França Junior	UNICAMP	
Walter Luis Garrido Cavalcante	UFMG	

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 01 de agosto de 2025.**

Cristina Guatimosim Fonseca _____

Documento assinado digitalmente



MARCONDES CAVALCANTE FRANCA JUNIOR

Data: 01/08/2025 19:38:25-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcondes França Junior _____

Walter Luis Garrido Cavalcante _____

Documento assinado digitalmente



WALTER LUIS GARRIDO CAVALCANTE

Data: 04/08/2025 11:19:01-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente

CRISTINA GUATIMOSIM FONSECA

Data: 04/08/2025 11:29:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

APOIO INSTITUCIONAL

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biologia da Neurotransmissão do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG. Toda a dissertação foi orientada pela Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca (Departamento de Morfologia) e contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

PARTE DOS RESULTADOS DESTA DISSERTAÇÃO FOI APRESENTADA NOS SEGUINTE EVENTOS:

- XXII Congresso Brasileiro de Biologia Celular;
- XV Simpósio da SBMM de Ciências da Vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio e por estarem sempre ao meu lado durante cada etapa da minha vida. Especialmente à minha mãe, por ser a melhor mãe do mundo, por ter dedicado sua vida toda a cuidar de mim e do meu irmão, por ter se abdicado de muitas coisas para que eu pudesse ter algo que ela nunca pôde: o estudo. Estar me tornando mestre em uma instituição de renome internacional é graças a ela, pois sempre me incentivou e acreditou na minha capacidade. Ao meu pai, por ter trabalhado muito e, por isso, possibilitado que eu pudesse me dedicar ao estudo. Ao meu irmão, por ser meu espelho e, de certa forma, me fazer entrar na universidade.

Aos meus amigos da vida pessoal, que, apesar de não entenderem muito bem o que é o meu trabalho, sempre estão ao meu lado e me distraem em momentos em que estou exausto mentalmente. Principalmente aos meus amigos da época de escola, Veiga e Tchoca, pela companhia e boas risadas que me proporcionam há mais de 10 anos. À Brenda, minha grande amiga da graduação, por estar ao meu lado desde o primeiro dia de aula até o momento em que nos formamos, por toda a troca e conversas que tivemos durante esse tempo que passamos juntos.

À Professora Cristina, pela orientação e ensinamentos ao longo de todos esses anos, por despertar em mim a curiosidade científica e a paixão pela pesquisa. Aos meus colegas de trabalho, que estão comigo desde o meu começo no LaBNeuro, por fazerem do laboratório um lugar divertido de se estar e trabalhar: Babi, Kívia, Léo e Letícia. Aos antigos colegas de laboratório que me ajudaram nos experimentos que realizei durante essa dissertação: Dhiovana, Gabriel Adler e Nathália.

À Luísa, por ter surgido na minha vida em um momento tão inesperado e, desde que apareceu, tem tornado os meus dias muito mais felizes. É muito bom compartilhar a vida com você. E obrigado especialmente por ter me dado Ollie e Amora, que se tornaram meus amores e que me trazem alegria todas as vezes que estou com eles.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, à UFMG e às agências de fomento que permitiram o desenvolvimento e a condução deste trabalho.

RESUMO

As Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs) são um grupo de desordens neurodesenvolvimentais e hereditárias que comprometem genes que codificam proteínas presentes nas junções neuromusculares (JNMs). Um dos genes considerado uma variante patogênica é o gene *SLC18A3* que codifica o Transportador Vesicular de Acetilcolina (VAChT), cuja função é internalizar a acetilcolina nas vesículas sinápticas. Para este estudo, utilizamos camundongos que expressam 35% de VAChT (VAChT-KD^{HOM}) e mimetizam uma SMC pré-sináptica humana. Para o tratamento das SMCs, a administração do anticolinesterásico piridostigmina é a primeira estratégia terapêutica utilizada na clínica. Porém, nos anos recentes, o uso de agonistas β 2-adrenérgicos foi associado à melhora dos sintomas motores de pacientes e murinos para outras SMCs. Portanto, este estudo objetiva investigar os efeitos de esquemas farmacológicos utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol sozinho e combinado com a piridostigmina nos animais VAChT-KD^{HOM}.

Para observar se os tratamentos induziram alterações na função motora e na massa muscular dos animais, realizamos testes comportamentais e pesagem dos músculos. Nossos dados mostraram que o tratamento de 30 dias com o formoterol não alterou os déficits motores e a massa muscular dos camundongos VAChT-KD^{HOM}. Por outro lado, a extensão do tratamento com o formoterol para 90 dias melhorou o fenótipo motor e aumentou a massa muscular do extensor longo dos dedos (EDL) dos animais VAChT-KD^{HOM}. Nas análises de microscopia de fluorescência, observamos um aumento da área sináptica no EDL, hipertrofia na fibra muscular tipo IIB nos músculos EDL e sóleo, e conversão de fibras oxidativas para glicolíticas no sóleo dos animais VAChT-KD^{HOM}. No tratamento de 30 dias de piridostigmina com formoterol, observamos a melhora da função motora e o ganho de massa muscular no EDL dos camundongos VAChT-KD^{HOM}. Nas JNMs, houve aumento das terminações sinápticas no EDL dos animais VAChT-KD^{HOM}. O tratamento combinado também aumentou a área muscular do EDL e sóleo, e promoveu a hipertrofia e a plasticidade das fibras musculares no EDL dos animais VAChT-KD^{HOM}.

Este estudo demonstra que as intervenções farmacológicas utilizando formoterol a longo prazo e a combinação de formoterol com piridostigmina induzem a melhora da função motora e causam alterações celulares nas JNMs e fibras musculares dos animais VAChT-KD^{HOM}. Os dados obtidos poderão ampliar as estratégias terapêuticas a serem utilizadas na clínica para proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes com SMC pré-sináptica.

Palavras-chave: Síndrome Miastênica Congênita; Acetilcolina; Formoterol; Piridostigmina.

ABSTRACT

Congenital Myasthenic Syndromes (CMSs) are a group of hereditary neurodevelopmental disorders that compromise genes encoding proteins at the neuromuscular junctions (NMJs). One of the genes considered a pathogenic variant is the *SLC18A3* gene, which encodes the Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT), whose function is to internalize the acetylcholine into synaptic vesicles. For this study, we used mice that express 35% of VACHT (VACHT-KD^{HOM}) and mimic a presynaptic human CMS. For treatment of the CMSs, the anticholinesterase pyridostigmine is the first therapeutic strategy used in the clinic. However, in recent years, the use of β 2-adrenergic agonists has been associated with improvement of motor symptoms in patients and in models for others CMSs. Thus, this study aims to investigate the effects of pharmacological regimens using the β 2-adrenergic agonist formoterol alone and in combination with pyridostigmine in VACHT-KD^{HOM} mice.

To observe whether the treatments induced changes in the motor function and muscle mass of the animals, we performed behavioral tests and muscle weighing. Our data showed that a 30-day treatment with formoterol did not alter the motor deficits or muscle mass of VACHT-KD^{HOM} mice. On the other hand, extending the treatment with formoterol to 90 days improved motor phenotype and increased the muscle mass of the extensor digitorum longus (EDL) of VACHT-KD^{HOM} mice. In the fluorescence microscopy analysis, we observed an increase in the synaptic, hypertrophy in type IIB muscle fibers in the EDL and soleus muscles and conversion of oxidative fibers to glycolytic in the soleus muscle in VACHT-KD^{HOM} animals. For the 30-day treatment with pyridostigmine and formoterol, we observed improvement in motor function and gain in muscle mass in the VACHT-KD^{HOM} mice's EDL. In the NMJs, the latter pharmacological regimen induced an increase in synaptic terminals in the EDL of the VACHT-KD^{HOM} mice. The combined treatment also increased the muscle area of the EDL and soleus, and promoted hypertrophy and plasticity of muscle fibers for an even more glycolytic profile in the EDL of VACHT-KD^{HOM} mice. This study demonstrates that pharmacological interventions using the β 2-adrenergic agonist formoterol long-term, and the combination of formoterol with the pyridostigmine induce an improvement in motor function and cause cellular changes in the NMJs and muscle fibers in VACHT-KD^{HOM} mice. The data obtained may expand the therapeutic strategies to be used in the clinic and provide a better quality of life for patients with presynaptic SMC.

Keywords: Congenital Myasthenic Syndrome; Acetylcholine; Formoterol; Pyridostigmine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do nAChR.	20
Figura 2. Morfologia das junções musculares de camundongos adultos.	21
Figura 3. Ciclo das vesículas sinápticas.	24
Figura 4. Esquema representando os passos para a exocitose de vesículas sinápticas.	25
Figura 5. Modelo representativo das três vias de endocitose.	26
Figura 6. Proteína VACHT.	28
Figura 7. Estrutura do sarcômero.	30
Figura 8. Contração muscular.	34
Figura 9. Regulação da expressão de MuRF1 e MAFbx/atrogina-1.	36
Figura 10. Macroautofagia de organelas e proteínas da musculatura esquelética.	37
Figura 11. Fórmula estrutural da piridostigmina (brometo de 3-hidroxi-1 metil piridínio dimetil carbamato).	43
Figura 12. Estrutura dos receptores $\beta 2$ -adrenérgicos.	45
Figura 13. Modelo representativo para a interação dos agonistas formoterol, salbutamol e salmeterol com o adrenoceptor- $\beta 2$ e com a bicamada lipídica adjacente ao receptor.	49
Figura 14. Estrutura do formoterol (N-[2-hidroxi-5-[1-hidroxi-2-[1-(4-metoxifenil)propan-2-ilamino]etil]fenil] formamida).	51
Figura 15. Esquema do locus gênico do VACHT.	54
Figura 16. Análise de PCR com os fragmentos genômicos amplificados.	55
Figura 17. Desenho esquemático do teste força de agarre.	56
Figura 18. Desenho esquemático do teste esteira giratória.	57
Figura 19. Desenho esquemático do teste grade invertida.	57
Figura 20. Desenho esquemático do tratamento de 30 dias com o simpatomimético formoterol.	59
Figura 21. Desenho esquemático do tratamento de 90 dias com o agonista $\beta 2$ -adrenérgico formoterol.	59
Figura 22. Desenho esquemático do tratamento combinado de 30 dias do anticolinesterásico piridostigmina e agonista $\beta 2$ -adrenérgico formoterol.	60
Figura 23. Tratamento de 30 dias com formoterol induz ganho de massa corporal dos camundongos tratados e maior massa muscular do sóleo dos camundongos WT FOR.	65

Figura 24. Camundongos VACHT-KD ^{HOM} não apresentam melhora do comportamento motor com o tratamento de 30 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol.	66
Figura 25. Tratamento de 90 dias com formoterol promove ganho de massa corporal dos camundongos WT FOR e VACHT-KD ^{HOM} FOR e induz maior massa muscular do EDL dos animais miastênicos.	68
Figura 26. Camundongos VACHT-KD ^{HOM} apresentam melhora no desempenho motor com o tratamento de 90 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol.	70
Figura 27. Agonista β 2-adrenérgico formoterol promove aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas e não altera o índice de colocalização no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD ^{HOM} .	74
Figura 28. Tratamento com o simpatomimético formoterol induz aumento da área da terminação pós-sináptica no músculo sóleo de camundongos VACHT-KD ^{HOM} .	76
Figura 29. Formoterol induz hipertrofia de fibra glicolítica e alteração do padrão de expressão das isoformas da MyHC no músculo EDL dos animais WT e VACHT-KD ^{HOM} .	80
Figura 30. Formoterol tem efeito hipertrófico e glicolítico no músculo sóleo de camundongos WT e VACHT-KD ^{HOM} no músculo sóleo	84
Figura 31. Tratamento combinado induz aumento de massa corporal e massa do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD ^{HOM} PF e promove redução da massa do músculo glicolítico dos animais WT PF.	87
Figura 32. Tratamento de 30 dias utilizando o anticolinesterásico piridostigmina junto ao agonista β 2-adrenérgico formoterol atenua disfunção motora dos camundongos VACHT-KD ^{HOM} .	89
Figura 33. Tratamento combinado de 30 dias da piridostigmina com formoterol induz aumento das áreas pré e pós-sinápticas no músculo glicolítico EDL dos camundongos VACHT-KD ^{HOM} , mas redução do grau de colocalização dos camundongos WT PF.	93
Figura 34. Tratamento de 30 dias combinando piridostigmina e formoterol não altera a área das terminações pré e pós-sinápticas no músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD ^{HOM} .	95

Figura 35. Tratamento de piridostigmina com formoterol amplia área muscular e induz alteração dos tipos de fibras no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD ^{HOM} ..	98
Figura 36. Tratamento de piridostigmina com formoterol induz hipertrofia no músculo oxidativo sóleo dos animais VACHT-KD ^{HOM}	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas.	33
Tabela 2. Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs).	40
Tabela 3. Terapias farmacológicas para as SMCs pré-sinápticas.	41
Tabela 4. Primers utilizados para a genotipagem dos animais VACHT-KD ^{HOM}	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Akt	Proteína quinase B
Ca ⁺⁺	Íons cálcio
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
ChAT	Colina acetiltransferase
ChT1	Transportador de colina de alta afinidade
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP
EDL	Extensor longo dos dedos
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FOR	Formoterol
FoxO	<i>Forkhead box O</i>
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
JNM	Junção neuromuscular
LC3	<i>Light Chain 3</i>
Mef2	Fator de potenciação de miócitos 2
MRF	Fator miogênico regulador
mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MuRF1	<i>Muscle RING finger 1</i>
Myf	Fator miogênico
MyHC	Cadeia pesada de miosina (<i>Myosin heavy chain</i>)
MyoD	Fator de diferenciação miogênica
nAChR	Receptor nicotínico para acetilcolina
PF	Piridostigmina com formoterol
PGC1- α	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
PKA	Proteínas quinases dependentes de cAMP
<i>SLC18A3</i>	Família de transportadores de soluto 18
SMC	Síndrome Miastênica Congênita
SNAP-25	Proteína de 25 kDA associada a sinaptossoma
SNARE	Receptor proteico solúvel de fixação de fato sensível à N-etilmaleimida

SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGF β	Fator de transformação de crescimento beta
tSNARE	<i>Target</i> SNARE
VACht	Transportador vesicular de acetilcolina
VAMP	Proteína de membrana associada à vesícula
VMAT	Transportador vesicular de monoamina
vSNARE	Vesicular SNARE

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Junção Neuromuscular	19
1.1.1 Síntese, Armazenamento e Liberação da Acetilcolina	21
1.1.2 Transportador Vesicular de Acetilcolina (VAC _h T)	27
1.2 Musculatura Esquelética	28
1.2.1 Contração muscular	33
1.2.2 Atrofia das fibras musculares esqueléticas	35
1.3 Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs)	37
1.4 Terapias farmacológicas para as SMCs	41
1.4.1 Anticolinesterásicos	41
1.4.1.1 Piridostigmina	42
1.4.2 Agonistas β 2-adrenérgicos	43
1.4.2.1 Agonistas β 2 na musculatura esquelética	44
1.4.2.2 Agonistas β 2 nas JNMs	47
1.4.2.3 Estrutura dos agonistas β 2	47
1.4.2.4 Agonista β 2-adrenérgico formoterol	50
2. OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo Geral	52
2.2 Objetivos Específicos	52
3. MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Camundongos VAC _h T-KD ^{HOM}	53
3.2 Testes comportamentais motores	55
3.3 Esquemas farmacológicos	58
3.3.1 Tratamento de 30 dias com o agonista β 2-adrenérgico formoterol	58
3.3.2 Tratamento de 90 dias com o agonista β 2-adrenérgico formoterol	59
3.3.3 Tratamento combinado de 30 dias com o anticolinesterásico piridostigmina e o agonista β 2-adrenérgico formoterol	59
3.4 Avaliação por imunofluorescência das JNMs	60
3.5 Aquisição de imagens e análises morfológicas das JNMs	61
3.6 Imunofluorescência para mensurar a área de secção transversal e para determinação das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) das fibras musculares esqueléticas	61

3.7 Aquisição de imagens e análises da área de secção transversal e identificação dos tipos de fibras musculares	62
3.8 Análise estatística	62
4. RESULTADOS	64
4.1 Efeitos do tratamento de 30 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol.	64
4.2 Tratamento de 90 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol.	67
4.2.1 Intervenção farmacológica com o agonista β 2-adrenérgico formoterol a longo prazo induz aumento de massa corporal e massa muscular do EDL e atenua o fenótipo motor dos camundongos VACHT-KD ^{HOM}	67
4.2.2 Tratamento de 90 dias com o formoterol aumenta a área sináptica das JNMs no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD ^{HOM}	71
4.2.3 Tratamento de 90 dias com o simpatomimético formoterol induz hipertrofia de fibra glicolítica e alteração do padrão de expressão das isoformas da MyHC no músculo EDL dos camundongos WT e VACHT-KD ^{HOM}	76
4.2.4 Tratamento de 90 dias com o formoterol tem efeito hipertrófico e glicolítico no músculo sóleo de camundongos WT e VACHT-KD ^{HOM}	81
4.3 Tratamento combinado de 30 dias com o anticolinesterásico piridostigmina e o agonista β 2-adrenérgico formoterol.	85
4.3.1 Tratamento conjugado de piridostigmina com formoterol promove ganho de massa corporal e massa muscular do EDL e melhora a disfunção motora dos camundongos VACHT-KD ^{HOM}	86
4.3.2 Tratamento combinado de 30 dias dos fármacos piridostigmina e formoterol promove aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD ^{HOM}	90
4.3.3 Tratamento de 30 dias de piridostigmina com formoterol causa hipertrofia muscular e alteração dos tipos de fibras no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD ^{HOM}	95
4.3.4 Tratamento combinado de 30 dias com piridostigmina e formoterol induz hipertrofia das fibras musculares do músculo sóleo dos animais VACHT-KD ^{HOM}	99
5. DISCUSSÃO	103
5.1 Tratamento de 30 dias com o agonista β 2-adrenérgico formoterol não causa atenuação do fenótipo miastênico dos camundongos VACHT-KD ^{HOM}	103

5.2 Tratamento de 90 dias com o formoterol melhora a performance motora e induz alterações estruturais nas JNMs e fibras musculares dos camundongos WT e VACHT-KD ^{HOM}	105
5.3 Tratamento combinado do anticolinesterásico piridostigmina com o agonista β 2-adrenérgico formoterol induz melhora comportamental, sináptica e muscular dos camundongos VACHT-KD ^{HOM}	111
6. CONCLUSÃO	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
8. ANEXO 1: Artigo publicado durante o mestrado	133

1. INTRODUÇÃO

1.1 Junção Neuromuscular

A junção neuromuscular (JNM) é um tipo especializado de sinapse química colinérgica responsável pela comunicação entre o sistema motor e o sistema muscular. Nas sinapses químicas, ocorre a transdução de sinal do neurônio a uma célula-alvo através da conversão do sinal elétrico em um sinal químico, denominado neurotransmissor (Katz, 1959). Nas JNMs maduras de mamíferos, os nervos motores têm sua origem na medula espinal e, em sua porção final, se ramificam formando terminações axonais que inervam as fibras musculares, em que cada terminação axonal inerva uma única fibra muscular (Sanes; Lichtman, 2001). Em mamíferos, o neurotransmissor responsável pela comunicação nervo-músculo é a acetilcolina (ACh). Moléculas de ACh são armazenadas em vesículas sinápticas agrupadas em uma região especializada da terminação axonal chamada zona ativa (Homan; Meriney, 2018). As zonas ativas são estruturas elétron-densas nas quais apresentam vesículas sinápticas contendo moléculas de ACh e inúmeros canais para Ca^{++} sensíveis à voltagem que permitem o influxo de íons Ca^{++} na terminação axonal após a chegada do potencial de ação (Del Castillo; Katz, 1954). O influxo de íons Ca^{++} desencadeia a fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática do neurônio pré-sináptico e resulta na liberação do neurotransmissor (Katz, 1971). A ACh se difunde pela fenda sináptica, um espaço entre a terminação pré-sináptica e a terminação pós-sináptica, preenchido por matriz extracelular especializada, chamada lâmina basal sináptica, a qual é essencial para a manutenção estrutural das JNMs (Shi et al., 2012). Após a difusão da ACh pela fenda sináptica, o neurotransmissor se liga ao seu receptor localizado na terminação pós-sináptica (placa motora). O aparato pós-sináptico das fibras musculares contém uma região especializada denominada dobras juncionais. Na crista de cada dobra juncional, há uma alta densidade de receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChRs) (Albuquerque et al., 1974). Os nAChRs são receptores transmembranares e canais iônicos dependentes de ligantes (Heuser; Salpeter, 1979). O nAChR maduro é constituído de cinco subunidades: duas subunidades α , uma subunidade β , uma subunidade γ e uma subunidade δ , em que a porção amino terminal de cada subunidade é direcionada para a fenda sináptica (Mishina et al., 1986; Albuquerque et al., 2009) (**Figura 1**). A partir da interação de duas moléculas de ACh com o sítio de ligação entre as subunidades α e as subunidades γ e δ , há a alteração conformacional do receptor e ocorre a abertura dos canais iônicos, permitindo o influxo de íons (Hogg; Raggenbass; Bertrand, 2003) (**Figura 1**).

A entrada dos íons na placa motora resulta na despolarização do sarcolema das fibras musculares e consequente contração muscular (Albuquerque et al., 2009). Ainda, as JNMs apresentam células de Schwann não mielinizantes, chamadas células de Schwann perissinápticas ou terminais (CSTs). As CSTs recobrem as JNMs para protegê-las de fatores químicos e mecânicos e têm a função de contribuir para a formação, manutenção e reparo das sinapses neuromusculares (Feng; Ko, 2008; Ko; Robitaille, 2015).

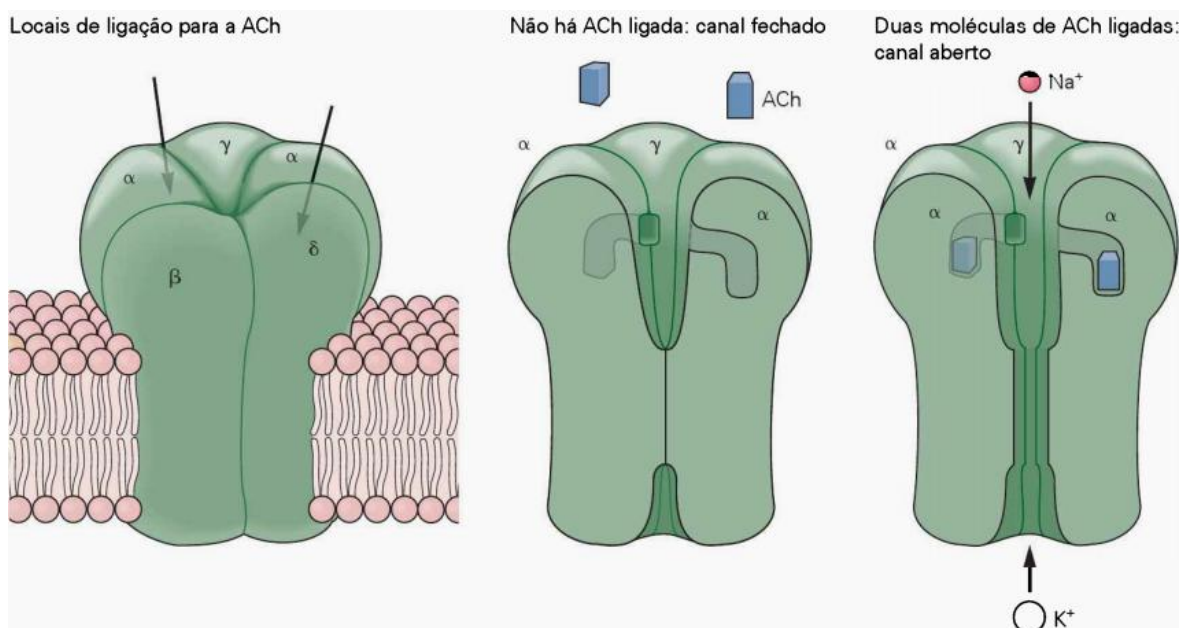


Figura 1. Estrutura do nAChR. O nAChR é um receptor ionotrópico pentamérico, composto por duas subunidades α , uma subunidade β , uma subunidade γ e uma subunidade δ . Quando duas moléculas de ACh interagem com o sítio de ligação entre as subunidades α e as subunidades γ e δ , há a abertura dos poros iônicos, permitindo a passagem dos íons Na^+ e K^+ de acordo com seus gradientes eletroquímicos. Adaptado de Kandel et al. (2014).

As JNMs de camundongos adultos possuem uma estrutura multiperfurada, semelhante a um pretzel (Marques et al., 2000) (**Figura 2A**). Isso ocorre devido ao processo de remodelamento da terminação pós-sináptica para criar as dobras juncionais e ampliar a área de superfície dos nAChRs (Mech et al., 2020). Através das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, é possível visualizar, no plano ultraestrutural, as JNMs e identificar as ramificações dos axônios e a terminação axonal contendo inúmeras vesículas sinápticas preenchidas por ACh, as mitocôndrias, a fenda sináptica e a terminação pós-sináptica com as cristas das dobras juncionais, onde se localizam os nAChRs (**Figuras 2B e 2C**).

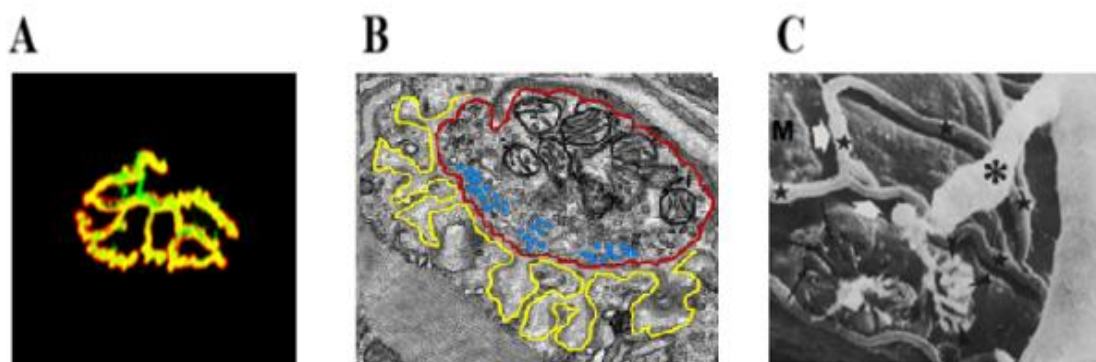


Figura 2. Morfologia das junções musculares de camundongos adultos. A- Imagem de JNM em microscopia de fluorescência com as terminações pré e pós-sináptica sobrepostas (sinal fluorescente amarelo) (autoria própria). B- Imagem de JNM em microscopia eletrônica de transmissão. É possível observar a terminação axonal (contorno vermelho) com vesículas sinápticas (apontadas em azul) e mitocôndrias, a placa motora com suas dobras juncionais (contorno amarelo) e uma fenda sináptica estreita entre a terminação pré e pós-sináptica (Rodrigues et al., 2013). C- Imagem de JNM em microscopia eletrônica de varredura. É possível observar as ramificações do axônio motor (estrela), a terminação pré-sináptica (cabeças de setas) sobre a fibra muscular esquelética (M) e as dobras juncionais onde se encontram os aglomerados de nAChRs (setas pretas) (Torrejais et al., 2002).

A transmissão sináptica das JNMs em condições saudáveis é altamente eficiente e confiável devido a um parâmetro denominado margem de segurança da transmissão neuromuscular (Wood; R. Slater, 2001). Assim, a quantidade de neurotransmissor liberada por impulso nervoso é maior do que o necessário para desencadear um potencial de ação na terminação axonal e, o número de nAChRs ativados pela ACh liberada é superior ao necessário para atingir o limiar de despolarização do sarcolema das fibras musculares (Wood; R. Slater, 2001). Contudo, em condições em que há disfunção nas sinapses neuromusculares, como nas doenças neuromusculares, a margem de segurança pode estar comprometida, levando à redução da transmissão neuromuscular e, por consequência, déficits motores e musculares (Wood; R. Slater, 2001; Rodríguez Cruz et al., 2020).

1.1.1. Síntese, Armazenamento e Liberação da Acetilcolina

As etapas que envolvem o ciclo da exocitose de ACh são cruciais para a eficiência da comunicação entre o motoneurônio e as fibras musculares. O distúrbio em alguma destas

etapas pode comprometer as JNMs e resultar na manifestação de doenças neuromusculares (Engel et al., 2015; Rodríguez Cruz et al., 2020; Yan et al., 2022).

O ciclo da ACh inicia com o processo de captação da colina presente na fenda sináptica para o interior da terminação axonal por meio do Transportador de Colina de Alta Afinidade (ChT1) (**Figura 3**). No citoplasma da terminação pré-sináptica, a enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) catalisa a reação da colina junto à acetil-coA (substrato do metabolismo mitocondrial) para sintetizar a ACh (**Figura 3**). Após a sua síntese, o neurotransmissor precisa ser internalizado no lúmen das vesículas sinápticas para que possa ser posteriormente liberado na fenda sináptica. Quem medeia essa internalização da ACh nas vesículas sinápticas é o Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT), presente na membrana vesicular (Prado et al., 2013) (**Figura 3**). Quando internalizadas, as moléculas de ACh ficam armazenadas até a despolarização da terminação do motoneurônio. Com a chegada do potencial de ação na membrana da terminação pré-sináptica, há a abertura dos canais para Ca^{++} dependentes de voltagem concentrados nas zonas ativas. Nas zonas ativas, há proteínas sensíveis aos níveis de Ca^{++} intracelulares denominadas sinaptotagminas (Tucker; Chapman, 2002). As sinaptotagminas são proteínas de membrana com um segmento transmembrana amino terminal ancorado às vesículas sinápticas, em que a região citoplasmática da proteína contém dois domínios C2: C2A e C2B, nos quais há a ligação de três íons Ca^{++} no domínio C2A e de dois íons Ca^{++} no domínio C2B (Südhof; Rizo, 1996) (**Figura 4A**). A ligação dos íons Ca^{++} nos domínios C2 da sinaptotagmina induz alterações conformacionais nas proteínas SNAREs (receptor proteico solúvel de fixação de fato sensível à N-etilmaleimida) (Rothman; Warren, 1994; Pang; Südhof, 2010). As SNAREs são uma maquinaria proteica altamente conservada composta por 65 resíduos de aminoácidos que induz a fusão da membrana das vesículas sinápticas com a membrana plasmática da terminação pré-sináptica (Rizo, 2018). Há duas formas de SNAREs: vSNAREs (SNAREs vesiculares) e tSNAREs (SNAREs transmembranas) (**Figura 4A**). A vSNARE contém apenas um tipo de proteína integral denominada sinaptobrevina ou proteína de membrana associada à vesícula-2 (VAMP-2). Ao passo que há duas proteínas tSNAREs: syntaxina-1 e proteína de 25 kDA associada a sinaptossoma (SNAP-25) (Jahn; Lang; Südhof, 2003). A VAMP-2 e a syntaxina-1 contêm apenas um motivo SNARE, enquanto a SNAP-25 apresenta dois motivos SNAREs. Desse modo, as SNAREs formam um complexo proteico que consiste em um feixe de quatro α -hélices fortemente estável (Südhof; Rothman, 2009). A porção citoplasmática das SNAREs formam uma espiral que aproxima a membrana da vesícula sináptica com a membrana da

terminação pré-sináptica (Sutton et al., 1998; Weber et al., 1998; Chen et al., 2002) (**Figuras 4B**). Ademais, existem outras proteínas fundamentais para que o processo de exocitose possa ocorrer de modo eficiente. A Munc18 (*C.elegans unc 18*) é uma proteína que interage com o N-peptídeo da syntaxina-1 e atua na estabilidade da conformação fechada da tSNARE (Dulubova et al., 1999; Südhof, 2014). Já a Munc13-1 (*C.elegans unc 13*) é uma proteína que induz a syntaxina-1 a adquirir a conformação aberta, permitindo que a syntaxina-1 se associe com as demais proteínas SNARE, induzindo a formação do complexo SNARE, preparando a fusão das vesículas sinápticas com a membrana da terminação axonal (Richmond; Weimer; Jorgensen, 2001; Ma et al., 2011; Rizo, 2018) (**Figura 4C**). A Munc13-1 ainda interage com outra proteína, a RIM (*Rab3a interacting molecule*) (Südhof, 2014; Rizo, 2018). Estudos descreveram que a proteína RIM induz a ativação de Munc13-1 e também parece ser crucial no recrutamento de canais para Ca^{++} à zona ativa (Deng et al., 2011; Liu et al., 2011). Os íons Ca^{++} se ligam aos domínios C2 da sinaptotagmina, resultando na fusão da membrana vesicular com a membrana da terminação pré-sináptica (Tucker; Chapman, 2002; Pang; Südhof, 2010) (**Figura 4D**). Após o processo de fusão, o complexo SNARE é desfeito pela ATPase citoplasmática NSF (fator sensível à N-etilmaleimida) junto da SNAP (proteína de ligação NSF solúvel) (Südhof, 2014). A NSF usa a energia resultante da hidrólise de trifosfato de adenosina (ATP) para dissociar o complexo SNARE e as demais proteínas associadas ao processo de fusão, interrompendo a fusão da membrana vesicular com a membrana da terminação axonal (Hanson et al., 1997; Rizo, 2018) (**Figura 4E**).

A etapa de fusão da membrana vesicular com a membrana da terminação pré-sináptica resulta na liberação de ACh que se difunde pela fenda sináptica até a sua interação com os nAChRs localizados na placa motora (**Figura 3**). A ativação de nAChR induz a conformação aberta dos canais iônicos e torna o receptor permeável a cátions, o que leva à despolarização do sarcolema e à contração muscular. Após a interação com o nAChR, a ACh se dissocia do receptor e é hidrolisada em colina e acetato na fenda sináptica pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) (Prado et al., 2013) (**Figura 3**). A AChE é uma enzima assimétrica ancorada à lâmina basal sináptica que, devido a sua função de hidrolisar a ACh, é alvo de intervenções farmacológicas que inibem sua atividade (Millard; Broomfield, 1995). Com a inibição da AChE, o neurotransmissor tem sua atividade prolongada na fenda sináptica e, portanto, tem uma maior probabilidade de interagir com mais nAChRs e, com isso, aumenta também a probabilidade de desencadear a despolarização da célula-alvo (Quinn, 1987; Shen et al., 2002). Em doenças neuromusculares, como as miastenias congênitas, nas quais há disfunções da

liberação de ACh, o aumento da disponibilidade do neurotransmissor nas sinapses neuromusculares é fundamental para induzir a contração muscular (Engel et al., 2015; Pugliese et al., 2023). Após a hidrólise de ACh em acetato e colina, o acetato é metabolizado pelo organismo, enquanto a colina é recaptada para o citoplasma da terminação axonal pelo ChT1 para a síntese de nova ACh, reiniciando o ciclo do neurotransmissor (Prado et al., 2013) (Figura 3).

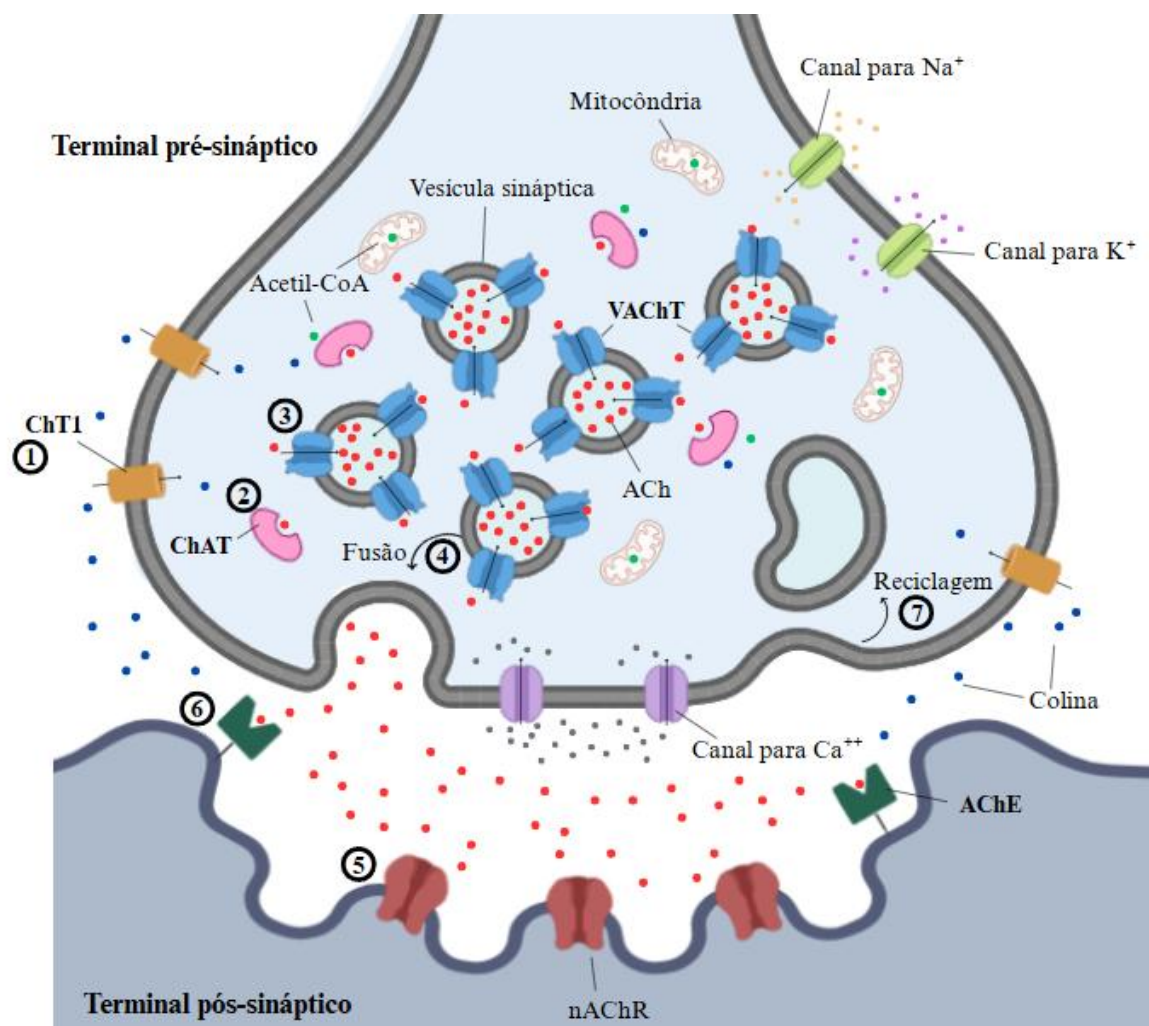


Figura 3. Ciclo das vesículas sinápticas. O esquema acima demonstra as etapas que envolvem o ciclo das vesículas sinápticas. **(1)** A colina presente na fenda sináptica é recaptada para o interior da terminação axonal pelo Transportador de Colina de Alta Afinidade (ChT1). **(2)** No citoplasma da terminação pré-sináptica, a colina junto à acetil-coA é catalisada pela enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) para a síntese do neurotransmissor ACh. **(3)** Uma vez sintetizada, a ACh é internalizada e armazenada no lúmen das vesículas pelo Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT). **(4)** A partir da despolarização da terminação axonal e o consequente influxo de íons Ca^{++} , ocorre a fusão da membrana da

vesícula sináptica com a membrana da terminação pré-sináptica e o neurotransmissor é liberado na fenda sináptica. (5) A ACh se difunde pela fenda sináptica e, então, se liga a receptores nicotínicos (nAChRs) localizados nas cristas das dobras juncionais da terminação pós-sináptica, resultando na despolarização do sarcolema e desencadeando a contração das fibras musculares. (6) Após a ligação da ACh com os nAChRs, o neurotransmissor é hidrolisado pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) ancorada à lâmina basal sináptica, e a ACh é clivada em acetato e colina. A colina é recaptada novamente para a terminação pré-sináptica e um novo ciclo é iniciado. (7) Após a fusão da vesícula, há a reciclagem de porções da membrana da terminação pré-sináptica para a formação de novas vesículas sinápticas. Modificado de Prado et al. (2013) e de Jahn e Fasshauer (2012).

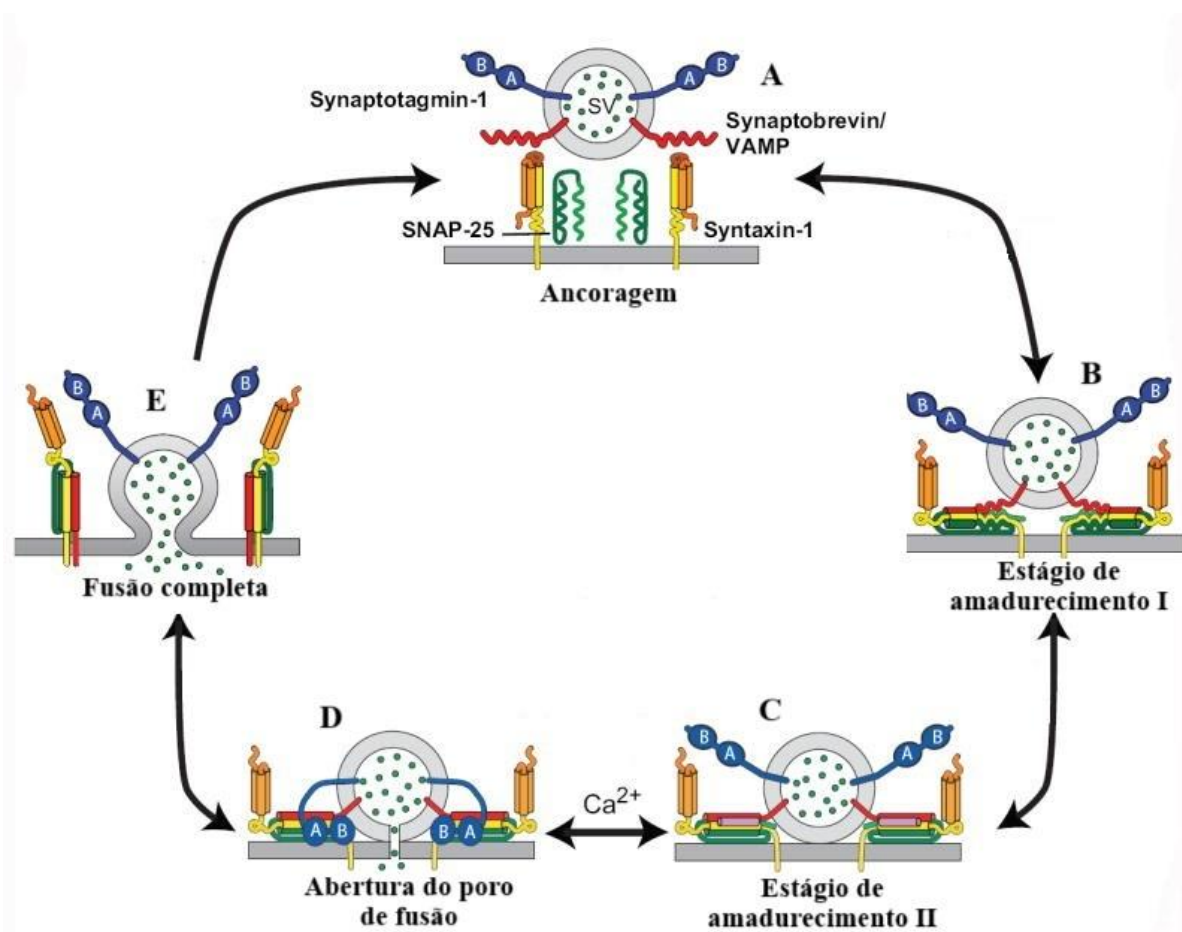


Figura 4. Esquema representando os passos para a exocitose de vesículas sinápticas. (A) As vesículas são ancoradas na zona ativa e preparadas para a fusão. **(B)** Ocorre a interação entre a vSNARE VAMP-2 com as proteínas tSNAREs syntaxina-1 e SNAP-25. **(C)** Em seguida, a partir da formação do complexo SNARE, as vesículas sinápticas terminam o estágio de amadurecimento e estão preparadas para se fundir à membrana da terminação pré-

sináptica. **(D)** Após a despolarização da terminação axonal, há o influxo de íons Ca^{++} e estes se ligam aos domínios C2A e C2B da sinaptotagmina e geram a abertura de um poro de fusão. **(E)** O processo continua com a fusão completa da membrana vesicular com a membrana da terminação e a ACh é liberada na fenda sináptica. Modificado de Pang e Südhof (2010).

Após a fusão da membrana da vesícula sináptica com a membrana da terminação pré-sináptica, é importante que haja a reciclagem da membrana a fim de induzir a formação de novas vesículas sinápticas e manter o tamanho da membrana da terminação axonal (Kokotos; Cousin, 2015). Este processo é denominado de endocitose compensatória e pode ocorrer por três vias a depender da intensidade da fusão da membrana vesicular: (a) endocitose do modelo kiss-and-run, que consiste na fusão parcial das membranas da vesícula e da terminação pré-sináptica, resultando na abertura transitória de um poro de fusão. Rapidamente, há o fechamento imediato do poro de fusão gerado para a reciclagem da vesícula sináptica (Ceccarelli; Hurlbut; Mauro, 1973, Chanaday et al., 2019) (**Figura 5A**); (b) endocitose mediada por clatrina. Após a fusão, ocorre a invaginação da membrana da terminação pré-sináptica e clatrininas são recrutadas para o sítio de invaginação, onde juntamente com outras proteínas medeiam a forma da nova vesícula formada (Heuser; Reese, 1973; Rizzoli, 2014) (**Figura 5B**); (c) endocitose via grande invaginação, ativada somente em processos de alta intensidade exocítica, nos quais são gerados grandes endossomos, e a partir dos endossomos brotam novas vesículas sinápticas (Parton; Richards, 2003) (**Figura 5C**).

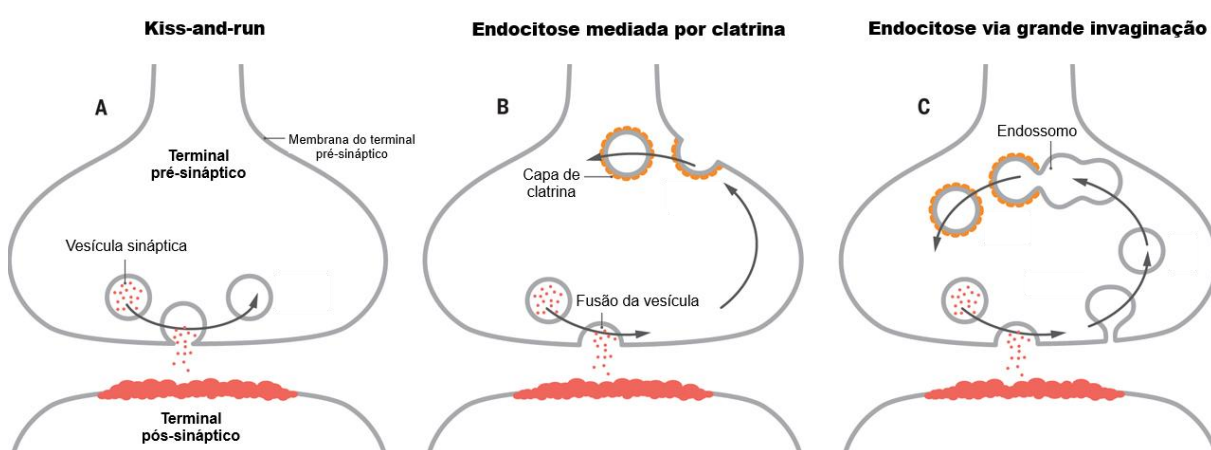


Figura 5. Modelo representativo das três vias de endocitose. **A-** Modelo kiss-and-run. A membrana das vesículas sinápticas se funde transitoriamente com a membrana da terminação pré-sináptica e há a abertura de um poro de fusão. Após a liberação da ACh, o poro de fusão se fecha rapidamente e as vesículas sinápticas são internalizadas. **B-** Modelo de endocitose mediada por clatrina. Uma vesícula sináptica se funde e colapsa na membrana para a exocitose do neurotransmissor. Na sequência, ocorre a formação de nova vesícula sináptica

em outra região a partir da atuação de clatrina e demais proteínas, que irão dar forma à nova vesícula formada. C- Modelo de endocitose via grande invaginação. Após a liberação do neurotransmissor, ocorre a endocitose da membrana da terminação axonal via grande invaginação. Isso gera a formação de um endossomo. A partir do endossomo gerado, novas vesículas sinápticas são formadas. Adaptado de Watanabe (2015).

1.1.2 Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT)

O VACHT é uma glicoproteína de 532 aminoácidos composta por doze domínios transmembranares, codificada pelo gene *SLC18A3* (família de transportadores de soluto 18) no cromossomo 10q11.2, e está presente no mesmo locus gênico da proteína ChAT (Erickson et al., 1994) (**Figura 6A**). O VACHT localiza-se majoritariamente na membrana vesicular, e sua função é internalizar moléculas de ACh para o ambiente luminal das vesículas sinápticas, dado que o neurotransmissor é carregado positivamente e, por isso, é incapaz de se difundir pela membrana vesicular (Alfonso *et al.*, 1993; Parsons *et al.*, 1993). O VACHT possui homologia com os segmentos transmembranares dos transportadores vesiculares de monoamina VMAT1 e VMAT2 (Nirenberg et al., 1995; Erickson; Varoqui, 2000; Prado et al., 2002). A internalização do neurotransmissor na vesícula sináptica ocorre devido a presença de V-ATPase, bomba que gera um gradiente eletroquímico para o próton H^+ . Semelhante às demais bombas ATPases, as V-ATPases de membrana das vesículas sinápticas utilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP à ADP + Pi para translocar o próton para o lúmen vesicular, resultando na acidificação e no acúmulo de cargas positivas no interior da vesícula sináptica. O VACHT então aproveita desse gradiente eletroquímico gerado pela bomba V-ATPase e troca dois H^+ do lúmen vesicular por uma molécula de ACh citoplasmática, dessa forma, o neurotransmissor é armazenado na vesícula sináptica (Nguyen; Cox; Parsons, 1998; Prado et al., 2002) (**Figura 6B**).

Por regular o processo de internalização e armazenamento da ACh, a atividade do VACHT é considerada uma etapa limitante para a neurotransmissão colinérgica. Portanto, o estudo do transportador é essencial para compreender melhor a sua função nas sinapses colinérgicas. Com isso, foram gerados modelos animais que possuíam variantes patogênicas bialélicas no gene que codifica a proteína (Kitamoto et al., 2000; Prado et al., 2006). De Castro et al. (2009), utilizando um modelo murino nocaute para VACHT (VACHT^{DEL/DEL}), observou que os camundongos VACHT^{DEL/DEL} morreram logo após o nascimento devido a insuficiência respiratória. Assim, concluiu-se que a deleção completa da proteína leva a

disfunções incompatíveis com a vida. Dessa forma, um novo modelo murino foi criado, mas dessa vez com a redução de 65% da expressão do VAcHT (VAcHT-KD^{HOM}) (Prado et al., 2006). Os efeitos da redução da expressão do VAcHT nos animais resultaram em déficits no Sistema Nervoso Central (SNC) e no Sistema Nervoso Periférico (SNP), porém, de modo diferente do modelo nocaute, os animais VAcHT-KD^{HOM} apresentaram uma taxa de vida normal e, assim, surgiram como um modelo para o estudo da neurotransmissão colinérgica *in vivo* (Prado et al., 2006).

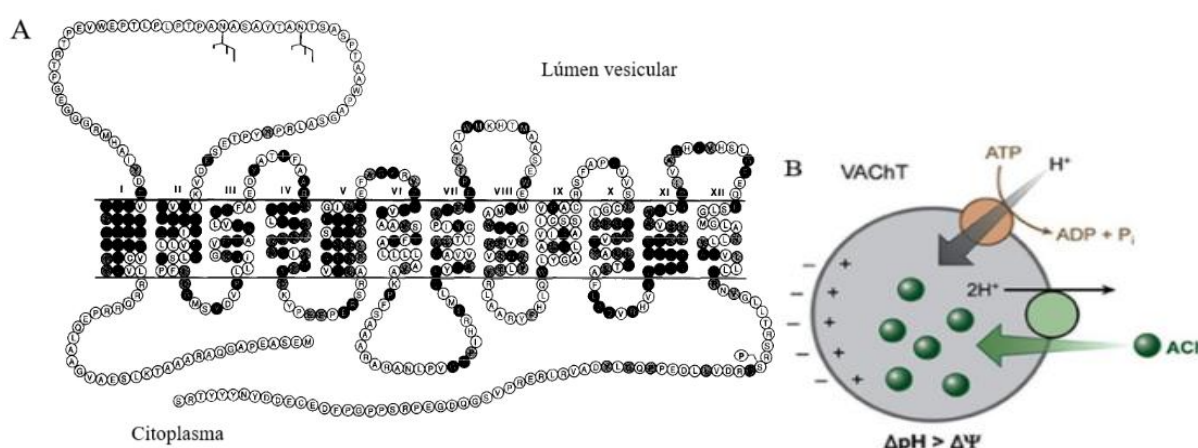


Figura 6. Proteína VAcHT. A- Estrutura do VAcHT. É possível observar os doze domínios transmembranais e a sequência de aminoácidos do transportador vesicular. Adaptado de Usdin et al., 1995. B- Moléculas de ACh são carregadas positivamente, assim, a sua internalização necessita ser mediada por um transportador. Para ocorrer a internalização da ACh, a membrana da vesícula sináptica apresenta bombas V-ATPases que acidificam o lúmen vesicular, criando um gradiente químico (ΔpH) e um gradiente elétrico transmembrana ($\Delta \psi$). Portanto, o VAcHT aproveita o gradiente eletroquímico gerado pela bomba V-ATPase e troca uma molécula de ACh no citoplasma por dois prótons H^+ no lúmen vesicular. Adaptado de Erickson et al. (1994).

1.2 Musculatura Esquelética

O músculo esquelético é um dos componentes do aparelho locomotor e tem a função de sustentação e movimentação do corpo. O tecido muscular esquelético é formado por feixes de células alongadas, cilíndricas e multinucleadas denominadas fibras musculares esqueléticas. As fibras musculares esqueléticas se originam a partir de células mesodérmicas, as quais se fundem e originam os mioblastos, que posteriormente se transformam em miócitos, os quais são células mononucleadas (Flück; Hoppeler, 2003). Na sequência, os miócitos se unem e

formam uma fibra muscular multinucleada madura, com os núcleos localizados na região periférica da fibra muscular. O mecanismo de diferenciação e maturação das fibras musculares esqueléticas é coordenado pelos fatores de transcrição chamados fatores miogênicos reguladores (MRF), que incluem: fator miogênico 5 (Myf5), fator de diferenciação miogênica (MyoD), fator de potenciação de miócitos (Mef2), miogenina, dentre outros (Potthoff; Olson, 2007; Zammit, 2017). Os fatores de transcrição junto as vias de sinalização são essenciais na regulação da especificidade das cadeias pesadas de miosina (MyHC - *Myosin Heavy Chain*) (Buckingham, 2001; Blais et al., 2005; Schiaffino; Reggiani, 2011).

Cada fibra muscular esquelética é envolta por uma membrana plasmática denominada sarcolema. No interior do sarcolema, há o sarcoplasma, o qual constitui o citoplasma da célula muscular e apresenta organelas celulares, como o retículo sarcoplasmático, responsável pelo armazenamento e regulação do fluxo de íons Ca^{++} , e uma rede de cisternas tubulares denominadas túbulos T, que são invaginações do sarcolema e permitem a propagação da despolarização por toda a fibra muscular esquelética (Flück; Hoppeler, 2003). O sarcoplasma também contém feixes cilíndricos filamentosos, as miofibrilas, que contêm os filamentos proteicos e localizam-se em paralelo ao eixo maior da fibra muscular. As miofibrilas apresentam um padrão de estriações transversais que se estende pela célula muscular esquelética. No microscópio óptico, essas estriações estão arranjadas em alternâncias de faixas claras e faixas escuras (**Figura 7**). As faixas escuras compreendem a banda A, enquanto as faixas claras compreendem a banda I. No centro de cada banda A, há uma banda H, e no centro da banda I, há uma linha transversal escura, denominada linha Z (**Figura 7**). A região entre duas linhas Z sucessivas é denominada sarcômero. Os sarcômeros são as unidades contráteis das fibras musculares esqueléticas e são constituídos por filamentos espessos de miosina, filamentos finos de actina e proteínas que constituem a função estrutural e de ligação aos filamentos, a troponina e a tropomiosina (Wang; Raunser, 2023). A troponina das fibras musculares esqueléticas apresenta três subunidades: TnC, que se liga aos íons Ca^{++} ; TnI, que cobre o sítio ativo da interação entre a actina e miosina; TnT, que interage com a tropomiosina. A tropomiosina é uma molécula constituída por duas cadeias polipeptídicas com arranjo em dupla hélice, que formam os filamentos nos sulcos existentes entre dois filamentos de actina (Wang; Raunser, 2023).

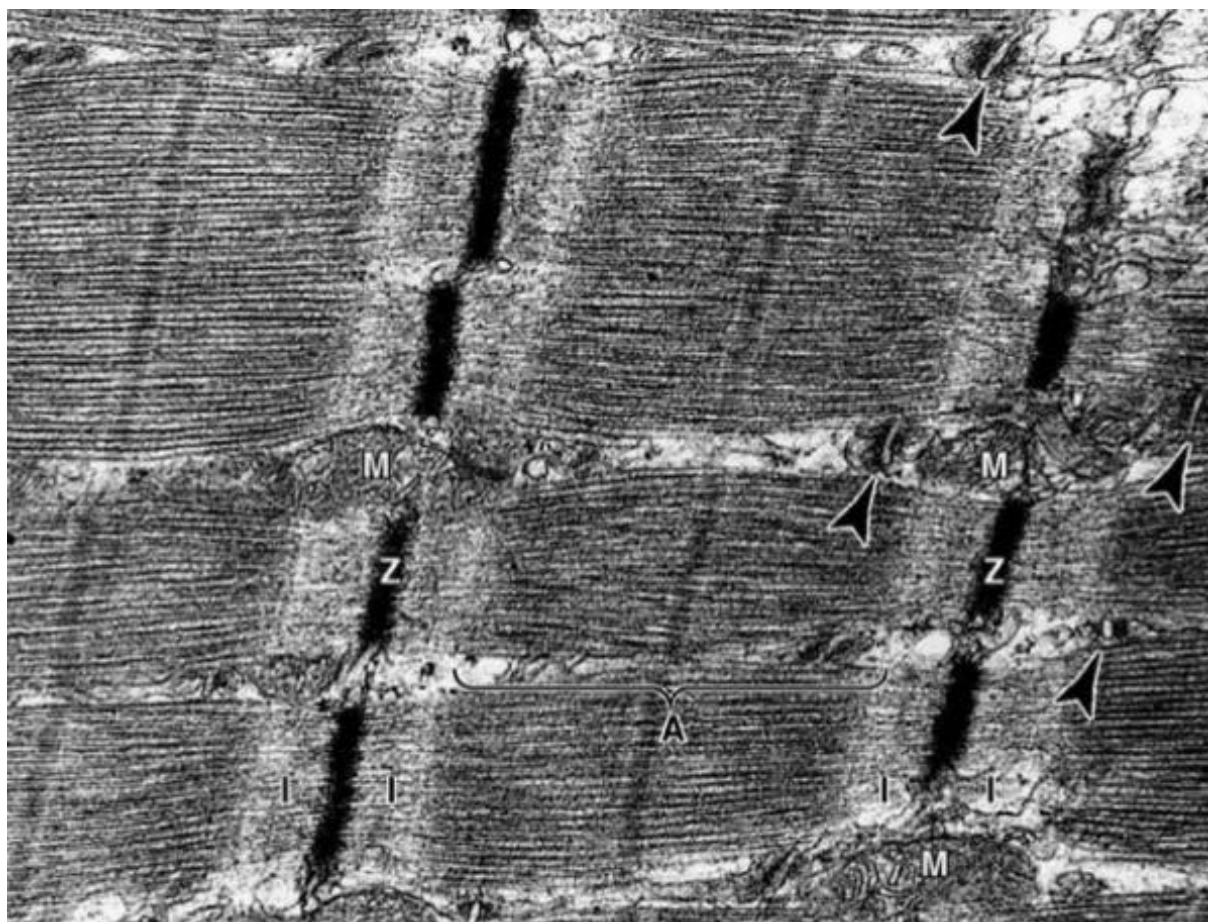


Figura 7. Estrutura do sarcômero. Micrografia eletrônica de transmissão de um corte longitudinal das fibras musculares esqueléticas, em que é possível observar as estriações transversais que compõem todo o comprimento das miofibrilas. Observe em (M) as mitocôndrias. Temos o sarcômero entre as duas linhas Z e é possível perceber o padrão das estriações dos filamentos, em que (A) constitui a banda A com os filamentos espessos e (I) representa a banda I com os filamentos finos. As pontas das setas indicam as tríades, que são túbulos T adjacentes a dois retículos sarcoplasmáticos. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2013).

As miosinas são proteínas compostas por duas cabeças globulares e uma cauda filamentosa constituída de cadeias pesadas e leves. Em uma cabeça globular, há o sítio ativo que permite a interação da miosina com a actina. Na outra cabeça globular, associada à cadeia pesada, há uma enzima ATPase que induz a hidrólise de ATP à ADP + Pi, essencial para o processo de contração da fibra muscular (Pette; Staron, 2000). Uma vez que a atividade ATPásica está relacionada com a velocidade de contração da fibra muscular, sua função é, portanto, utilizada para classificar as diferentes isoformas da MyHC (**Tabela 1**) (Pette; Staron, 2000). Dessa forma, as fibras musculares de mamíferos roedores apresentam quatro principais isoformas da MyHC: MyHC I, MyHC IIA, MyHC IIX e MyHC IIB (Schiaffino; Reggiani,

1985). As isoformas tipo I são de contração lenta, enquanto as isoformas tipo II são de contração rápida (**Tabela 1**). Dentre as isoformas tipo II, ainda existem diferenças na velocidade de contração: tipo IIA apresentam velocidade de contração moderada a rápida; tipo IIX apresentam velocidade de contração rápida; tipo IIB apresentam velocidade de contração muito rápida (Schiaffino; Reggiani, 2011). Há uma relação direta entre a velocidade de contração e a força contrátil exercida pelas isoformas da MyHC, sendo assim, a força de contração é maior na seguinte ordem: MyHC IIB > MyHC IIX > MyHC IIA > MyHC I (Galler et al., 1997; Schiaffino; Reggiani, 2011) (**Tabela 1**). Ainda, o ATP requerido para a atividade ATPásica da miosina e outras funções musculares é proveniente do metabolismo de glicose, que pode ocorrer por duas vias: glicolítica e oxidativa. A via glicolítica utiliza o ATP resultante da glicólise, sem a participação dos processos oxidativos mitocondriais. Dessa forma, o ATP é gerado rapidamente e é utilizado pelas fibras musculares em atividades de alta intensidade. Neste caso, como a demanda de ATP é rápida, há a limitação na duração da atividade contrátil, uma vez que a capacidade de regenerar o ATP é baixa. Com isso, as fibras musculares com características glicolíticas são rapidamente fatigáveis (Schiaffino; Reggiani, 2011) (**Tabela 1**). Já a via oxidativa utiliza o ATP gerado pelos processos oxidativos mitocondriais, que garantem a maior produção do substrato energético e ainda mantêm a atividade contrátil por mais tempo sem apresentar fadiga (Schiaffino; Reggiani, 2011) (**Tabela 1**). Com base nessas distinções das propriedades bioquímicas e metabólicas das fibras musculares, elas foram classificadas em: fibras oxidativas lentas (tipo I), fibras oxidativas glicolíticas rápidas (tipo IIA) e fibras glicolíticas rápidas (tipo IIX e IIB) (Behnke et al., 2003; Schiaffino; Reggiani, 2011). Ademais, as diferenças das propriedades metabólicas das fibras musculares são observadas na sua coloração, assim, as fibras glicolíticas são denominadas de fibras brancas e as fibras oxidativas são chamadas de fibras vermelhas.

Nos músculos esqueléticos de mamíferos, os diferentes tipos de fibras musculares constituem um único músculo (Talbot; Maves, 2016). Por exemplo, o músculo sóleo, localizado na panturrilha, tem função postural e não requer uma alta demanda energética, portanto, é predominantemente composto por fibras oxidativas (Di Giulio et al., 2009). Em contrapartida, o músculo extensor longo dos dedos (EDL), localizado na porção anterior da perna, tem função de estender os dedos laterais do pé e é recrutado em atividades de alta demanda energética, com isso, é constituído majoritariamente por fibras glicolíticas, principalmente aquelas que correspondem as isoformas da MyHC IIX e IIB (Bloemberg; Quadrilatero, 2012).

As fibras musculares esqueléticas dos mamíferos adultos são inervadas pelas terminações axonais do motoneurônio, nas quais cada fibra muscular é inervada por uma única JNM na maior parte dos músculos (Rodríguez Cruz et al., 2020). Assim sendo, as propriedades das fibras musculares também são reguladas pelo padrão de disparo dos motoneurônios, além das características estruturais das JNMs (Reid; Slater; Bewick, 1999; Schiaffino; Reggiani, 2011). Dessa forma, temos que: (a) fibras tipo I são inervadas por motoneurônios que apresentam uma alta taxa de impulsos (300.000 - 500.000 em 24 horas), com longa duração (300 a 500 segundos) e frequência de disparos baixa (20 Hz). O tamanho da área das JNMs que inerva as fibras de contração lenta é menor que as demais tipos de fibras (**Tabela 1**); (b) fibras tipo IIA e IIX são inervadas por motoneurônios que apresentam uma moderada taxa de impulsos (90.000 - 250.000 em 24 horas), de duração relativamente baixa (60 - 140 segundos) e frequência de disparos de 50 - 80 Hz. As JNMs das fibras tipo IIA e IIX apresentam um tamanho da área maior que o das fibras tipo I, mas menor que o das fibras tipo IIB (**Tabela 1**); (c) fibras tipo IIB são inervadas por motoneurônios que apresentam uma baixa taxa de impulsos (3.000 - 10.000 em 24 horas), de duração inferior a 3 segundos, mas com alta frequência de disparos (70 - 90 Hz). As fibras tipo IIB possuem maior área das JNMs em relação às outras fibras musculares (Schiaffino; Reggiani, 2011) (**Tabela 1**).

	TIPO 1 (VERMELHA)	TIPO 2A	TIPO 2X	TIPO 2B (BRANCA)
Gene	<i>Myl7</i>	<i>Myl2</i>	<i>Myl1</i>	<i>Myl4</i>
Velocidade de contração	Lenta	Moderada/rápida	Rápida	Superior a IIX
Tamanho da JNM	Pequena	Média	Grande	Superior a IIX
Resistência à fadiga	Alta	Moderada/alta	Intermediária	Baixa
Respiração	Aeróbica	Aeróbica de longo prazo	Anaeróbica de curto prazo	Anaeróbica
Utilização em 24hrs	5,3 a 8,4 hrs	23-72 minutos	< 5 minutos	0,5-3 minutos
Força produzida	Baixa	Média	Alta	Superior a IIX
Densidade de mitocôndrias	Alta	Alta	Média	Baixa
Densidade de capilares	Alta	Intermediária	Baixa	Baixa
Capacidade oxidativa	Alto	Alto	Intermediário	Baixo
Capacidade glicolítica	Baixo	Alto	Alto	Alto
Conteúdo de mioglobina	Alto	Alto	Baixo	Baixo

Tabela 1. Características dos diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas.
Adaptado de Magalhães-Gomes (2018).

1.2.1 Contração muscular

A despolarização da terminação axonal resulta na fusão da membrana vesicular com a membrana da terminação pré-sináptica e, assim, há a exocitose de ACh que se difunde pela fenda sináptica e interage com os nAChRs presentes na placa motora das fibras musculares. A ativação dos nAChRs permite o influxo de íons e induz a propagação do potencial de ação por todo o sarcolema. A despolarização atinge os túbulos T localizados próximos aos retículos sarcoplasmáticos. Adjacente aos túbulos T, há canais para Ca^{++} dependentes de voltagem, denominados receptores de di-hidropiridina (DHPRs), que estimulam a liberação de íons Ca^{++} armazenados no retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma através dos receptores de rianodina (RyRs) que são canais para Ca^{++} especializados (Dulhunty et al., 2002; Amador et al., 2013). O aumento de íons Ca^{++} no ambiente sarcoplasmático resulta na interação de modo

reversível dos íons Ca^{++} com a subunidade TnC da troponina, o que muda a configuração espacial das três subunidades da troponina e da tropomiosina (Wang; Raunser, 2023) (**Figura 8**). Essa alteração conformacional permite que haja a exposição dos sítios ativos de interação da cabeça globular da miosina com o filamento de actina (**Figura 8**). A interação entre os filamentos espessos de miosina com os filamentos finos de actina forma as pontes cruzadas. Junto à ligação do cálcio à subunidade TnC da troponina, ocorre a atividade ATPásica de uma das cabeças globulares da miosina (Schiaffino; Regianni, 2011; Wang; Raunser, 2023) (**Figura 8**). A miosina utiliza a energia fornecida pela hidrólise do ATP em ADP + Pi para induzir o deslizamento da sua porção filamentosa sobre os filamentos finos de actina (**Figura 8**). Os deslizamentos dos filamentos são direcionados para a região central dos sarcômeros, resultando na contração das fibras musculares. Dessa forma, a contração muscular é o resultado de repetições de deslizamentos dos filamentos de miosina sobre os filamentos de actina que encurtam os vários sarcômeros presentes nas fibras musculares. O processo de contração é cessado quando há o término da despolarização do sarcolema e diminuição dos níveis dos íons Ca^{++} no sarcoplasma, os quais são novamente armazenados no retículo sarcoplasmático (Grefte et al., 2007). A dissociação dos íons Ca^{++} com a subunidade TnC da troponina permite que a tropomiosina e as demais subunidades TnI e TnT da troponina retomem a sua conformação original e, assim, o sítio ativo da interação da miosina com a actina é inativado (Grefte et al., 2007).

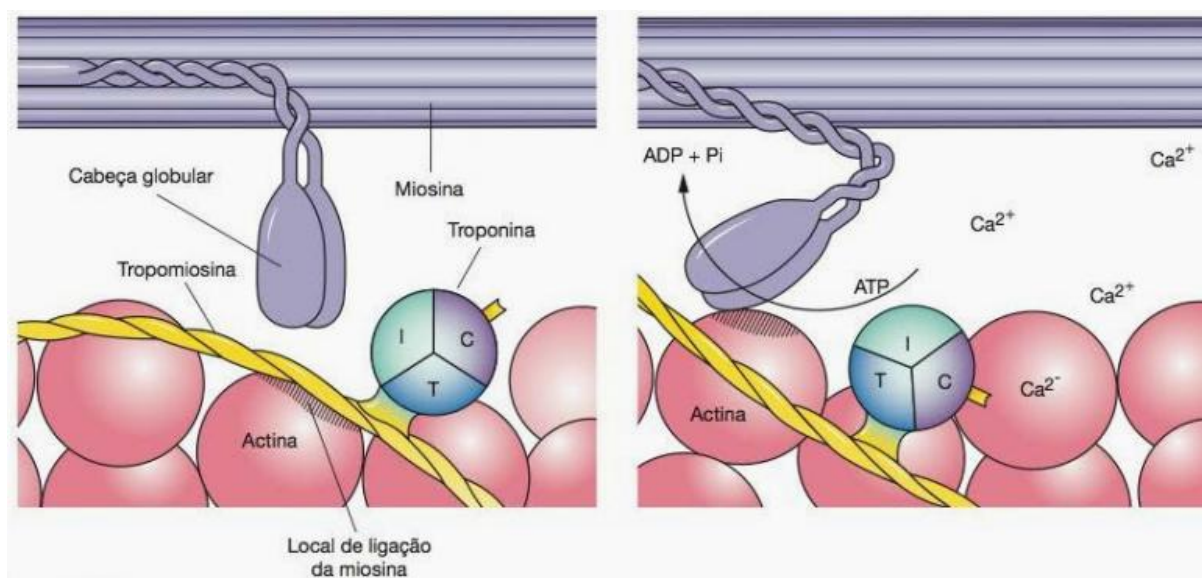


Figura 8. Contração muscular. A contração dos sarcômeros se inicia a partir da ligação dos íons Ca^{++} com a subunidade TnC da troponina, que induz alterações conformacionais na tropomiosina e nas outras subunidades da troponina, expondo o sítio ativo da interação de uma cabeça globular da miosina com o filamento de actina. Ainda, a outra cabeça globular da

miosina apresenta uma enzima ATPase, responsável pela hidrólise do ATP em ADP + Pi, o que resulta no movimento de deslizamento da miosina sobre a actina. Esse processo de deslizamento se repete muitas vezes durante um ciclo de contração muscular e é interrompido na diminuição dos níveis sarcoplasmáticos de íons Ca^{++} , resultando no relaxamento da fibra. Adaptado de Junqueira e Carneiro (2013).

1.2.2 Atrofia das fibras musculares esqueléticas

Dado que a manutenção e função das fibras musculares esqueléticas são influenciadas por JNMs, nas doenças em que há disfunção na comunicação nervo-músculo, as células musculares também são comprometidas (Wang; Pessin, 2013). Com isso, as fibras musculares passam por processos atrofícos e, em alguns casos, pode ocorrer o mecanismo de diferenciação dos tipos de fibras e atrofia de fibra tipo-específica (Egerman; Glass, 2014; Talbot; Maves, 2016).

A atrofia muscular é caracterizada pelo desbalanço de processos anabólicos e catabólicos, resultando em perda muscular quando a degradação proteica é superior à taxa de síntese de proteínas musculares (Wang; Pessin, 2013). Esta é resultante da ativação de vias de sinalização reguladas por mediadores transcricionais como FoxO (forkhead box O), NF- κ B (fator nuclear κ B), miostatina (membro da família do TGF β), dentre outros. A partir da sinalização dos mediadores transcricionais, há a ativação de dois sistemas proteolíticos principais, que são: o sistema ubiquitina-proteassomo e o sistema autofagia-lisossomo (Bonaldi; Sandri, 2013; Milan et al., 2015). O sistema ubiquitina-proteassomo é regulado pelas enzimas ubiquitinas ligases E1, E2 e E3. Na musculatura esquelética, as ubiquitinas ligases são ativadas a partir da sobreexpressão dos fatores transcricionais MuRF1 (*Muscle RING finger 1*) e MAFbx/atrogina-1 (*muscle atrophy F-box*) (Sandri et al., 2004; Bonaldi; Sandri, 2013; Bodine; Baehr, 2014) (**Figura 9**). Estes fatores transcricionais codificam genes relacionados às ubiquitinas ligases E3, responsáveis pela interação com os substratos proteicos dos sarcômeros que serão ubiquitinados e posteriormente degradados pelo proteassomo 26S (Sandri et al., 2004; Bodine; Baehr, 2014) (**Figura 9**). Já o sistema autofagia-lisossomo na musculatura esquelética é relacionado, a princípio, ao processo de macroautofagia. Aqui, ocorre a ativação de um complexo regulador que induz a degradação de organelas e proteínas que compõem as fibras musculares a partir da formação do autofagossomo mediado por LC3 (*Light Chain 3*) (Gonçalves et al., 2012; Bonaldi; Sandri, 2013) (**Figura 10**).

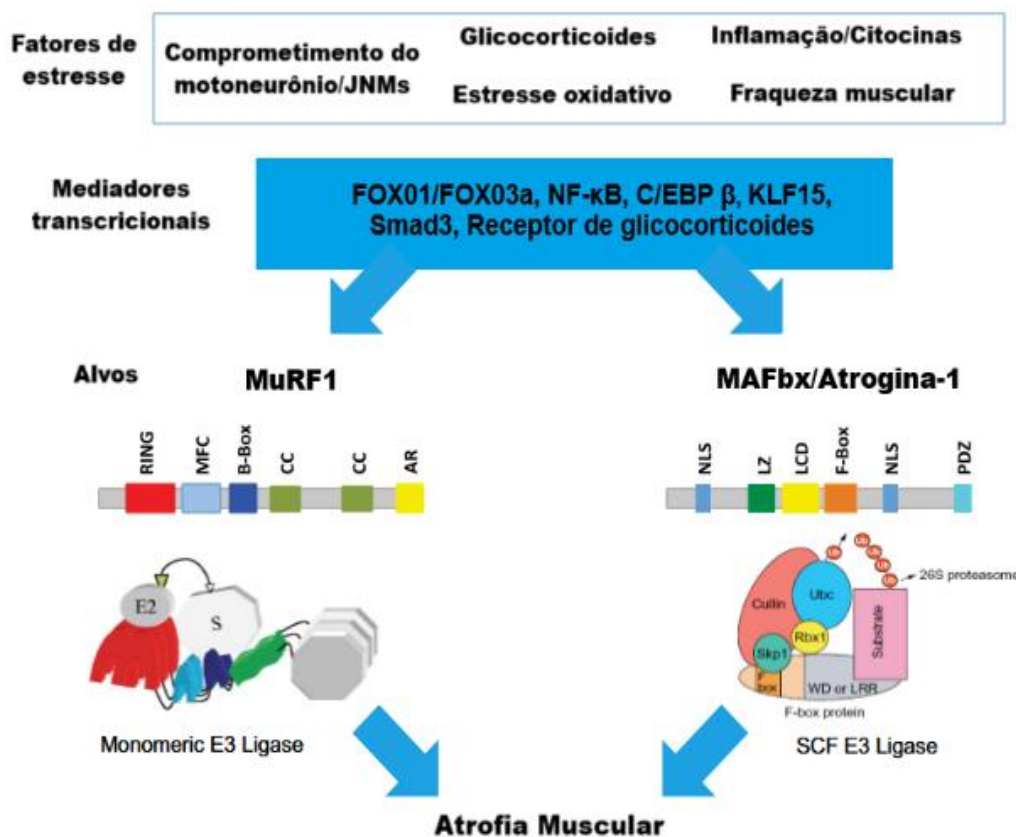


Figura 9. Regulação da expressão de MuRF1 e MAFbx/atrogina-1. A atrofia da musculatura esquelética é resultante de fatores de estresse, que levam ao aumento da expressão de mediadores transcricionais, incluindo FoxO1, FoxO3a, NF-κB, dentre outros. Os mediadores transcricionais se ligam às regiões promotoras dos genes MuRF1 e MAFbx/atrogina-1, induzindo a ativação dos atrogênes nas fibras musculares. A figura traz uma estrutura representativa dos domínios de cada atrogene. Modificado de Bodine e Baehr (2014).

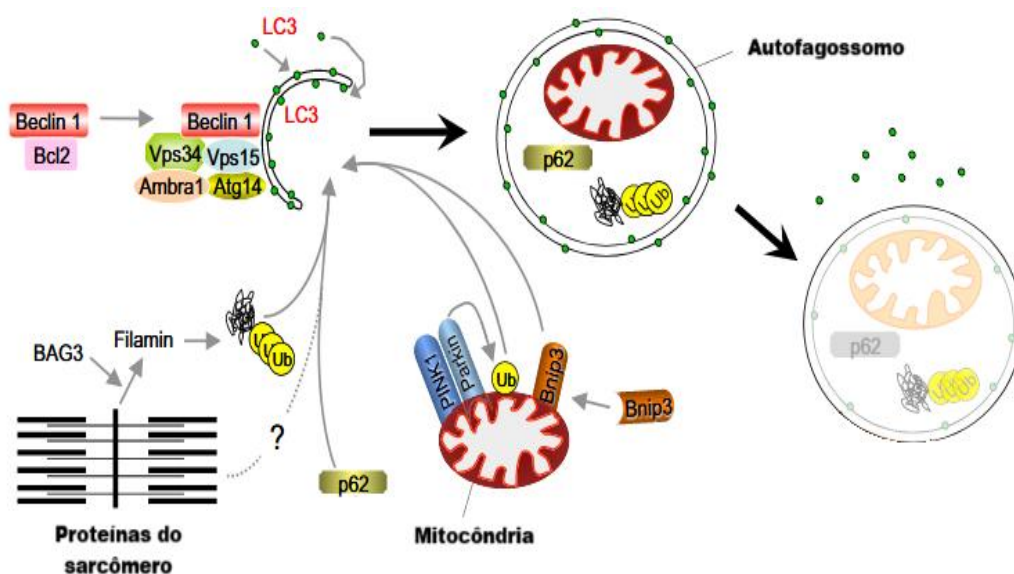


Figura 10. Macroautofagia de organelas e proteínas da musculatura esquelética. A macroautofagia é desencadeada pela ativação de um complexo regulador (contendo Vps34, Beclin 1, Vps15, Ambra1 e Atg14) que induz o recrutamento de LC3 para a formação do autofagossomo. A degradação mitocondrial é mediada pelo complexo PINK1-parkina e os fatores Bnip3. As proteínas BAG3 e filamina são marcadas por cadeias de poliubiquitina e transferidas ao autofagossomo pela proteína p62. Modificado de Bonaldo e Sandri (2013).

1.3 Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs)

As Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs) são um grupo de distúrbios neurodesenvolvimentais hereditários nas quais a neurotransmissão colinérgica é prejudicada nas JNMs. As SMCs são resultantes de variantes patogênicas em genes que codificam proteínas essenciais para a sinapse neuromuscular e, até o ano de 2025, foram identificadas aproximadamente 40 variantes patogênicas em genes que codificam as proteínas presentes nas JNMs (Ohno et al., 2025) (**Tabela 2**). As miastenias congênitas são classificadas conforme a localização da proteína mutante na JNM. Dessa forma, existem diferentes quadros de SMC: SMC pré-sináptica (prevalência de ~5-10%), SMC associada à lâmina basal (prevalência de ~13%), SMC pós-sináptica (prevalência de ~76,3%) e um quarto subtipo de SMC que compreende distúrbios relacionados à glicosilação (prevalência de ~3-7%) (Engel et al., 2015; Ohno et al., 2025). As manifestações clínicas das SMCs frequentemente surgem nos primeiros anos de vida e são caracterizadas pela hipotonia, fadiga muscular, ptose, oftalmoplegia, dificuldade na alimentação e, em casos extremos, ocorrem disfunções respiratórias, que podem resultar em morte (Pugliese et al., 2023). O diagnóstico das SMCs é baseado no

histórico familiar, na examinação clínica quando ocorrem as manifestações dos sintomas, nos exames neurofisiológicos e nos testes de sequenciamento genético.

As SMCs pré-sinápticas são desordens raras e acometem principalmente o gene *SLC18A3* que codifica as proteínas ChAT e VACHT. Visto que ambas as proteínas são fundamentais para o ciclo de ACh, o distúrbio em alguma delas resulta na disfunção da síntese e armazenamento do neurotransmissor e, por consequência, na liberação da acetilcolina (Ohno et al., 2023; Pugliese et al., 2023).

Variantes patogênicas no gene *SLC18A3* que codificam o VACHT levam a um quadro de SMC hereditária autossômica recessiva (O’Grady et al., 2016; Aran et al., 2017; Schwartz et al., 2018; Lamond et al., 2021; Della Marina et al., 2021). A disfunção de VACHT tem sido associado às formas mais graves de manifestações clínicas para as SMCs e ocorre ainda no período neonatal (Pugliese et al., 2023). Ademais, Hakoken et al. (2019) descreveram dois casos de SMC decorrentes do distúrbio da proteína VACHT em fetos humanos, nos quais os pacientes apresentaram acinesia fetal, artrogripose, edema corporal generalizado e características dismórficas.

Anteriormente à descrição dos casos clínicos associados à variante patogênica do gene que codifica o VACHT, os nossos colaboradores nesse trabalho, Professores Marco e Vânia Prado da University of Western Ontario, geraram camundongos geneticamente modificados que apresentam a expressão reduzida do VACHT em 65% (VACHT-KD^{HOM}) (Prado et al., 2006). O modelo foi criado inicialmente para compreender o papel do VACHT na neurotransmissão colinérgica no SNC e SNP, contudo, com a descrição clínica de pacientes miastênicos que apresentam disfunção de VACHT, os animais VACHT-KD^{HOM} também caracterizaram-se como um modelo de estudo para esse quadro miastênico, uma vez que estes camundongos apresentam déficits colinérgicos semelhantes aos sinais clínicos das SMCs em humanos e, assim, mimetizam uma SMC pré-sináptica (Prado et al., 2006).

Como mencionado, os casos clínicos apontaram um quadro bastante preocupante na SMC pré-sináptica decorrente do distúrbio da proteína VACHT. Contudo, por ser recente o aparecimento dos relatos clínicos da SMC com deficiência do transportador, pouco se sabe sobre os efeitos dos fármacos no tratamento nesse tipo de miastenia. Inicialmente, é utilizado o anticolinesterásico piridostigmina, sendo essa classe farmacológica a mais comum para o tratamento das SMCs independentemente da etiologia do quadro miastênico (Engel et al., 2015; Vanhaesebrouck; Beeson, 2019) (**Tabela 3**). Na SMC pré-sináptica com disfunção de VACHT, o tratamento com a piridostigmina melhorou de maneira moderada os sintomas dos pacientes (O’Grady et al., 2016; Schwartz et al., 2018; Lamond et al., 2021; Della Marina et

al., 2021). Similarmente ao observado na clínica, dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a administração da piridostigmina atenuou parcialmente a disfunção motora dos camundongos miastênicos VACHT-KD^{HOM} (Magalhães-Gomes et al. 2018). Para alguns quadros de SMC, além do uso de anticolinesterásico, outras estratégias terapêuticas são utilizadas como tratamento, incluindo a administração de agonistas β 2-adrenérgicos (Beeson, 2023) (**Tabela 3**). Em contrapartida, para as SMCs pré-sinápticas, intervenções farmacológicas além da piridostigmina foram pouco testadas na prática clínica (Pugliese et al., 2023; Ohno et al., 2023). Portanto, se faz necessário a investigação de outras terapias farmacológicas para atenuar ou reverter as disfunções colinérgicas das SMCs pré-sinápticas, incluindo a SMC decorrente da deficiência da proteína VACHT.

Local da mutação	Mecanismos	Gene	Proteína
Pré-sináptico	Defeitos na reciclagem de ACh	SLC5A7	ChT
	Defeitos na síntese de ACh	CHAT	ChAT
	Defeitos na internalização e armazenamento de ACh nas vesículas sinápticas	SLC18A3	VACHT
	Defeitos na ancoragem, fusão e exocitose de ACh	SNAP25B	SNAP-25
		UNC13A	Munc13
	Defeitos no transporte axonal de proteínas	SYB1/VAMP1	VAMP1
		SYT2	Sinaptotagmina 2
		PREPL	Prolyl Endopeptidase-Like
		MYO9A	Miosina IXA
Associado à lâmina basal	Deficiência na AChE	COLQ	Subunidade da cauda de colágeno da AChE
	Defeitos da membrana basal sináptica	COL13A1	Colágeno tipo 13 α 1
		LAMA5	Laminina α 5
		LAMB2	Laminina β 2
	Defeitos no agrupamento de AChR	AGRN	Agrina
Pós-sináptico	Redução no n° de AChR	CHRNA1	Subunidades de AChR
		CHRNA1	
		CHRNA1	
		CHRNA1	
		CHRNA1	
	Alteração na cinética da função de AChR (síndromes de canal lento)	CHRNA1	Subunidades de AChR
		CHRNA1	
		CHRNA1	
		CHRNA1	
		CHRNA1	
	Alteração na cinética da função de AChR (síndromes de canal rápido)	CHRNA1	Subunidades de AChR
		CHRNA1	
		CHRNA1	
		CHRNA1	
		CHRNA1	
	Defeitos no agrupamento de AChR	LRP4	Proteína 4 relacionada ao receptor de LDL
		MUSK	Proteína quinase músculo-específica
		DOK7	Proteína de ancoragem 7 (<i>downstream of kinase 7</i>)
	Defeitos no canal de Na ⁺ na fibra muscular	RAPSN	Rapsina
		SCN4A	Canais de Na ⁺ Nav 1.4
	Deficiência de plectina	PLEC	Plectina
Glicosilação	Defeitos na glicosilação	ALG2	α -1,3 Manosiltransferase
		ALG14	UDP-N-acetilglucosaminiltransferase
		DPAGT1	Dolicol-fosfato N-acetilglucosamina fosfotransferase 1
		GFPT1	Glutamato-frutose-6-fosfato transaminase 1
		GMPPB	GDP-manose pirofosforilase

Tabela 2. Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs). Modificado de Vanhaesebrouck e Beeson (2019).

Fenótipo	Gene	Herança	ENMG (baixa frequência)	ENMG (alta frequência)	Tratamentos						
					CHEIs (anticolinesterásicos)	Efedrina	Salbutamol (agonista β_2 - adrenérgico)	Amifampridina	Quinidina	Fluoxetina	Acetazolamida
SMC causada pelo defeito na síntese de ACh	<i>CHAT</i>	AR	Sem decremento	Decremento em alguns pacientes	Efetivo						Efetivo
SMC causada pelo defeito no armazenamento de ACh	<i>SLC18A</i>	AR	Decremento em repouso ou somente após contração muscular isométrica	Decremento em alguns pacientes	Efetivo	Efetivo					Efetivo
SMC causada pelo defeito na reciclagem de ACh	<i>SLC5A7</i>	AR	Decremento em repouso ou somente após contração muscular isométrica	Decremento em alguns pacientes	Efetivo	Efetivo					Inefetivo
SMC causada pelo defeito na ancoragem, fusão e exocitose de ACh	<i>PREPL</i>	AR	Decremento em repouso ou somente após contração muscular isométrica	Decremento em alguns pacientes	Efetivo						

Tabela 3. Terapias farmacológicas para as SMCs pré-sinápticas. AR: autossômico recessivo; ENMG: Eletro-neuromiografia. Modificado de Ohno et al. (2023).

1.4 Terapias farmacológicas para as SMCs

1.4.1 Anticolinesterásicos

Os anticolinesterásicos são fármacos que agem na inibição de enzimas colinesterases que catalisam a hidrólise de ACh. Há dois tipos distintos de colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). Ambas as enzimas apresentam estruturas semelhantes e são formadas pelas subunidades assimétricas e subunidades globulares catalíticas (Quinn, 1987). Contudo, elas diferem na sua distribuição no organismo, especificidade por substrato e função (Rosenberry, 1975).

Nas JNMs de mamíferos, a AChE está ancorada à lâmina basal sináptica pela ColQ e atua rapidamente na hidrólise de ACh em colina e acetato, interrompendo a sinalização das sinapses neuromusculares (Gašperšič et al., 1999). A AChE apresenta dois sítios ativos: um sítio aniônico que interage com a colina da ACh e um sítio esterásico, onde o resíduo de serina (Ser²⁰⁰) catalisa os ésteres de colina da ACh, liberando a colina na fenda sináptica e formando um intermediário acetil-AChE. Em seguida, há o processo de hidrólise, liberando o grupo acetil da AChE e regenerando a enzima (Shen et al., 2002; Silman; Sussman, 2008).

Os anticolinesterásicos atuam na inibição dos sítios ativos da AChE e podem ser divididos de acordo com o seu mecanismo de ação: inibidores reversíveis e inibidores

irreversíveis. Os inibidores reversíveis abrangem os carbamatos que possuem compostos com diferentes grupos funcionais: carbamato contendo grupos amônio terciário ou quaternário (Čolović et al., 2013). Os carbamatos reversíveis são os anticolinesterásicos de maior importância na clínica para o tratamento de distúrbios nas quais há o comprometimento colinérgico (Maggi; Mantegazza, 2011; Čolović et al., 2013; Engel et al., 2015). Eles agem na carbamilação do resíduo Ser²⁰⁰ da AChE e interrompem a atividade da enzima, contudo, o resíduo carbamilado é pouco estável e o grupo carbamil do anticolinesterásico é separado da AChE por meio de hidrólise espontânea, assim, a AChE tem a sua atividade retomada. Por este motivo, os carbamatos reversíveis possuem uma curta ou média duração (Darvesh et al., 2008).

1.4.1.1 Piridostigmina

Para o tratamento das SMCs, um dos anticolinesterásicos mais utilizados na clínica é a piridostigmina (Vanhaesebrouck; Beeson, 2019) (**Figura 11**). A piridostigmina é um carbamato reversível contendo amônio quaternário e tem ação similar a outros carbamatos reversíveis, incluindo a neostigmina, no entanto, seus efeitos adversos são menores e seu tempo de meia-vida é maior em relação a esta droga (Aquilonius; Hartvig, 1986; Maggi; Mantegazza, 2011). Por conter o grupo amônio quaternário, a piridostigmina é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, assim, tem a sua ação restringida ao SNP (Friedman et al., 1996). Portanto, devido a estas propriedades, a piridostigmina foi a primeira opção terapêutica para o tratamento dos diferentes quadros de miastenias durante muitos anos.

A administração da piridostigmina, a princípio, é associada à melhora do fenótipo miastênico dos pacientes em alguns quadros de SMC (Engel et al., 2015; Ohno et al., 2023). No entanto, há quadros de SMC, em que a intervenção farmacológica com o anticolinesterásico não resulta na melhora dos sintomas e, em alguns casos, ainda contribui para a piora dos pacientes, como nas SMCs associadas às variantes patogênicas em genes relacionados a proteínas da lâmina basal (Ohno et al., 1998; Bestue-Cardiel et al., 2005). Nestes casos, a piora do quadro clínico está relacionada ao agravamento dos distúrbios colinérgicos resultantes do aumento exacerbado da ACh na fenda sináptica. Ainda, o uso a longo prazo do anticolinesterásico também pode induzir efeitos adversos na neurotransmissão colinérgica, incluindo a disfunção neuromuscular (Engel; Lambert; Santa, 1973; Richtsfeld; Blobner, 2013; Ramdas; Beeson, 2021). Para as SMCs de origem pré-sináptica, a piridostigmina não possui efeitos adversos e resulta na melhora apenas moderada dos

pacientes, os quais ainda apresentam comprometimento da função colinérgica (Pugliese et al., 2023; Ohno et al., 2023). Semelhante ao observado na clínica, a administração do anticolinesterásico no modelo VACHT-KD^{HOM} atenuou parcialmente os déficits motores (Magalhães-Gomes et al., 2018). Enquanto para as demais SMCs já há tratamentos como alternativa ao uso do anticolinesterásico, para as SMCs pré-sinápticas, até o presente momento, não há relatos de outras estratégias farmacológicas além do inibidor da AChE (Pugliese et al., 2023; Ohno et al., 2025). Dessa forma, a investigação de outros esquemas terapêuticos como alternativa ao uso da piridostigmina, ou até mesmo em combinação com o anticolinesterásico para eventualmente ampliar seus efeitos, é essencial para aprimorar o tratamento das SMCs pré-sinápticas e, com isso, proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

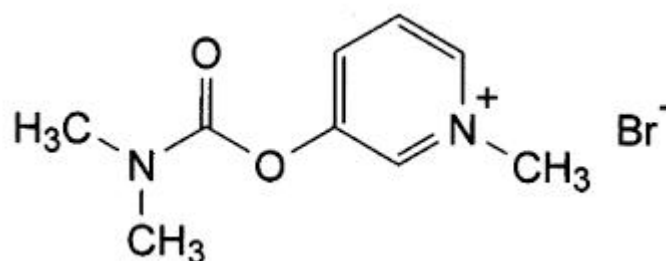


Figura 11. Fórmula estrutural da piridostigmina (brometo de 3-hidroxi-1 metil piridínio dimetil carbamato).

1.4.2 Agonistas β 2-adrenérgicos

Os agonistas β 2-adrenérgicos são classicamente utilizados na clínica para o tratamento de asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) (Page; Barnes, 2017). Nessas doenças respiratórias, os simpatomiméticos se ligam aos receptores β 2-adrenérgicos, que estão amplamente distribuídos na musculatura lisa brônquica. A interação do agonista com o adrenoceptor- β 2 induz a broncodilatação das vias aéreas, aliviando a respiração dos usuários dessa classe de fármacos (Page; Barnes, 2017; Tashkin, 2020).

No entanto, a distribuição dos receptores β 2-adrenérgicos não se restringe apenas à musculatura lisa dos brônquios. Estes receptores também são abundantes na musculatura esquelética e sua ativação produz efeitos na função contrátil muscular, que incluem a intensificação da força de pico (efeito inotrópico positivo) e facilitação do relaxamento muscular (efeito lusitrópico positivo) (Cairns; Borrani, 2015). Sendo assim, os adrenoceptores- β 2 são alvos de agonistas β 2-adrenérgicos em situações que visam à melhora

da performance física e ao aumento da força muscular e, também, em casos nos quais há perda muscular e comprometimento motor, a saber: sarcopenia, caquexia por câncer, estresse metabólico, desnervação, inatividade, síndrome da imunodeficiência adquirida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), insuficiência renal ou cardíaca crônica, distrofias musculares e distúrbios neuromusculares (Lynch; Ryall; 2008).

Nos anos recentes, os agonistas $\beta 2$ vêm sendo amplamente utilizados para algumas SMCs pós-sinápticas e algumas SMCs associadas à lâmina basal sináptica nas quais o tratamento com anticolinesterásicos é ineficaz ou produz efeitos adversos (Lashley et al., 2010; McMacken et al., 2019; Vanhaesebrouck et al., 2019; Webster et al., 2020). A seguir, serão relatados os mecanismos pelos quais os agonistas $\beta 2$ atuam na musculatura esquelética e nas JNMs, e como a sua administração pode estar associada à melhora do fenótipo miastênico nos pacientes e modelos murinos para as SMCs.

1.4.2.1 Agonistas $\beta 2$ na musculatura esquelética

Existem três tipos de receptores β -adrenérgicos: $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$, sendo o $\beta 2$ o mais abundante na musculatura esquelética (Cairns; Borrani, 2015). Todos os receptores β -adrenérgicos possuem uma estrutura conservada composta por sete hélices transmembranares, formando três alças extracelulares, incluindo um amino terminal, e três alças intracelulares, incluindo um carboxi terminal (**Figura 12A**). Os receptores β -adrenérgicos são compostos por uma sequência de 413 resíduos de aminoácidos (Anderson et al., 1994; Johnson, 2001) (**Figura 12B**). Os adrenoceptores- β são acoplados à proteína G, constituída por três subunidades: α , β e γ (Morris; Malbon, 1999) (**Figura 12A**). As subunidades $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) formam um dímero, enquanto a subunidade α ($G\alpha$) em seu estado inativo está ligada ao difosfato de guanosina (GDP) e interage com o dímero por meio da porção carboxi terminal da subunidade γ . A partir da ativação dos adrenoceptores, ocorre a troca de GDP por trifosfato de guanosina (GTP) na subunidade α , resultando em alterações conformacionais que induzem a dissociação de $G\alpha$ com $G\beta\gamma$, em que ambas as subunidades atuam na sinalização de cascatas intracelulares (Joassard et al., 2013).

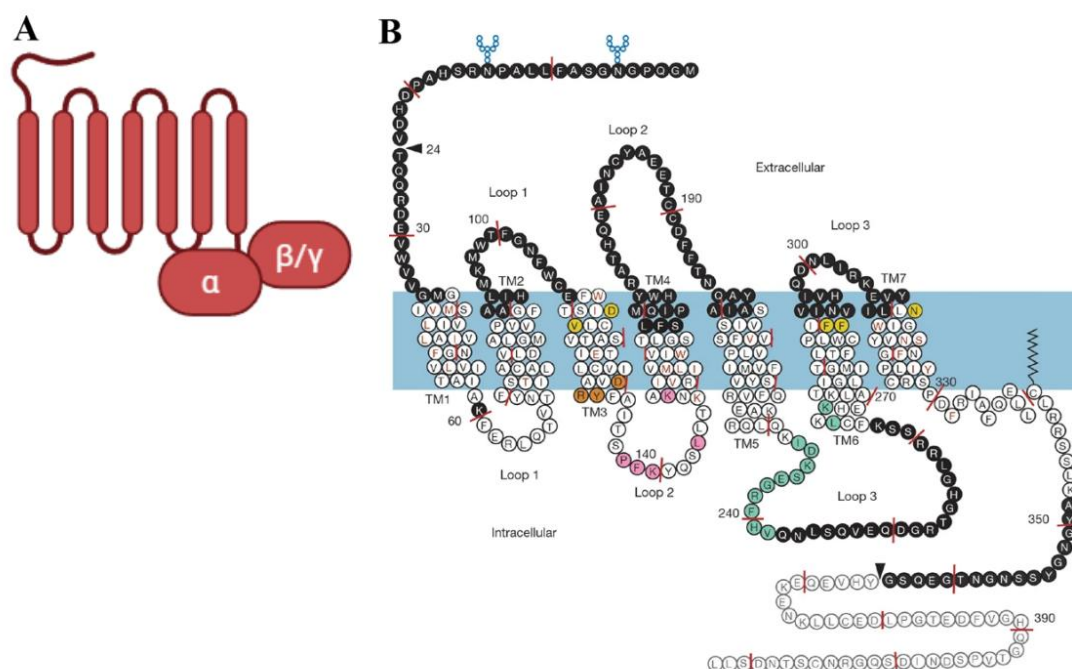


Figura 12. Estrutura dos receptores $\beta 2$ -adrenérgicos. A- Esquema representativo da estrutura dos adrenoceptores- $\beta 2$ com as sete hélices transmembranares acopladas a uma proteína G com suas três subunidades: α , β , e γ . B- Sequência dos aminoácidos que compõem os receptores $\beta 2$ -adrenérgicos. Adaptado de Rasmussen et al. (2007).

Na musculatura esquelética, a interação do ligante com os adrenoceptores- $\beta 2$ ativa as cascatas de sinalização através do acoplamento com $G_{\alpha s}$ (estimulatória) e $G_{\alpha i}$ (inibitória), e também de $G\beta\gamma$ de modo independente de $G\alpha$ (Xiao, 2001; Gosmanov; Wong; Thomason, 2002). Os efeitos anabólicos na musculatura esquelética ocorrem principalmente por meio da ativação de $G_{\alpha s}$ por agonistas $\beta 2$ -adrenérgicos. $G_{\alpha s}$ ativa a adenilato ciclase que converte ATP em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), em que o aumento dos níveis intracelulares de cAMP resulta na ativação de proteínas quinases dependentes de cAMP (PKA), que por meio das suas subunidades catalíticas fosforilam os resíduos serina e treonina de diversas proteínas. A PKA está localizada em diferentes microdomínios, como próximo ao sarcolema, aos túbulos T e, também, aos retículos sarcoplasmáticos (Cairns; Borrani, 2015). Nestes casos, as diferentes isoformas de PKA atuam na modulação do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC) e nos canais para Ca^{++} (Wong et al., 2001). A ativação de NKCC intensifica a despolarização do sarcolema, ao passo que a ativação de canais para Ca^{++} nos túbulos T e no retículo sarcoplasmático induz a liberação de íons Ca^{++} no sarcoplasma. Dessa forma, a potencialização de ambos os processos através da PKA está intimamente relacionada

ao aumento da força de contração muscular (Cairns; Borrani, 2015). Ainda, sabe-se que, sob a ativação de adrenorreceptores- β_2 por agonistas, a PKA é capaz de se difundir para o núcleo celular, onde regula a expressão de genes por meio da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB) (Lynch; Ryall, 2008; Schiaffino et al., 2021). CREB é um fator de transcrição nuclear que, na musculatura esquelética, está envolvido com vários eventos anabólicos e anticatabólicos. CREB é capaz de se ligar à região promotora do receptor nuclear órfão NOR-1 (NR4A3), na qual a ativação de NR4A3 induz a redução da transcrição de miostatina, proteína membro da família do fator de transformação de crescimento beta (TGF β) envolvida na proteólise de fibras musculares (McPherron; Lawler; Lee, 1997; Ohkura et al., 1998; Wang; Pessin, 2013). Ademais, CREB estimula a transcrição de fatores miogênicos da família MRF, como MyoD, miogenina, Myf5 e Mef2 e, portanto, contribui para o crescimento muscular (Sartorelli et al., 1997; Schiaffino et al., 2021). Além disso, foi mostrado que o aumento de CREB resultante do uso de agonistas β_2 contribui para o aumento da expressão do receptor ativado por proliferador de peroxissomo- γ (PPAR γ) co-ativador 1 α 4 (PGC-1 α 4). A ativação de PGC-1 α 4 aumenta a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que por sua vez está associado à ativação da via de sinalização PI3K-Akt-mTORC1 (Rommel et al., 2001; Ruas et al., 2012). Essa via também pode ser estimulada pelo complexo proteico Epac-Rap, que é ativado pelo aumento dos níveis intracelulares do cAMP e de modo independente de PKA (Baviera et al., 2010). A cascata de sinalização PI3K-Akt-mTORC1 estimula as sínteses de proteínas sarcoméricas e miofibrilares e, portanto, atua em processos hipertróficos na musculatura esquelética (Kline et al., 2007; Gonçalves et al., 2019). A proteína quinase B (Akt), além de induzir a ativação do complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTORC1) para promover a hipertrofia, inibe a ativação de vias relacionadas à atrofia muscular. A Akt inibe a expressão do regulador transcricional FoxO, responsável por ativar fatores de transcrição envolvidos com processos catabólicos dos sistemas ubiquitina-proteassomo e macroautofagia (Sandri et al., 2004; Bonaldo; Sandri, 2013; Milan et al., 2015). Por fim, a administração de agonistas β_2 -adrenérgicos induz a supressão de calpaínas (proteases ativadas por Ca^{++}) por induzir a expressão de calpastatina, proteína endógena que inibe calpaína (Navegantes et al., 2001). Logo, em resumo, os agonistas β_2 -adrenérgicos atuam na ativação da via G α s-adenilato ciclase-cAMP-PKA-CREB e PI3K-Akt-mTORC1, as quais ambas as vias são associadas com processos hipertróficos e anti-atróficos da musculatura esquelética (Joassard et al., 2013).

Além dos estímulos hipertróficos a partir da ativação de G α s, os receptores β_2 -adrenérgicos também ativam cascatas de sinalização intracelular através de G α i e G $\beta\gamma$ na

musculatura esquelética. Sabe-se que sob a estimulação agonistas β 2-adrenérgicos, as subunidades $G_{\alpha i}$ - $G_{\beta \gamma}$ ativam a via PI3K-Akt e também a via da proteína quinase ativada por mitógeno 1 e 2 (MAPK1/2), que por sua vez estimula as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e ainda ativa NKCC (Gosmanov; Wong; Thomason, 2002). Foi demonstrado que ERK1/2 promove a síntese de proteínas musculares também pela via de sinalização mTORC1 (Carriere et al., 2011). Ademais, dados na literatura descrevem que $G_{\alpha i}$ - $G_{\beta \gamma}$ também suprime vias atroficas induzidas por FoxO e pela expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que medeiam a transcrição dos atrogenes MuRF1 e MAFbx (Minneti et al., 2011).

1.4.2.2 Agonistas β 2 nas JNMs

Para as JNMs, a modulação do sistema adrenérgico através do uso de agonistas β 2 é melhor elucidada na terminação pós-sináptica. Foi demonstrado que a ablação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) resultou na elevação da expressão de MuRF1 (Rodrigues et al., 2019). O aumento de MuRF1, além de induzir a atrofia muscular, tem sua atividade associada à ativação da via autossômica-lisossomal na placa motora e induz a degradação de nAChRs (Khan et al., 2014; Straka et al., 2021). Ademais, a ativação de $G_{\alpha i 2}$ pelo SNS previne o aumento de MuRF1 e outros fatores, que, junto com MuRF1, contribuem para a instabilidade dos nAChRs (Rodrigues et al., 2019). Sabe-se também que a ativação de Gas, induz o aumento de adenilato ciclase, que estimula a via cAMP-PKA, a qual suprime a expressão das vias associadas à autofagia de nAChRs (Silveira et al., 2020).

Na terminação axonal, as cascatas de sinalização a partir da ativação de receptores β 2-adrenérgicos ainda são motivo de investigação. Todavia, foi demonstrado que a ablação do SNS também causa a redução da liberação de ACh (Rodrigues et al., 2019), ao passo que as catecolaminas endógenas agem facilitando a transmissão neuromuscular (Tsentssevitsky; Kovyazina; Bukharaeva, 2019). Ademais, sabe-se que há a colocalização íntima dos receptores β 2-adrenérgicos com os nAChRs na placa motora (Khan et al., 2016). Ainda, a literatura mostra que, sob a estimulação de agonistas β 2, os adrenoceptores- β 2 são capazes de potencializar a neurotransmissão das JNMs por meio da abertura de canais para Ca^{++} dependentes de voltagem do tipo P/Q e/ou TRPV1 na terminação pré-sináptica (Rodrigues et al., 2019; Santos et al., 2025).

1.4.2.3 Estrutura dos agonistas β 2

Os agonistas β 2-adrenérgicos se acoplam às hélices transmembranares das regiões hidrofóbicas dos adrenoceptores- β 2 e se ligam aos sítios ativos do receptor localizados em um resíduo de aspartato (Asp¹¹³), em dois resíduos de serina (Ser²⁰⁴ e Ser²⁰⁷) e em dois de fenilalanina (Fen²⁵⁹ e Fen²⁹⁰) (Johnson, 2001). O Asp¹¹³ interage com o nitrogênio do agonista β 2, ao passo que os resíduos Ser²⁰⁴ e Ser²⁰⁷ interagem com grupos hidroxila no anel fenil do mesmo (Anderson et al., 1994). Os agonistas apresentam um centro assimétrico devido à presença de um grupo β -hidroxila. O centro assimétrico é resultante de um par de enantiômeros R e S (Johnson, 2001). Alguns agonistas possuem dois centros assimétricos, produzindo quatro enantiômeros, que podem ser classificados em: RR, SS, RS e SR (Bai, 1992). Como os sistemas biológicos formam ligações estereoespecíficas que ocorrem principalmente nos enantiômeros R, a depender da composição dos enantiômeros do agonista, a sua interação com o receptor será de maior potência (Johnson et al., 1993). Ainda, o grau de afinidade do agonista com o receptor β 2-adrenérgico é baseado na velocidade de difusão do agonista até a sua ligação com os sítios ativos do adrenoceptor- β 2 (Johnson et al., 1993; Johnson, 2001).

Uma característica de alguns agonistas β 2-adrenérgicos é que eles são anfipáticos e, com isso, têm a capacidade de se inserir na bicamada lipídica adjacente ao local onde os adrenoceptores- β 2 estão localizados. Essa propriedade destes simpatomiméticos envolve a interação da cadeia lateral lipofílica com um segmento transmembrana do receptor e interação da cabeça hidrofílica contendo saligenina — mimetiza a epinefrina e apresenta o grupo fenil — do agonista com um sítio de ligação auxiliar (exosítio) presente no quarto domínio transmembrana do receptor β 2-adrenérgico (Brittain, 1990; Green et al., 1996; Szlenk; Gc; Natesan, 2021). A partir dessa interação com exosítio, o agonista não consegue se dissociar do adrenoceptor, de modo que seu grupo saligenina segue interagindo com os sítios ativos do receptor e, portanto, o fármaco continua biologicamente ativo até que haja o término da sua capacidade de interação com os sítios ativos (Brittain, 1990; Johnson et al., 1993; Anderson et al., 1994). Sendo assim, os agonistas β 2-adrenérgicos, apesar de todos apresentarem o grupo saligenina, se diferem na porção hidrofóbica de suas caudas. Desta forma, agonistas como salmeterol e formoterol se diferenciam do salbutamol por apresentarem grupos hidrofóbicos adicionais em suas extremidades (Szlenk; Gc; Natesan, 2021) (**Figura 13**). Em vista disso, baseado nas características estruturais e na cinética de translocação dos agonistas na bicamada lipídica, eles foram classificados em três subtipos: agonistas β 2-adrenérgicos de curta duração

(SABAs); agonistas β_2 -adrenérgicos de longa duração (LABAs); agonistas β_2 -adrenérgicos de ultra-longa duração (ULTRA-LABAs) (Szlenk; Gc; Natesan, 2021).

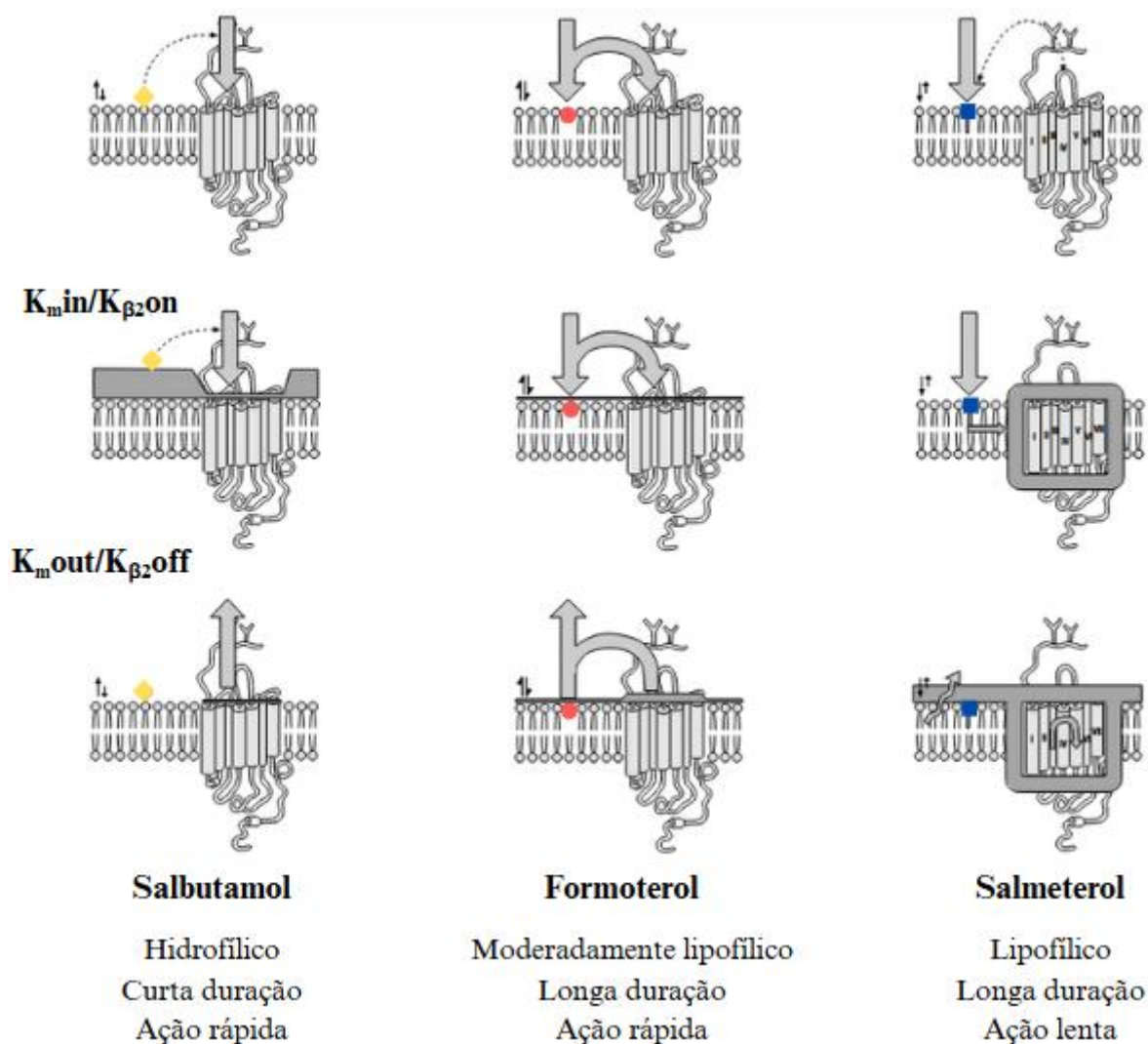


Figura 13. Modelo representativo para a interação dos agonistas formoterol, salbutamol e salmeterol com o adrenoceptor- β_2 e com a bicamada lipídica adjacente ao receptor. As pequenas setas à esquerda de cada painel mostram a proporção de equilíbrio do agonista β_2 -adrenérgico livre em comparação ao ancorado na bicamada lipídica. As grandes setas sombreadas mostram o movimento principal do fármaco. Durante a associação do salbutamol com o receptor, a interação do fármaco com o lipídio da membrana ($K_{m\text{in}}$) é muito desfavorável energeticamente (barreira sombreada escura) devido à sua alta hidrofiliicidade, e o salbutamol se associa diretamente ao receptor ($K_{\beta_2\text{on}}$). Portanto, o salbutamol apresenta início rápido, mas o fármaco difunde-se rapidamente dos tecidos, causando curta duração do efeito. A associação do formoterol tanto com o receptor quanto com a bicamada lipídica é relativamente favorável, permitindo um início rápido. O formoterol é retido na membrana para ser liberado por um período prolongado, ativando continuamente o adrenoceptor- β_2 . O

salmeterol associa-se predominantemente à bicamada lipídica, e sua interação com o adrenoceptor- β_2 é considerada energeticamente desfavorável, causando início de ação lento. No painel inferior, a dissociação do salbutamol e do formoterol do adrenoceptor- β_2 não é impedida ($K_{\beta_2\text{off}}$), embora a afinidade do formoterol pelo adrenoceptor- β_2 seja maior do que a do salbutamol. O formoterol é retido com afinidade moderada pela bicamada lipídica (K_{mout}). O salmeterol pode formar lentamente um complexo estável com adrenoceptor- β_2 , mas também é avidamente retido pela bicamada lipídica, o que explica o início lento, mas a longa duração. Modificado de Anderson et al. (1994).

1.4.2.4 Agonista β_2 -adrenérgico formoterol

O formoterol é uma feniletanolamina com os substituintes 4-hidroxi e 3-formamido no anel fenil e um substituinte N-(4-metoxifenil) propan-2-il (**Figura 14**). O fármaco é um agonista β_2 -adrenérgico classificado como LABA, tendo a meia-vida de aproximadamente 12 horas e o início do seu mecanismo de ação é de cerca de 5-10 minutos (Page; Barnes, 2017). Ele é moderadamente lipofílico e solúvel em água, ficando retido na bicamada lipídica e interagindo progressivamente com os sítios ativos do adrenoceptor- β_2 , contribuindo para sua longa duração (Anderson et al., 1994). O fármaco possui alta seletividade para os receptores β_2 -adrenérgicos, com um elevado perfil de segurança e tolerabilidade (Pauwels et al., 1997). É clinicamente administrado para o tratamento de asma e COPD como uma mistura racêmica de seus enantiômeros ativos (R;R) e inativos (S;S).

Devido às propriedades de rápida ação, durabilidade, alta seletividade para os adrenoceptores- β_2 e elevado perfil de segurança e tolerabilidade (Lecaillon et al., 1999), o formoterol foi selecionado neste estudo, objetivando investigar seus efeitos no fenótipo miastênico, nas JNMs e nas fibras musculares esqueléticas dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

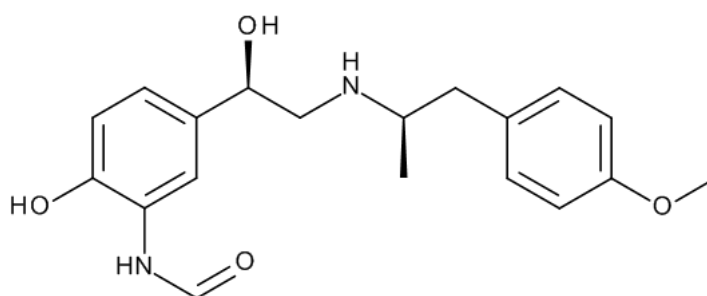


Figura 14. Estrutura do formoterol (N-[2-hidroxi-5-[1-hidroxi-2-[1-(4-metoxifenil)propan-2-ilamino]etil]fenil] formamida).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos de novas estratégias farmacológicas utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol e o anticolinesterásico piridostigmina no fenótipo motor e nas estruturas das JNMs e fibras musculares esqueléticas dos camundongos VACHT-KD^{HOM}, modelo murino que mimetiza uma SMC pré-sináptica.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos dos esquemas farmacológicos nos déficits motores observados nos camundongos VACHT-KD^{HOM}.
- Investigar os efeitos das estratégias terapêuticas na estrutura morfológica das JNMs dos músculos EDL e sóleo dos animais WT e VACHT-KD^{HOM}.
- Examinar os efeitos das diferentes estratégias farmacológicas na morfologia das fibras musculares dos músculos EDL e sóleo dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}.
- Avaliar os efeitos dos tratamentos testados no padrão de expressão das isoformas da MyHC nas fibras musculares esqueléticas dos músculos EDL e sóleo dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos VACHT-KD^{HOM}

Neste estudo, utilizamos camundongos selvagens e camundongos geneticamente modificados gerados pelos professores e colaboradores do nosso grupo de pesquisa Marco e Vânia Prado (Prado et al., 2006). Estes camundongos apresentam uma redução de 65% da proteína Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT-KD^{HOM}) e foram gerados através da técnica de recombinação homóloga. Na região 5' não traduzida do locus gênico do VACHT, foi inserido um cassete de 3.8 Kb que contém o gene de resistência ao antibiótico neomicina (neo) e o gene da enzima timidina quinase (TK) (**Figura 15**). Assim, ocorre a redução da tradução da proteína VACHT, permitindo que os animais sejam viáveis e mimetizem as disfunções cognitivas e motoras observadas nos pacientes diagnosticados com a SMC pré-sináptica. Os camundongos utilizados neste estudo eram todos machos com a idade de 3 meses e foram acondicionados em grupos de três a cinco animais por caixa (Alesco®) em uma sala com controle de temperatura (24 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro 12:12 horas, comida e água *ad libitum*. Estes animais encontram-se no biotério do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, sob responsabilidade da Profa. Cristina Guatimosim Fonseca. O uso desses animais e os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo CEUA-UFMG 40/2025.

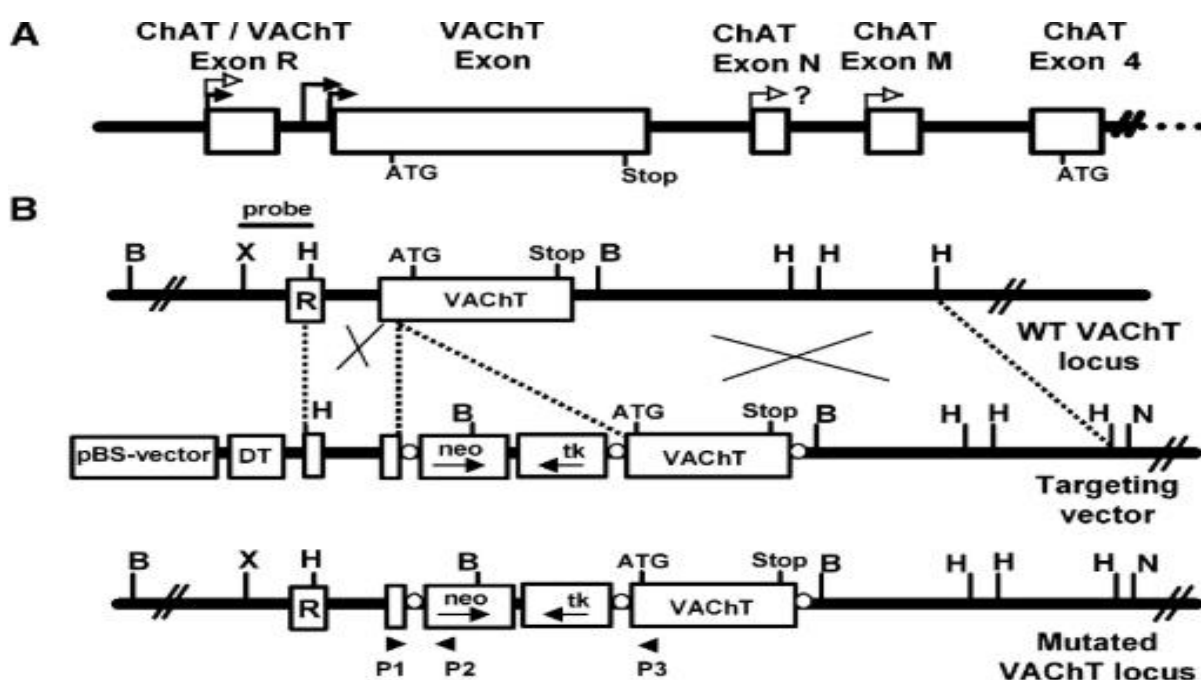


Figura 15. Esquema do locus gênico do VACHT. A- Organização gênica do VACHT com a janela aberta de leitura do transportador “downstream” ao exon R da ChAT. Importante notar que o gene do VACHT se localiza no primeiro íntron do locus gênico da ChAT B- Representação esquemática do locus do VACHT nos animais selvagens (WT), o vetor construído para a recombinação homóloga e o locus do VACHT após recombinação. Cabeças de setas indicam P1, P2 e P3 mostram as posições dos iniciadores usados para genotipagem. Adaptado de Prado et al. (2006).

Para a confirmação do genótipo e a identificação dos camundongos VACHT-KD^{HOM}, realizamos a genotipagem por PCR. Para a extração do DNA genômico, fragmentos da cauda ou orelha dos animais foram extraídos e colocados em 75 µL de solução básica (1.25 M de NaOH, 10 mM de EDTA) e incubados a 95°C durante 40 minutos no termobloco. Finalizados os 40 minutos, adicionou-se 75 µL de solução neutralizadora (2 M de Tris HCl) e, por fim, as amostras extraídas foram armazenadas em freezer a -4°C até a genotipagem por PCR ser realizada. Para a reação de PCR, foram utilizados 0.5 µL de 3 primers (P1, P2 e P3), 2.5 µL de H₂O, 5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega) e 2 µL do DNA genômico (**Tabela 4**) (**Figura 16**).

Primer	Sequência
P1	5' - TCATAGCCCCAAGTGGAGGGAGA -3'
P2	5' - GGAAGTTCCTGACTAGGGGAGGAG -3'
P3	5' - GGTTCATATCCCCGAGCTCCAGGAG -3'

Tabela 4. Primers utilizados para a genotipagem dos animais VACHT-KD^{HOM}.

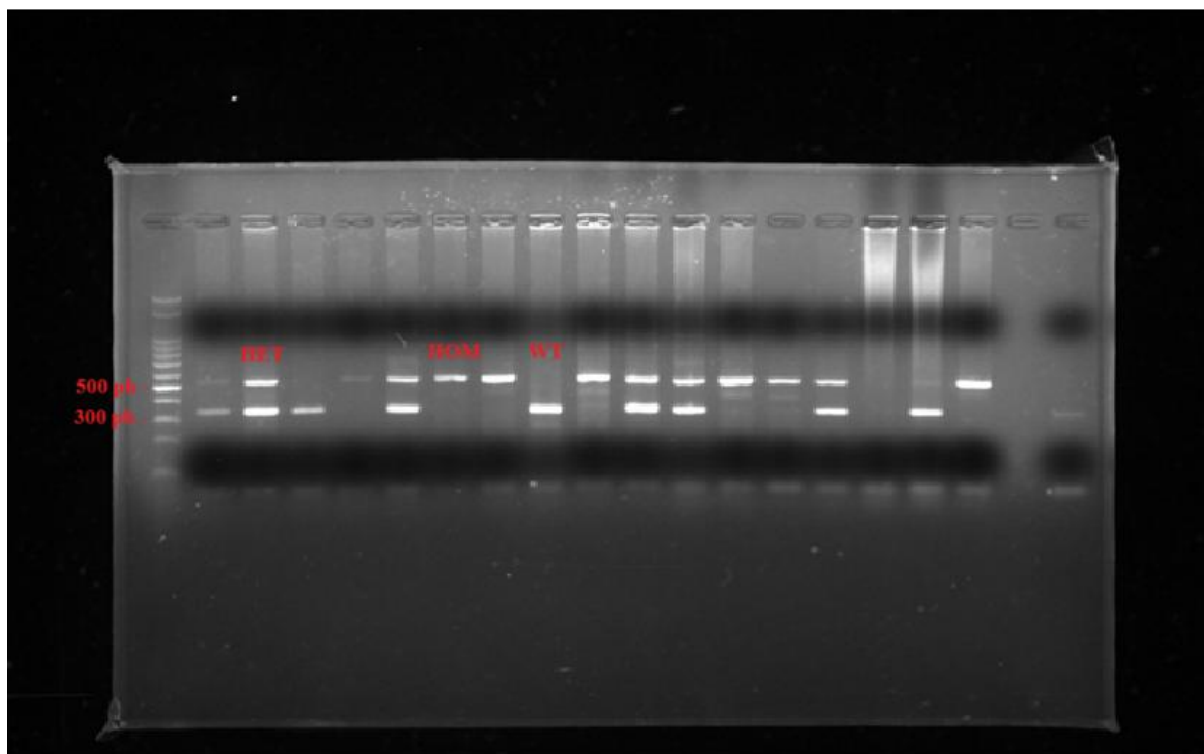


Figura 16. Análise de PCR com os fragmentos genômicos amplificados. As bandas com os fragmentos amplificados em 330 pares de base representam os animais WT; as bandas com os fragmentos amplificados em 530 pares de base representam os camundongos VACHT-KD^{HOM}; as bandas com os fragmentos amplificados em 330 e 530 pares de base representam os camundongos VACHT-KD^{HET}.

3.2 Testes comportamentais motores

Para a avaliação da capacidade motora e muscular dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}, e se os tratamentos iriam causar alterações do fenótipo motor nestes animais, realizamos três testes comportamentais motores no período anterior e na fase final de cada esquema farmacológico testado neste estudo.

- I. Força de agarre: O teste comportamental força de agarre foi originalmente desenvolvido por Tilson e Cabe (1978) e permite avaliar a força muscular exercida pelo animal, quando o mesmo é posto sobre uma haste metálica conectada a um transdutor de força, o qual está acoplado a um pequeno equipamento (Grip Strength Meter, Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, Brasil) que registra a força máxima realizada em gramas (g) pelo animal (**Figura 17**). Para realizar o teste, a base da cauda do camundongo foi segurada gentilmente e o animal foi puxado até perder a aderência com a haste e, assim, a força

máxima era registrada na tela do aparelho. O teste nos permite mensurar o pico de força exercida pelas patas anteriores e o pico de força exercida pelas quatro patas dos animais. Os camundongos foram submetidos a três sessões com intervalo de 20 segundos em cada parâmetro, e a média dessa triplicada foi calculada para analisar o desempenho do animal. Posteriormente, a média em gramas (g) foi convertida em Newton (N), e os dados obtidos foram representados no GraphPad Prism 8.0.2 para as análises estatísticas e os gráficos foram gerados.



Figura 17. Desenho esquemático do teste força de agarre.

- II. Esteira Giratória: Este teste consiste na avaliação da coordenação motora, resistência e de aprendizagem do animal sobre uma esteira cilíndrica giratória (**Figura 18**). Nós utilizamos o protocolo previamente descrito por Prado et al. (2006) com algumas modificações. Os camundongos foram submetidos à ambientação do aparato (Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, Brasil) no dia anterior ao teste, nas quais foram realizadas cinco sessões de 2 minutos com intervalo de 10 minutos sob uma velocidade constante de 5 RPM. No dia do teste, os animais foram colocados na esteira giratória na velocidade inicial de 5 RPM, com aumento progressivo até atingir a velocidade máxima de 20 RPM, totalizando 5 minutos de teste. O teste possibilita avaliar dois parâmetros: o tempo de latência de queda dos animais em segundos (s) e o número de quedas dos animais durante todo o período de teste. Ambos os parâmetros foram representados no GraphPad Prism 8.0.2 para as análises estatísticas e os gráficos foram gerados.

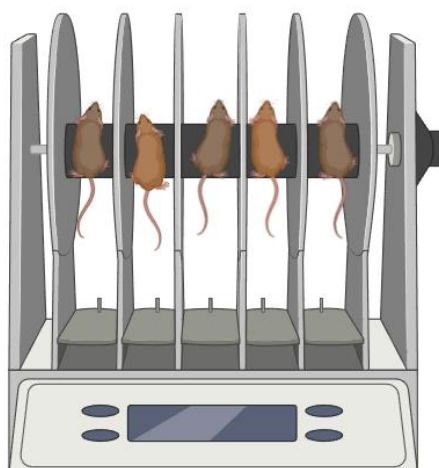


Figura 18. Desenho esquemático do teste esteira giratória.

III. Grade Invertida: O teste grade invertida avalia a capacidade de resistência e força muscular dos animais. O experimento comportamental foi realizado conforme o protocolo de Sango et al. (1996) e Rossi et al. (2024). Os camundongos foram colocados sobre uma grade metálica de 70 cm x 70 cm, e aguardava-se que o animal agarrasse firmemente a grade. Em seguida, a grade era gentilmente invertida e elevada a 60 cm sobre uma caixa preenchida de maravalha para amortecer a eventual queda do animal (**Figura 19**). Para cada camundongo, foram realizadas triplicatas de 120 segundos, com intervalo de 30 segundos. Caso o animal sofresse a queda antes do tempo determinado, o cronômetro era imediatamente paralisado e o tempo de latência contabilizado. A média em segundos (s) das triplicatas foi calculada e os dados obtidos foram representados no GraphPad Prism 8.0.2 para as análises estatísticas e os gráficos foram gerados.

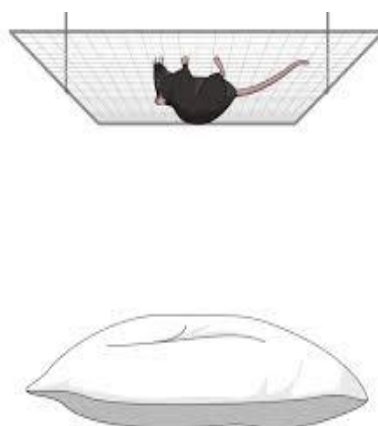


Figura 19. Desenho esquemático do teste grade invertida.

3.3 Esquemas farmacológicos

Neste estudo, foram realizados três esquemas farmacológicos nos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} a fim de investigar eventuais alterações comportamentais motoras e estruturais das JNMs e das fibras musculares esqueléticas resultantes de cada intervenção terapêutica realizada. A seguir, será descrita a metodologia utilizada para cada tratamento.

3.3.1 Tratamento de 30 dias com o agonista β 2-adrenérgico formoterol

Nesse esquema de tratamento, utilizamos o Fumarato de Formoterol Di-hidratado (Sigma-Aldrich®). Foram dissolvidos 10 mg do frasco do fármaco em 500 μ L de DMSO e, em seguida, diluídos em 10.611 μ L de solução salina 0,9%, para atingir a concentração de 3000 μ g/kg. Posteriormente, a droga foi estocada em alíquotas de 100 μ L e armazenada no freezer a -20°C. Nos dias de aplicação do formoterol, as alíquotas eram novamente diluídas em 900 μ L de solução salina 0,9% para obtermos a concentração de 300 μ g/kg da droga. Gonçalves et al. (2019) mostraram que a administração de 300 μ g/kg do simpatomimético induziu a ativação de vias de sinalização de genes relacionados a fatores anabólicos e a inibição de vias catabólicas de proteínas musculares esqueléticas.

Foram aplicadas injeções subcutâneas de formoterol (300 μ g/kg) ou salina (0.9% + 0.45% de DMSO) nas patas posteriores dos camundongos selvagens e VACHT-KD^{HOM}. O tratamento durou 30 dias consecutivos e, diariamente, os animais eram pesados para ajustar a concentração da droga a ser administrada para cada animal. Nos dias anteriores ao início do tratamento e na fase final de tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. No dia seguinte ao término do tratamento, os camundongos foram eutanasiados e os músculos foram retirados para pesagem e para realização das análises morfológicas (**Figura 20**).

Neste esquema farmacológico, foram utilizados 4 grupos experimentais com as seguintes configurações: 6 camundongos WT SAL, 7 camundongos WT FOR, 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR.



Figura 20. Desenho esquemático do tratamento de 30 dias com o simpatomimético formoterol.

3.3.2 Tratamento de 90 dias com o agonista β 2-adrenérgico formoterol

A metodologia utilizada neste tratamento foi semelhante ao tratamento de 30 dias com o formoterol, já citado anteriormente, sendo que a única diferença entre os esquemas farmacológicos foi a duração do tratamento, sendo esta estratégia farmacológica de 90 dias consecutivos. Assim como no tratamento de 30 dias com o formoterol, nos dias que antecederam o início do tratamento e nos dias finais do tratamento, os camundongos realizaram os testes comportamentais motores. No dia seguinte ao término do tratamento, os camundongos foram eutanasiados e os músculos foram retirados para pesagem e para a realização das análises estruturais (**Figura 21**).

Para este tratamento, foram utilizados 4 grupos experimentais com as seguintes configurações: 7 camundongos WT SAL, 7 camundongos WT FOR, 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR.



Figura 21. Desenho esquemático do tratamento de 90 dias com o agonista β 2-adrenérgico formoterol.

3.3.3 Tratamento combinado de 30 dias com o anticolinesterásico piridostigmina e o agonista β 2-adrenérgico formoterol

Nessa estratégia farmacológica, utilizamos o Fumarato de Formoterol Di-hidratado (Sigma-Aldrich®) e o Brometo de Piridostigmina (Sigma-Aldrich®) em conjunto. A metodologia para a dissolução e diluição do agonista β 2-adrenérgico formoterol foi semelhante aos tratamentos descritos acima. Em relação ao anticolinesterásico piridostigmina, diluiu-se 16 mg do fármaco em 60 mL de solução salina 0,9%. O cálculo baseou-se no peso médio dos animais e nos dias totais de tratamento. Em seguida, a droga foi estocada em alíquotas de 1000 µL e armazenada em freezer a -20°C. Em virtude da curta meia-vida do

anticolinesterásico, que é em média de 3-6 horas (Aquilonius; Hartvig, 1986; Maggi; Mantegazza, 2011), o fármaco foi administrado duas vezes ao dia.

Foram aplicadas injeções subcutâneas (s.c.) uma vez ao dia de formoterol (300 µg/kg) ou salina (0.9% + 0.45% de DMSO) nas patas posteriores e injeções intraperitoneais (i.p.) duas vezes ao dia de piridostigmina (500 µg/kg) ou salina (0.9% + 0.45% de DMSO) nos camundongos selvagens e VACHT-KD^{HOM}. O tratamento durou 30 dias consecutivos e, diariamente, os animais eram pesados para o ajuste das concentrações dos fármacos conforme o peso do camundongo. Do mesmo modo que os tratamentos anteriores, foram realizados testes comportamentais para avaliação da capacidade motora dos animais anteriormente ao tratamento e na fase final de tratamento. No dia seguinte ao término do tratamento, os animais foram eutanasiados e os músculos foram retirados para pesagem e para a realização das análises estruturais (**Figura 22**).

Neste tratamento, utilizamos 4 grupos experimentais com as seguintes configurações: 11 camundongos WT SAL, 11 camundongos WT PF, 11 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 11 camundongos VACHT-KD^{HOM} PF.

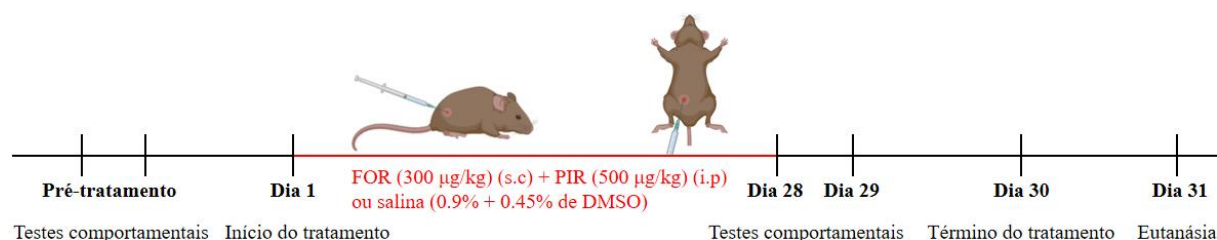


Figura 22. Desenho esquemático do tratamento combinado de 30 dias do anticolinesterásico piridostigmina e agonista β 2-adrenérgico formoterol.

3.4 Avaliação por imunofluorescência das JNMs

Para avaliação estrutural das JNMs, os animais de cada tratamento foram submetidos a anestesia geral, por solução anestésica cetamina 100 mg/kg e analgésica xilazina 10 mg/kg. Em seguida, foi feita uma incisão na caixa torácica e exposição do coração, na qual foi inserida uma agulha para insulina, conectada por meio de tubos capilares a uma bomba de infusão, no ventrículo esquerdo do coração. Ao iniciar o fluxo da bomba na velocidade de 4-6 mL por minuto, passaram-se 20 mL de PBS 1x para drenagem sanguínea, seguido da solução fixadora de 4% de paraformaldeído em 0,1 M de solução PBS 1x, com pH 7,4 a 4°C. Finalizada a perfusão transcardíaca com o fixador, os músculos EDL e sóleo foram dissecados. Ambos os músculos foram mantidos na solução de bloqueio com 3% de BSA (Sigma-

Aldrich®) e 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) diluídos em PBS 1x por 120 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se o anticorpo primário anti-sinaptotagmina ZNP-1 (1:250, DSHB) na solução de bloqueio e incubou-se overnight a 4°C. No dia seguinte, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1x e as amostras foram incubadas com o anticorpo Alexa Fluor 555 α -bungarotoxina (1:800, Thermo Fisher Scientific) em conjunto com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 IgG2a (1:600, Thermo Fisher Scientific) diluídos na solução de bloqueio durante 120 minutos em temperatura ambiente. Após os 120 minutos, foram feitas 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1x e, posteriormente, os músculos foram posicionados em lâminas utilizando o meio de montagem anti-fade Prolong Gold (Thermo Fisher Scientific).

3.5 Aquisição de imagens e análises morfológicas das JNMs

A aquisição das imagens das JNMs dos músculos EDL e sóleo foi realizada no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB-UFMG (CAPI). Foi utilizado o Microscópio Confocal Zeiss LSM 880, sob a objetiva de imersão em óleo de 63x e abertura numérica de 1,4. Para a excitação dos marcadores fluorescentes nas amostras, utilizamos o laser Argon (488 nm) e o laser HeNe (543 nm). Foram realizadas secções ópticas em série Z com intervalos de 1,50 μm para a reconstrução 3D das JNMs, e as imagens foram salvas em formato CZI. Foram analisadas 20 JNMs por músculo de cada animal dos grupos experimentais utilizados nos esquemas farmacológicos realizados. As imagens foram analisadas através do software Fiji ImageJ. As JNMs das amostras foram analisadas conforme o tamanho da área em micrômetros (μm^2) das terminações pré e pós-sinápticas, e o índice de colocalização das terminações foi calculado dividindo a área pré-sináptica pela área pós-sináptica e multiplicando por 100 para obter a porcentagem da área de colocalização.

3.6 Imunofluorescência para mensurar a área de secção transversal e para determinação das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) das fibras musculares esqueléticas

Para este conjunto de experimentos, os camundongos foram anestesiados e perfundidos como descrito no item 3.4. Os músculos EDL e sóleo foram dissecados e posicionados juntos em um molde plástico de inclusão e cobertos pela solução crioprotetora OCT (Fisher HealthCare), congelados em béquer inox contendo 2-metilbutano (Sigma-Aldrich®), resfriados em nitrogênio líquido e armazenados no freezer -80°C. Os tecidos foram

seccionados transversalmente na espessura de 10µm no criostato (LEICA CM3050 S) e as fatias obtidas foram transferidas para lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Em seguida, as lâminas foram preenchidas pela solução de bloqueio com 3% de BSA + 0,1% Triton X-100 diluídos em PBS 1x por 90 minutos em temperatura ambiente. Após os 90 minutos, foram adicionados os anticorpos primários anti-MyHC tipo I (1:100, BA-D5, DSHB), anti-MyHC tipo IIA (1:100, SC-71, DSHB), anti-MyHC tipo IIX (1:100, BF-35, DSHB, que reconhece todas as isoformas da MyHC, exceto a tipo IIX) e anti-MyHC tipo IIB (1:100, BF-F3, DSHB) na solução de bloqueio e incubados overnight a 4°C. No dia seguinte, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com PBS 1x e, em sequência, foram adicionados os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG1 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, reconhece os anticorpos do tipo IIA e tipo IIX) e Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgM (1:800, Thermo Fisher Scientific, reconhece os anticorpos do tipo I e tipo IIB) diluídos na solução de bloqueio durante 60 minutos em temperatura ambiente. Após os 60 minutos, as amostras foram lavadas com PBS 1x por 3 vezes durante 5 minutos e incubadas com WGA conjugado à sonda Alexa Fluor 647 (1:250, Thermo Fisher Scientific) diluído em PBS 1x durante 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram lavadas novamente com PBS 1x por 3 vezes durante 5 minutos e montadas utilizando o meio de montagem anti-fade Prolong Gold (Thermo Fisher Scientific).

3.7 Aquisição de imagens e análises da área de secção transversal e identificação dos tipos de fibras musculares

A obtenção das imagens das fibras musculares esqueléticas foi realizada no CAPI no ICB-UFMG. Foi utilizado o Microscópio Confocal Zeiss LSM 880, sob a objetiva de 10x e abertura numérica 0,3x. Para a excitação dos marcadores fluorescentes das amostras, utilizamos o laser Argon (488 nm), o laser HeNe (543 nm) e o laser HeNe2 (633 nm). Foram capturadas 1 a 3 imagens por secção transversal para cada músculo. As imagens foram analisadas por meio do software “open-source” CellProfiler. Para as análises das fibras musculares esqueléticas, utilizamos um pipeline descrito por Sanz et al. (2019) com pequenas modificações. Através do pipeline, foi possível analisar a área de secção transversal em micrômetros (µm²) e realizar a quantificação de cada isoforma da MyHC.

3.8 Análise estatística

Os dados e as suas representações gráficas foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism 8.0.2. Todos os dados passaram pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificar se apresentavam distribuição gaussiana. As diferenças estatísticas foram analisadas utilizando o teste t de Student e One-Way ANOVA, seguido do pós-teste adequado para cada análise experimental. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos do tratamento de 30 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol.

Dado que os animais miastênicos apresentam disfunções motoras e musculares (Prado et al., 2006), buscamos investigar se o tratamento de 30 do agonista β 2-adrenérgico formoterol promove alterações musculares e no comportamento motor dos camundongos VACHT-KD^{HOM}, um modelo murino que mimetiza uma SMC pré-sináptica. Assim, durante os 30 dias de tratamento, pesamos os animais para avaliar alterações da massa corporal e, após a eutanásia dos animais, realizamos a pesagem dos músculos e do coração para observar se o tratamento induziu alterações na massa destes tecidos. Ademais, realizamos os seguintes testes comportamentais motores: força de agarre, esteira giratória e grade invertida. Todos os testes foram realizados no período pré-tratamento e na fase final de tratamento anteriormente à eutanásia dos camundongos.

Inicialmente, observamos que o tratamento promoveu aumento de massa corporal nos animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} (**Figura 23A**), com os camundongos miastênicos apresentando um ganho de massa corporal de aproximadamente 5% em relação ao primeiro dia de tratamento (VACHT-KD^{HOM} SAL: -1.83 ± 0.75 ; VACHT-KD^{HOM} FOR: 5.19 ± 0.3 ; $p < 0.05$) (**Figura 23B**). Para o músculo EDL, não houve diferença na massa muscular entre os grupos experimentais (**Figuras 23C**). Contudo, para o músculo sóleo dos animais, observamos que os camundongos WT FOR apresentaram maior massa muscular em relação aos camundongos WT SAL (WT SAL: 7.09 ± 0.42 ; WT FOR: 1.79 ± 0.6 ; $p < 0.05$) (**Figuras 23D**). Dada a existência de adrenoceptores- β 2 no sistema cardiovascular (Lynch; Ryall, 2008), realizamos a pesagem do coração para assegurar que a administração do agonista β 2 não teve efeitos secundários adversos na massa cardíaca. Neste aspecto, não observamos diferenças na massa do coração entre os grupos experimentais (**Figura 23E**).

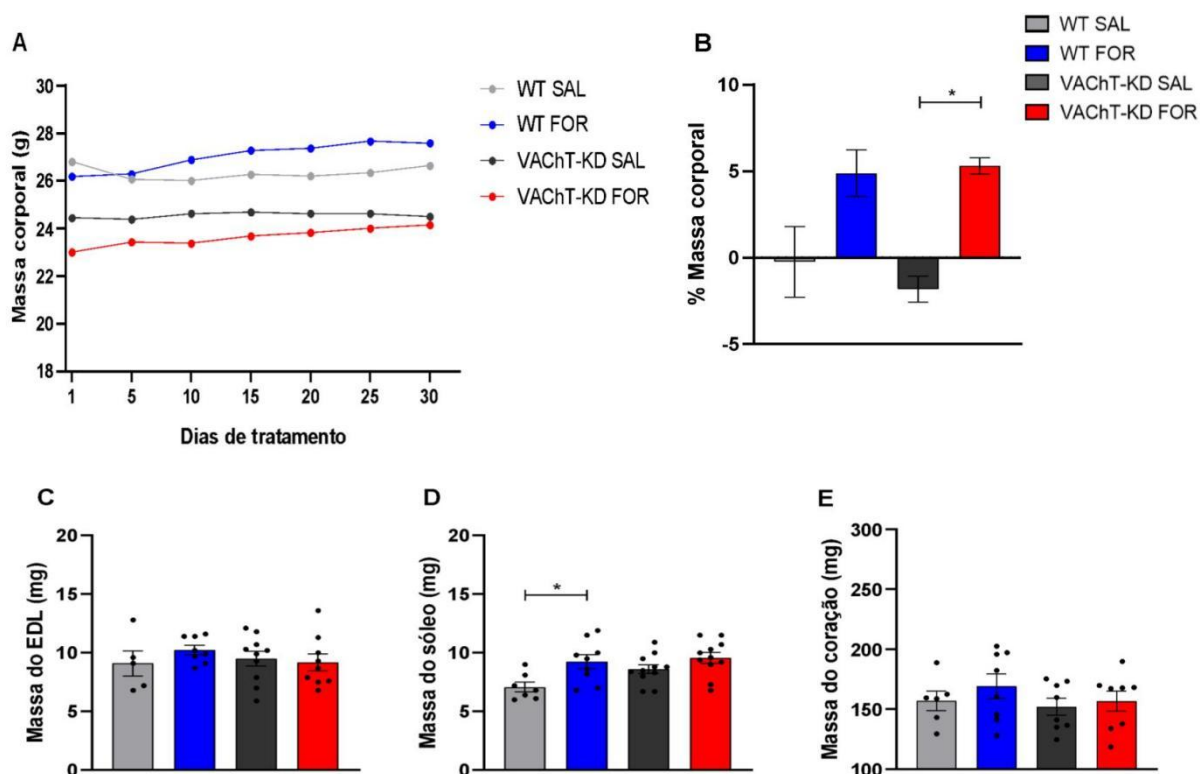


Figura 23. Tratamento de 30 dias com formoterol induz ganho de massa corporal dos camundongos tratados e maior massa muscular do sóleo dos camundongos WT FOR. **A-** Curva da massa corporal em gramas (g) durante os 30 dias de tratamento com o formoterol dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}. **B-** Diferença em porcentagem (%) da massa corporal em relação ao primeiro dia de tratamento. Os animais VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram um ganho de massa em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Wilcoxon, * $p < 0.05$). **C-** Massa do músculo EDL em miligramas (mg). Não foi observada diferença na massa muscular entre os grupos experimentais. **D-** Massa do músculo sóleo em miligramas (mg). Notamos que os animais WT FOR exibiram maior massa muscular em comparação ao seu grupo controle WT SAL (teste t de Student não pareado, * $p < 0.05$). **E-** Massa do coração em miligramas. Não houve diferença entre os grupos experimentais. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram utilizados 6 camundongos WT SAL, 7 camundongos WT FOR, 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR.

No teste comportamental força de agarre, os animais WT e VACHT-KD^{HOM} tratados com o agonista β_2 não apresentaram melhora da força muscular quando comparados aos seus respectivos grupos controle, WT SAL e VACHT-KD^{HOM} SAL, e em relação aos seus desempenhos no período pré-tratamento, tanto na força de agarre com as duas patas anteriores quanto na força de agarre com as quatro patas (**Figuras 24A e 24B**). No teste comportamental

esteira giratória, dois parâmetros foram analisados: latência para queda e o número total de quedas dos animais durante os 300 segundos de teste. O tratamento também não induziu alterações na performance dos animais nos dois parâmetros (**Figuras 24C e 24D**). Por fim, no teste grade invertida, os camundongos VACHT-KD^{HOM} apresentaram um desempenho pior em relação aos animais WT e o tratamento com o formoterol não promoveu alterações do comportamento motor dos animais miastênicos (**Figura 24E**).

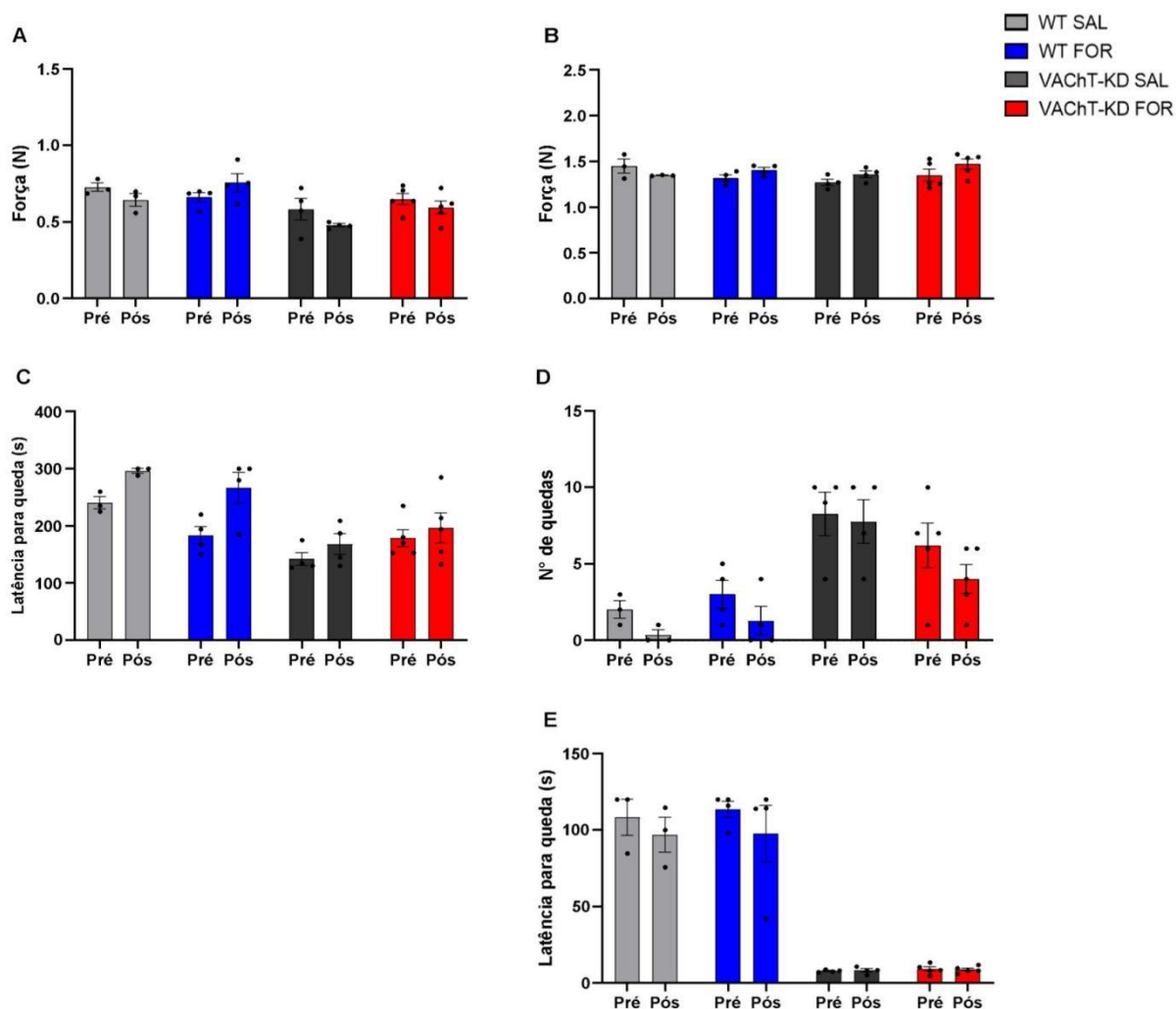


Figura 24. Camundongos VACHT-KD^{HOM} não apresentam melhora do comportamento motor com o tratamento de 30 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol. A- Mensuração da força de agarre das patas anteriores em Newton (N), na qual não observamos diferenças estatísticas entre os camundongos tratados e os seus respectivos grupos controle. **B-** Mensuração da força de agarre das quatro patas em Newton (N), em que também não observamos diferenças estatísticas entre os camundongos tratados e os seus respectivos grupos controle. **C e D-** Avaliação do tempo de latência para queda em segundos (s) e o número de quedas na esteira giratória, nas quais não foram observadas diferenças estatísticas

entre os camundongos tratados e os seus respectivos grupos controle. E- Avaliação do tempo de latência para queda em segundos (s) na grade invertida dos camundongos. O tratamento não alterou o desempenho dos animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR em comparação aos animais controle. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram utilizados 3 camundongos WT SAL, 4 camundongos WT FOR, 4 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 5 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR.

Diante dos resultados dos testes comportamentais, ao observarmos que não houve alterações na força muscular e atenuação das disfunções motoras dos animais VACHT-KD^{HOM}, optamos por estender o tratamento com o formoterol por 90 dias.

4.2 Tratamento de 90 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol.

Posto que não observamos diferenças no fenótipo motor dos camundongos VACHT-KD^{HOM} com o tratamento de 30 dias com o formoterol, optamos por realizar outra estratégia farmacológica utilizando o mesmo fármaco, mas com a duração de tratamento mais prolongada, totalizando 90 dias de tratamento. Estudos prévios demonstraram que o tratamento a longo prazo com simpatomiméticos melhora as disfunções musculares de pacientes humanos (Lashley et al., 2010; Lorenzoni et al., 2013) e os déficits motores e as alterações morfológicas das JNMs de animais com outros quadros de SMC (McMacken et al., 2019; Webster et al., 2020). Assim, realizamos o tratamento a longo prazo com o agonista β 2-adrenérgico formoterol para avaliar se a droga seria capaz de atenuar/reverter as alterações comportamentais e induzir alterações estruturais nas JNMs e fibras musculares esqueléticas em nosso modelo murino para SMC pré-sináptica, VACHT-KD^{HOM}.

4.2.1 Intervenção farmacológica com o agonista β 2-adrenérgico formoterol a longo prazo induz aumento de massa corporal e massa muscular do EDL e atenua o fenótipo motor dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

Neste esquema terapêutico, também realizamos a pesagem dos camundongos durante os dias de tratamento e a pesagem dos músculos e do coração após a eutanásia dos animais. Realizamos testes comportamentais para avaliar se o tratamento promoveria alterações motoras nos animais VACHT-KD^{HOM}, dessa forma, fizemos os testes de força de agarre,

esteira giratória e grade invertida. Todos os testes foram realizados no período pré-tratamento e na fase final de tratamento anteriormente à eutanásia dos animais.

O tratamento de 90 dias com o formoterol induziu o aumento significativo da massa corporal nos animais tratados em comparação aos animais controle, nos quais os camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram um ganho de massa corporal acima de 20% em relação aos seus respectivos grupos controle (WT SAL: 1.0 ± 0.29 ; WT FOR: 13.01 ± 2.36 ; VACHT-KD^{HOM} SAL: 5.82 ± 1.71 ; VACHT-KD^{HOM} FOR: 15.43 ± 3.19 ; $p < 0.05$) (**Figuras 25A e 25B**). Os animais VACHT-KD^{HOM} FOR exibiram maior massa muscular do EDL em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL: 10.87 ± 2.21 ; VACHT-KD^{HOM} FOR: 10.70 ± 1.1 ; $p < 0.05$) (**Figura 25C**), e não houve diferenças de massa tanto do sóleo quanto do coração entre os grupos experimentais (**Figuras 25D e 25E**).

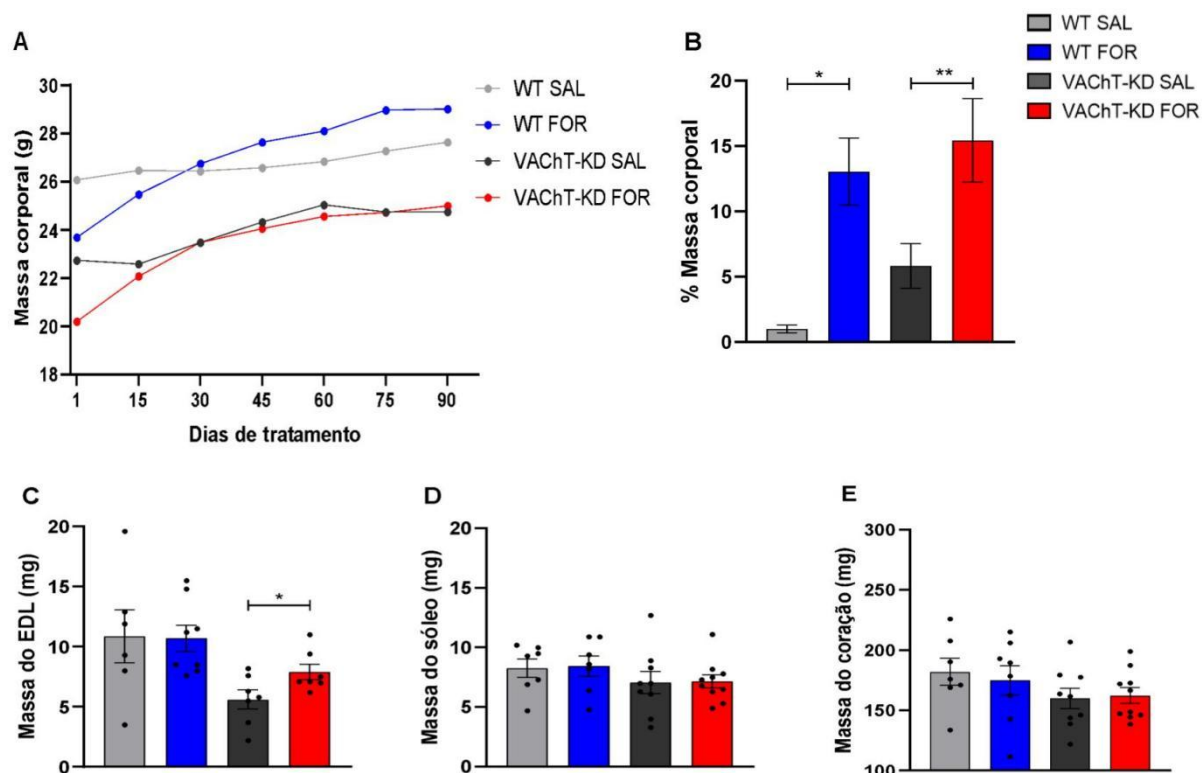


Figura 25. Tratamento de 90 dias com formoterol promove ganho de massa corporal dos camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR e induz maior massa muscular do EDL dos animais miastênicos. A- Curva da massa corporal em gramas (g) durante os 90 dias de tratamento com o formoterol dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}. **B-** Diferença em porcentagem (%) da massa corporal em relação ao primeiro dia de tratamento. Os animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram um ganho de massa em relação aos seus respectivos grupos controle, WT SAL e VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Wilcoxon, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). **C-** Massa do músculo EDL em miligramas (mg). Camundongos VACHT-KD^{HOM}

FOR exibiram maior massa muscular em relação aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (teste t de Student não pareado, * $p < 0.05$). **D-** Massa do músculo sóleo em miligramas (mg). Não foi observada diferença da massa muscular entre os grupos experimentais. **E-** Massa do coração em miligramas. Não houve diferença entre os grupos experimentais. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram utilizados 7 camundongos WT SAL, 7 camundongos WT FOR, 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR.

Em relação aos testes de comportamento motor, não foi observada alteração na força muscular dos animais tratados em relação aos seus respectivos grupos controle no teste de força de agarre das patas anteriores (**Figura 26A**). Todavia, na força de agarre das quatro patas, os animais WT tratados apresentaram maior força quando comparados aos animais selvagens veículos (WT SAL^{PRÉ}: 1.44 ± 0.08 e WT FOR^{PÓS}: 1.73 ± 0.06 ; $p < 0.05$). Os camundongos VACHT-KD^{HOM} tratados com o formoterol também apresentaram aumento na força de agarre das quatro patas em relação à sua performance no teste realizado no pré-tratamento (VACHT-KD^{HOM} FOR^{PRÉ}: 1.15 ± 0.08 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{PÓS}: 1.45 ± 0.07 ; $p < 0.05$) (**Figura 26B**). Na esteira giratória, após o tratamento, os animais VACHT-KD^{HOM} FOR exibiram melhor desempenho no tempo de latência em comparação ao desempenho dos animais VACHT-KD^{HOM} não tratados no pré e pós-tratamento (VACHT-KD^{HOM} SAL^{PRÉ}: 137.9 ± 19.43 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{PÓS}: 140.7 ± 16.63 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{PÓS}: 234.0 ± 17.57 ; $p < 0.05$) (**Figura 26C**), e os animais VACHT-KD^{HOM} FOR também apresentaram redução no número de quedas em relação à performance dos animais VACHT-KD^{HOM} SAL no pós-tratamento (VACHT-KD^{HOM} SAL^{PÓS}: 8.36 ± 1.10 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{PÓS}: 3.57 ± 0.99 ; $p < 0.05$) (**Figuras 26C e 26D**). Por outro lado, no teste de grade invertida, o tratamento com o agonista $\beta 2$ -adrenérgico formoterol não foi capaz de alterar o desempenho dos animais VACHT-KD^{HOM} em relação aos animais WT (**Figura 26E**).

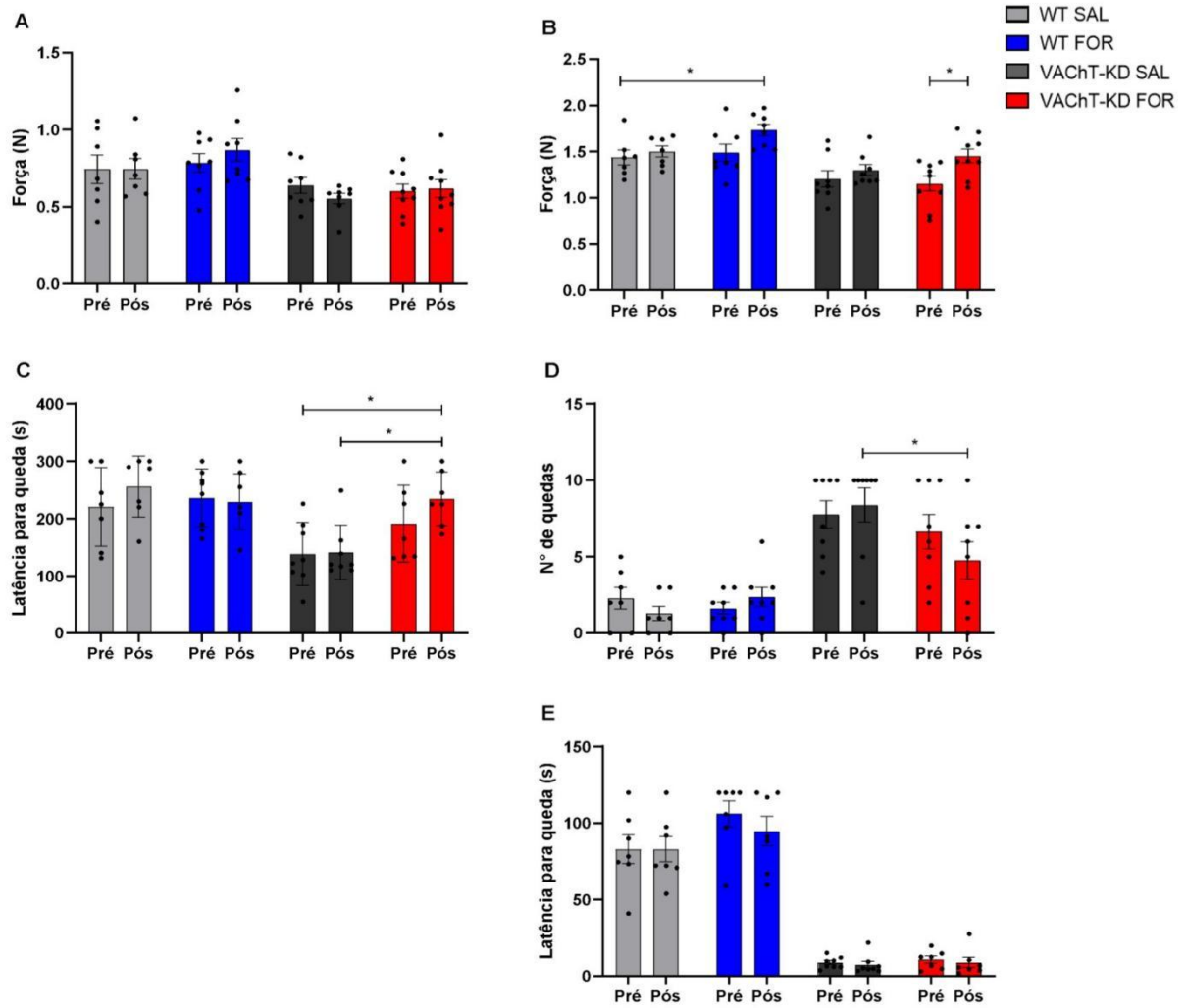


Figura 26. Camundongos VACHT-KD^{HOM} apresentam melhora no desempenho motor com o tratamento de 90 dias utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol. **A-** Mensuração da força de agarre das patas anteriores em Newton (N), na qual não observamos diferenças estatísticas entre os camundongos tratados e os seus respectivos grupos controle. **B-** Mensuração da força de agarre das quatro patas em Newton (N). Os animais WT FOR apresentaram maior força de agarre no pós-tratamento em relação aos animais WT SAL no pré-tratamento e os animais VACHT-KD^{HOM} FOR melhoraram sua força de agarre com o tratamento em relação ao seu desempenho no pré-tratamento (Ordinary one-way ANOVA, $p < 0.05$). **C-** Avaliação do tempo de latência para queda em segundos (s) na esteira giratória, na qual podemos observar que os animais VACHT-KD^{HOM} FOR prolongaram o tempo de latência no pós-tratamento em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL no pré e pós-tratamento (Kruskal-Wallis test, $*p < 0.05$). **D-** Avaliação do número de quedas totais durante todo o período de teste esteira giratória. Aqui, os camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR reduziram o número de quedas com o tratamento em relação aos animais VACHT-KD^{HOM}

SAL pós-tratamento (Kruskal-Wallis test, $*p<0.05$). E- Avaliação do tempo de latência para queda em segundos (s) na grade invertida dos camundongos. O tratamento não alterou o desempenho dos animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR em relação aos animais controle. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram utilizados 7 camundongos WT SAL, 7 camundongos WT FOR, 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 8 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR.

Estes resultados indicam que o tratamento de 90 dias com o formoterol induz o ganho de massa corporal e do músculo glicolítico EDL, promove o aumento da força muscular e atenua os déficits de coordenação e resistência motora dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

4.2.2 Tratamento de 90 dias com o formoterol aumenta a área sináptica das JNMs no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

Visto que houve alterações significativas na massa muscular e no comportamento motor dos camundongos VACHT-KD^{HOM} tratados com o agonista β 2-adrenérgico formoterol, realizamos análises morfológicas para investigar se as mudanças fenotípicas observadas iriam resultar em alterações estruturais na sinapse neuromuscular. Sabe-se que a inervação simpática é fundamental no aspecto funcional das JNMs, nos quais os receptores adrenérgicos estão associados à modulação da exocitose de ACh e à estabilização de nAChRs na placa motora (Rodrigues et al., 2019; Rudolf; Kettelhut; Navegantes, 2024). Khan et al. (2016) demonstraram a proximidade espacial entre receptores β 2-adrenérgicos e JNMs em fibras musculares esqueléticas. Com isso, esses estudos estabeleceram a relação da inervação simpática com a musculatura esquelética e demonstraram que agonistas de adrenoreceptores- β 2 podem ser utilizados como uma estratégia terapêutica para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos que acometem as JNMs.

Portanto, visando observar se o tratamento de 90 dias com o formoterol promove alterações na estrutura morfológica das JNMs nos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}, realizamos marcações utilizando os anticorpos anti-sinaptotagmina e α -bungarotoxina que marcam proteínas localizadas nas terminações pré e pós-sinápticas, respectivamente, para observar o tamanho da área das terminações e, também, a partir da sobreposição da marcação dos anticorpos, investigar o grau de colocalização da terminação axonal com a placa motora.

Ao realizarmos a quantificação da área da terminação pré-sináptica do músculo EDL, vimos que os camundongos tratados com o simpatomimético formoterol, WT FOR e VACHT-

KD^{HOM} FOR, apresentaram uma maior área da porção final do nervo motor quando comparados aos seus respectivos grupos controle, WT SAL e VACHT-KD^{HOM} SAL (WT SAL: 495.9 ± 17.92 , WT FOR: 546.7 ± 16.19 , VACHT-KD^{HOM} SAL: 481.1 ± 15.56 e VACHT-KD^{HOM} FOR: 534.7 ± 18.40 ; $p < 0.05$) (**Figuras 27A e 27B**). Houve também um aumento da área da placa motora dos camundongos tratados em relação aos camundongos veículos (WT SAL: 529.1 ± 19.09 , WT FOR: 583.5 ± 16.19 , VACHT-KD^{HOM} SAL: 526.6 ± 16.71 e VACHT-KD^{HOM} FOR: 576.6 ± 18.07 ; $p < 0.05$) (**Figuras 27A e 27C**). Na análise do índice de colocalização das terminações pré e pós-sinápticas, observamos que a administração de 90 dias com o agonista $\beta 2$ -adrenérgico formoterol foi capaz de prevenir a perda de colocalização sináptica nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, uma vez que os animais miastênicos veículos exibiram prejuízo do grau de colocalização (VACHT-KD^{HOM} SAL: 90.87 ± 0.61 e VACHT-KD^{HOM} FOR: 92.74 ± 0.61 ; $p < 0.05$) (**Figura 27D**).

No músculo sóleo, podemos observar que o tratamento com o fármaco a longo prazo não induziu alterações no tamanho da terminação axonal, mas promoveu um aumento da área pós-sináptica dos animais VACHT-KD^{HOM} FOR em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} não tratados (VACHT-KD^{HOM} SAL: 526.6 ± 16.71 e VACHT-KD^{HOM} FOR: 576.6 ± 18.07 ; $p < 0.05$) (**Figuras 28A, 28B, 28C**). Para o índice de colocalização das terminações, o formoterol não promoveu nenhuma alteração na sobreposição da terminação pré-sináptica com a placa motora dos animais WT e VACHT-KD^{HOM} (**Figura 28D**).

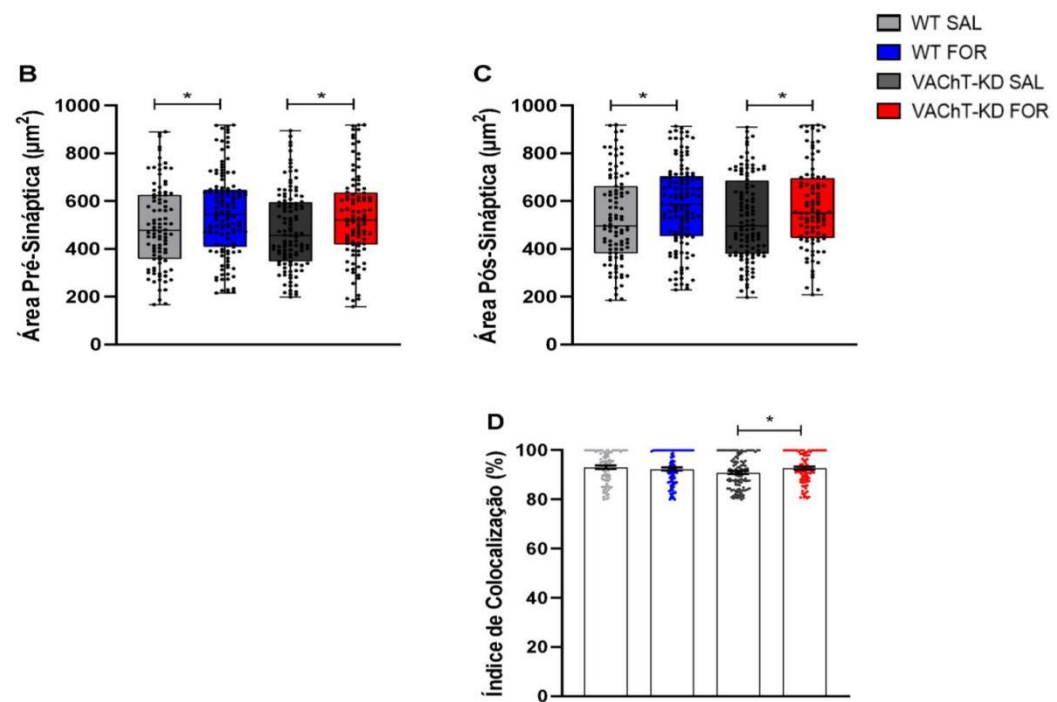
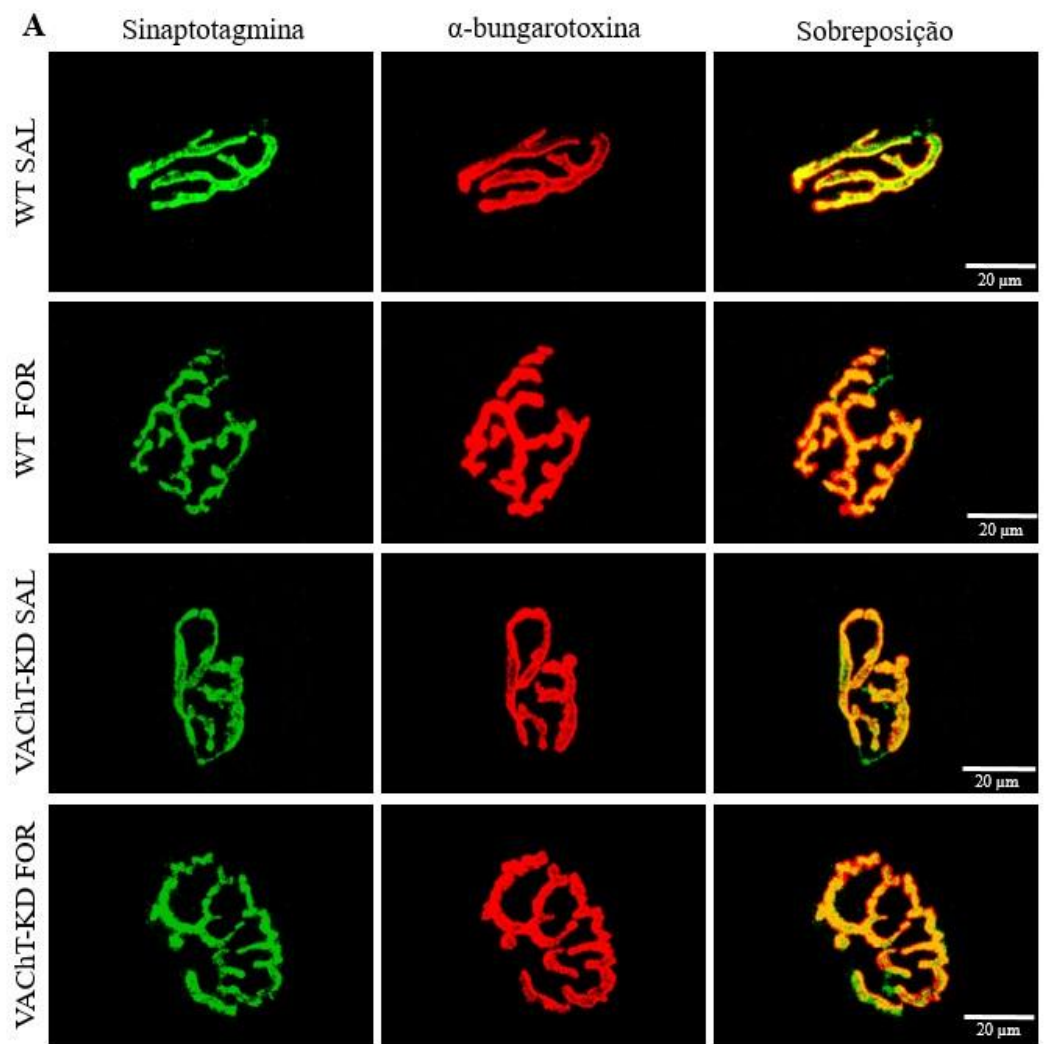


Figura 27. Agonista β 2-adrenérgico formoterol promove aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas e não altera o índice de colocalização no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. **A-** Imagens representativas em microscopia de fluorescência das JNMs do músculo EDL marcadas com o anticorpo anti-sinaptotagmina (terminação pré-sináptica), com o anticorpo α -bungarotoxina (terminação pós-sináptica) e a sobreposição de ambas as terminações. À esquerda, escrito verticalmente, estão os grupos experimentais utilizados neste estudo. **B-** Gráfico das análises quantitativas da área da terminação pré-sináptica em micrômetros (μm^2) do músculo EDL. Os camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram maior área da terminação axonal em relação aos seus respectivos grupos controle (teste de Mann-Whitney, $*p<0.05$). **C-** Gráfico das análises quantitativas da área da terminação pós-sináptica em micrômetros (μm^2) do músculo EDL. Os camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram aumento da área da placa motora em relação aos animais WT SAL VACHT-KD^{HOM} SAL, respectivamente (teste de Mann-Whitney, $*p<0.05$). **D-** Quantificação do índice de colocalização das terminações em porcentagem (%) do músculo EDL. Neste parâmetro analisado, os animais VACHT-KD^{HOM} FOR exibiram maior grau de colocalização em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, $*p<0.05$). Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas JNMs de 5 a 7 animais por grupo experimental. Barra de escala de 20 μm .

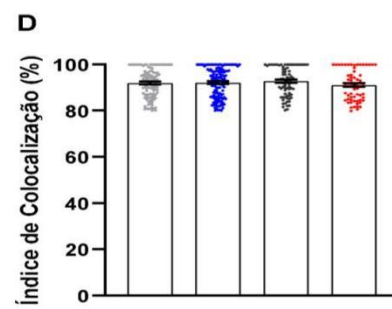
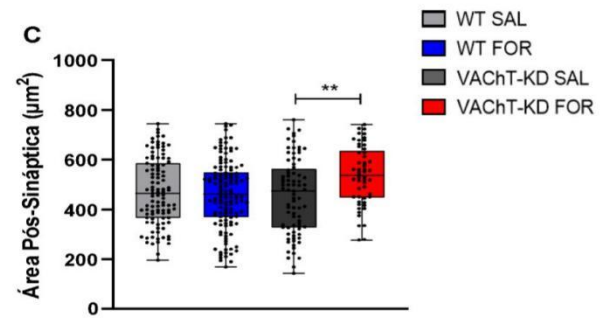
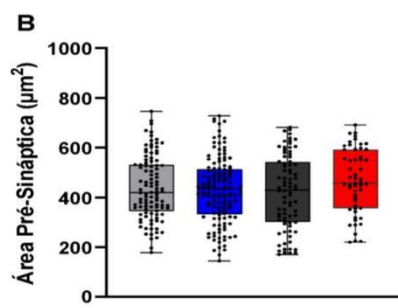
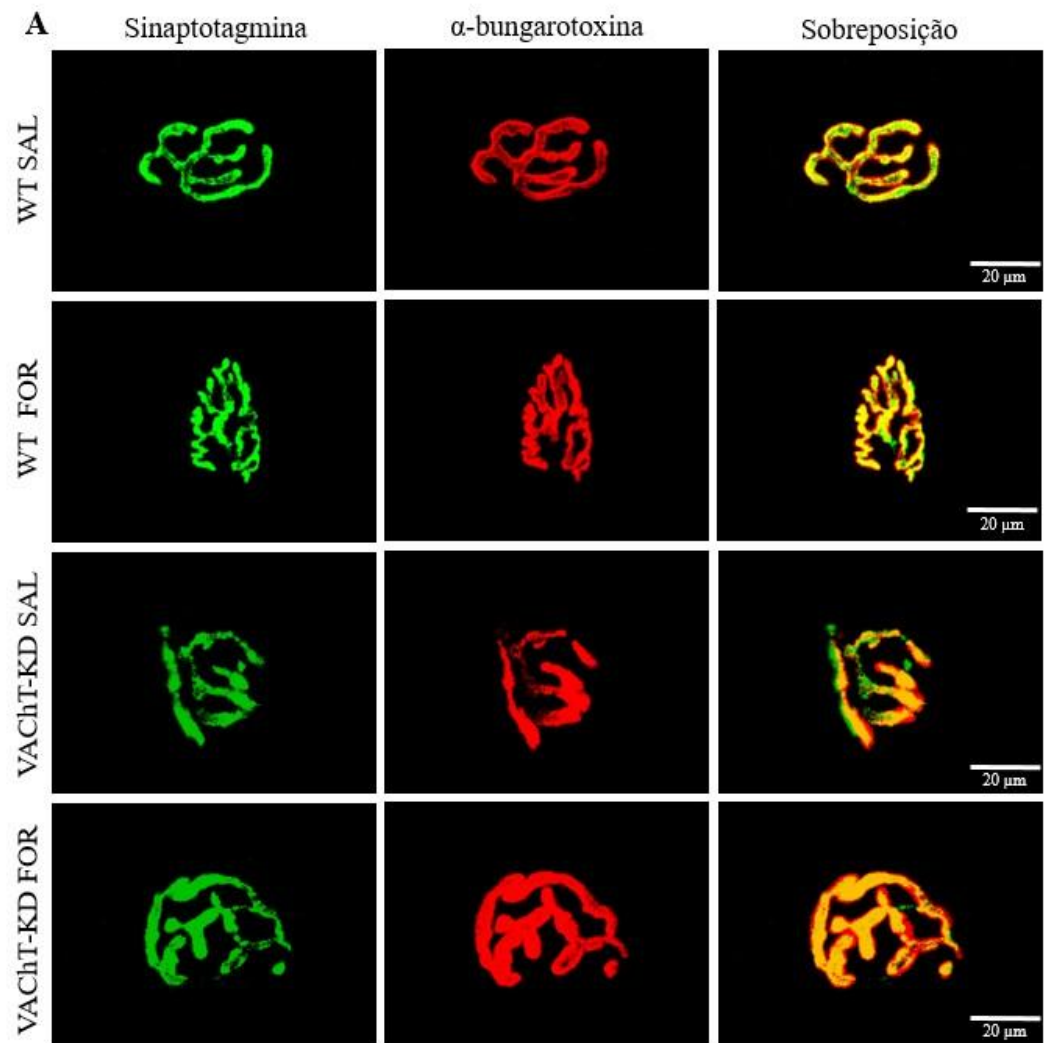


Figura 28. Tratamento com o simpatomimético formoterol induz aumento da área da terminação pós-sináptica no músculo sóleo de camundongos VACHT-KD^{HOM}. **A-** Imagens representativas em microscopia de fluorescência das JNMs do músculo sóleo marcadas com o anticorpo anti-sinaptotagmina (terminação pré-sináptica), com o anticorpo α -bungarotoxina (terminação pós-sináptica) e a sobreposição de ambas as terminações. À esquerda, escrito verticalmente, estão os grupos experimentais utilizados neste estudo. **B-** Gráfico das análises quantitativas da área da terminação pré-sináptica em micrômetros (μm^2) do músculo sóleo. Não observamos diferenças estatísticas na área da terminação pré-sináptica entre os animais tratados e animais salinas. **C-** Gráfico das análises quantitativas da área da terminação pós-sináptica em micrômetros (μm^2) do músculo sóleo. Os camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram aumento da área da placa motora em relação ao seu grupo controle VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, $**p < 0.005$). **D-** Quantificação do índice de colocalização das terminações em porcentagem (%) do músculo sóleo, no qual não houve diferenças entre os grupos experimentais. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas JNMs de 5 a 7 animais por grupo experimental. Barra de escala de 20 μm .

Dessa forma, estes dados indicam que a intervenção farmacológica com o agonista β 2-adrenérgico formoterol por 90 dias induziu o aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas das JNMs do músculo EDL de camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} e não altera a colocalização das terminações no mesmo músculo dos animais miastênicos tratados. No músculo sóleo, o tratamento promoveu apenas aumento da área da placa motora dos camundongos VACHT-KD^{HOM} em relação ao seu grupo veículo, VACHT-KD^{HOM} SAL. Assim, os resultados demonstram que o tratamento de 90 dias com o formoterol causa um efeito estrutural das JNMs nos animais VACHT-KD^{HOM}, principalmente no músculo glicolítico EDL.

4.2.3 Tratamento de 90 dias com o simpatomimético formoterol induz hipertrofia de fibra glicolítica e alteração do padrão de expressão das isoformas da MyHC no músculo EDL dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}.

Dado que a administração de agonistas β 2-adrenérgicos induz a hipertrofia e o reparo muscular (Beitzel et al., 2004; Lynch; Ryall, 2008), buscamos investigar os efeitos do simpatomimético na musculatura esquelética nos animais VACHT-KD^{HOM}. Previamente, Magalhães-Gomes et al. (2018) observaram nos camundongos VACHT-KD^{HOM} que as fibras musculares do EDL apresentavam-se atrofiadas, com redução da área de secção transversal

das fibras tipo IIX e IIB, e alterações no padrão de expressão da MyHC, no qual houve a redução da expressão de fibras tipo IIB e um aumento da expressão de fibras tipo IIX. Essa troca de expressão destas fibras foi associada a um mecanismo de mudança no perfil de fibras glicolíticas para oxidativas.

Visto que o tratamento de 90 dias promoveu aumento da massa muscular e alterações estruturais nas JNMs do músculo EDL, nosso próximo passo foi avaliar se o fármaco reverteria as alterações musculares observadas nos animais VACHT-KD^{HOM}. Para isso, mensuramos a área de secção transversal geral das fibras musculares de acordo com a isoforma da MyHC e, também, quantificamos a expressão de cada isoforma da MyHC no EDL.

Nas análises de área de secção transversal das fibras musculares do músculo EDL, constatamos o aumento da área de secção transversal dos camundongos WT FOR em comparação ao seu grupo controle WT SAL (WT SAL: 687.4 ± 9.38 , WT FOR: 847.4 ± 9.68 ; $p < 0.05$) (**Figura 29C**). Já nos animais VACHT-KD^{HOM} FOR, não observamos diferenças na área de secção transversal das fibras musculares em comparação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (**Figura 29C**). Nas análises da área de secção transversal para cada isoforma da MyHC, observamos que a área das fibras tipo I e IIX estavam reduzidas, enquanto a área da fibra tipo IIB estava aumentada nos camundongos WT tratados com o simpatomimético em relação aos animais WT SAL (WT SAL^{TIPO I}: 376.5 ± 19.61 , WT FOR^{TIPO I}: 202.7 ± 9.04 , WT SAL^{TIPO IIX}: 506.1 ± 9.86 , WT FOR^{TIPO IIX}: 359.5 ± 6.49 , WT SAL^{TIPO IIB}: 989.5 ± 14.0 , WT FOR^{TIPO IIB}: 1087.0 ± 10.30 ; $p < 0.05$) (**Figura 29D**). Nos camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR, observamos a atrofia da fibra tipo IIX e a hipertrofia tipo IIB em relação aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIX}: 349.0 ± 7.39 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIX}: 308.3 ± 5.77 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIB}: 849.0 ± 14.03 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIB}: 1008.0 ± 18.18) (**Figura 29E**). Em seguida, ao analisarmos a frequência de expressão das isoformas da MyHC, notamos a redução de expressão das fibras tipo I, IIA e IIX e o aumento da expressão da fibra glicolítica tipo IIB nos animais WT FOR em relação ao seu grupo controle WT SAL (WT SAL^{TIPO I}: 1.73 ± 0.61 , WT FOR^{TIPO I}: 0.34 ± 0.34 , WT SAL^{TIPO IIA}: 18.96 ± 2.88 , WT FOR^{TIPO IIA}: 8.10 ± 1.69 , WT SAL^{TIPO IIX}: 34.37 ± 2.70 , WT FOR^{TIPO IIX}: 18.76 ± 0.91 , WT SAL^{TIPO IIB}: 45.05 ± 3.33 , WT FOR^{TIPO IIB}: 67.64 ± 4.45 ; $p < 0.05$) (**Figura 29F**). Nos animais VACHT-KD^{HOM} tratados com o agonista β 2-adrenérgico formoterol, houve a redução da expressão da fibra tipo IIA e aumento parcial das fibras tipo IIX e IIB em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIA}: 18.09 ± 4.60 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIA}: 8.08 ± 1.45 ; $p < 0.05$) (**Figura 29G**).

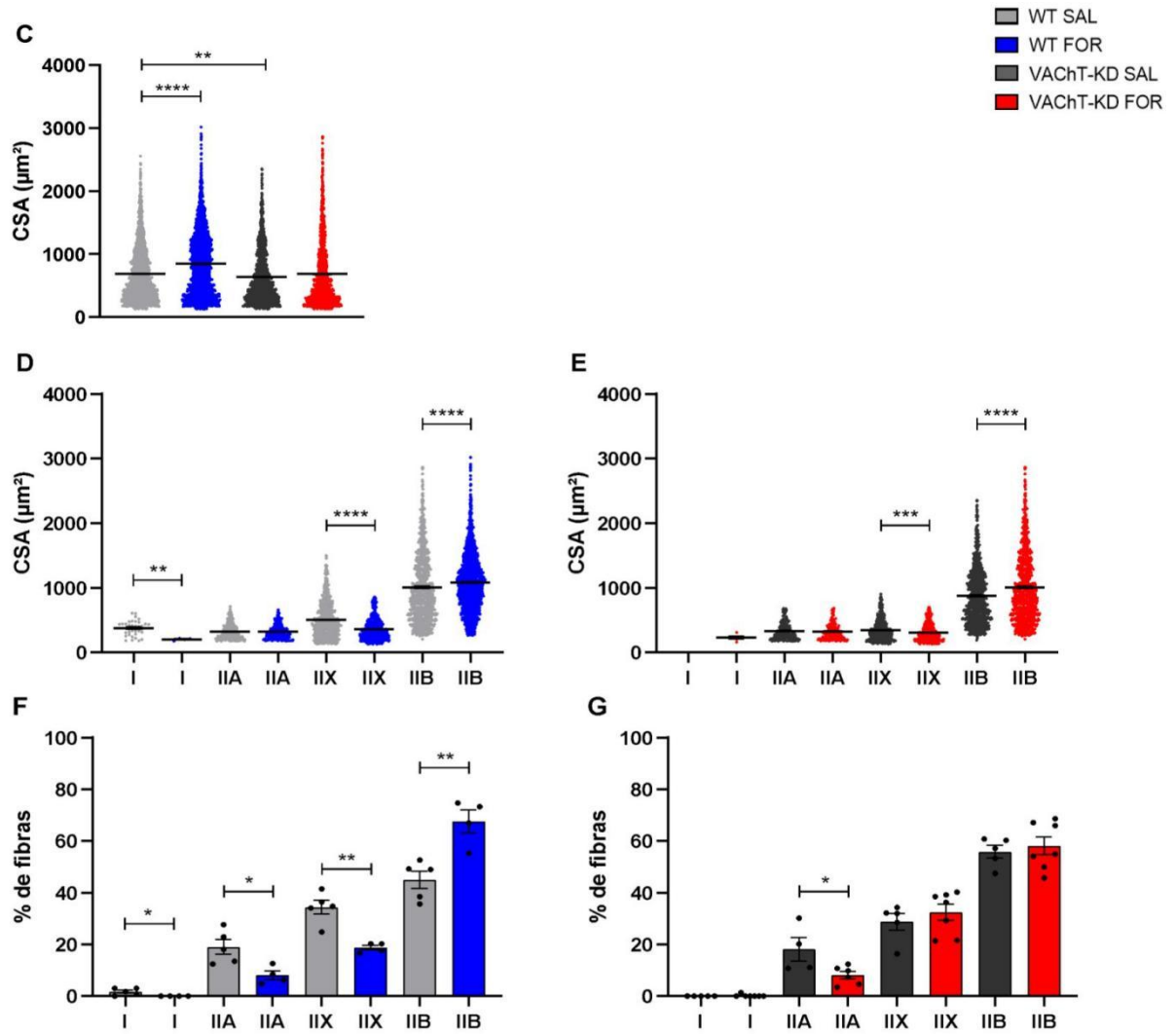
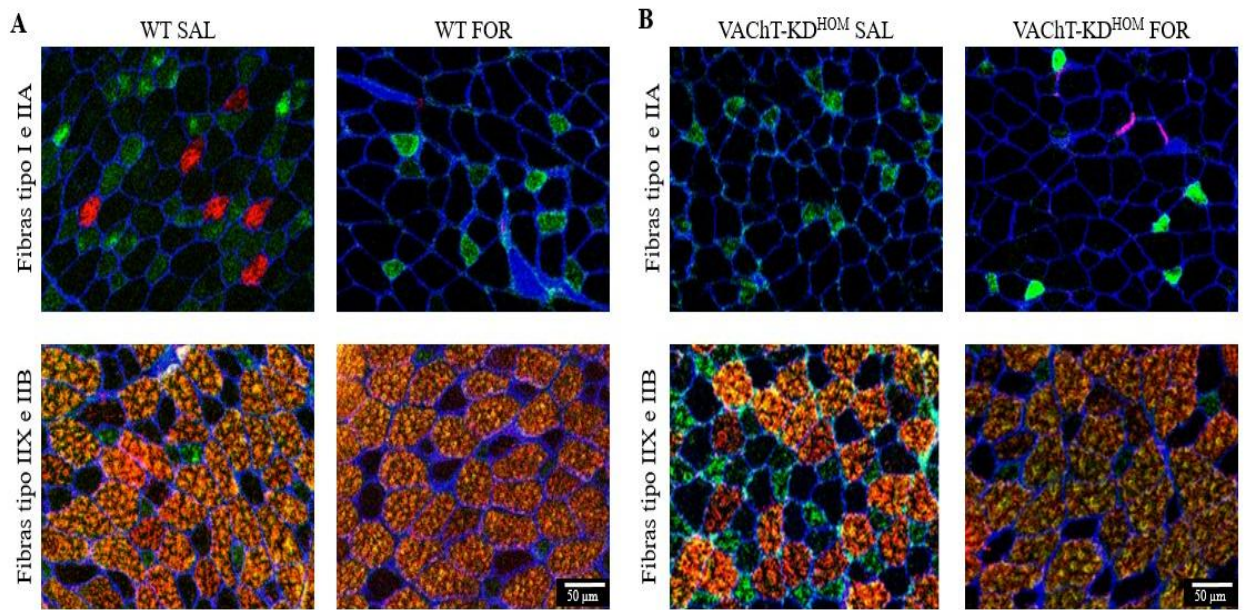


Figura 29. Formoterol induz hipertrofia de fibra glicolítica e alteração do padrão de expressão das isoformas da MyHC no músculo EDL dos animais WT e VACHT-KD^{HOM}.

A e B- Imagens representativas em microscopia de fluorescência das fibras musculares esqueléticas do músculo EDL dos grupos experimentais utilizados. No painel superior, é possível identificar as fibras tipo I e IIA marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcação em vermelho correspondem às fibras tipo I e marcações em verde correspondem às fibras tipo IIA. Marcação em negativo podem corresponder às fibras tipo IIX ou IIB. No painel inferior, é possível identificar as fibras tipo IIX e IIB marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcação em negativo correspondem às fibras tipo IIX e marcações em laranja correspondem às fibras tipo IIB. Marcação em verde podem corresponder às fibras tipo I ou IIA. **C-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) do músculo EDL. Os camundongos WT FOR apresentaram hipertrofia da área muscular em relação com o seu grupo controle WT SAL, e os animais VACHT-KD^{HOM} SAL apresentam atrofia muscular em relação aos animais WT SAL (teste de Mann-Whitney, $*p < 0.0001$; $**p < 0.005$). **D-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo EDL dos camundongos WT. Podemos observar que os animais WT tratados tiveram atrofia das fibras tipo I e IIX, mas hipertrofia da fibra tipo IIB em relação aos animais WT SAL (teste de Mann-Whitney, $**p < 0.005$; $****p < 0.0001$). **E-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Os animais VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram atrofia da fibra tipo IIX e hipertrofia da fibra tipo IIB em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste t de Student não pareado, $***p < 0.0005$; $****p < 0.0001$). **F-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo EDL dos camundongos WT. Os camundongos selvagens tratados apresentaram expressão reduzida das fibras tipo I, IIA e IIX, porém, expressão aumentada da fibra de contração rápida tipo IIB em relação aos animais WT SAL (teste t de Student não pareado, $*p < 0.05$; $**p < 0.005$). **G-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Os camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR tiveram redução da expressão da fibra tipo IIA em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste t de Student não pareado, $**p < 0.005$). Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas fibras musculares esqueléticas de 5 camundongos WT SAL, 5 camundongos WT FOR, 5 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 7 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR. Barra de escala de 50 μm .

Juntos, estes dados sugerem que o tratamento de 90 dias com o formoterol nos camundongos WT induz hipertrofia muscular do EDL e hipertrofia da fibra do tipo IIB no mesmo músculo, além da mudança de perfil metabólico oxidativo para glicolítico em consequência da redução de expressão das fibras tipo I, IIA e IIX associado ao aumento da expressão da fibra glicolítica tipo IIB. Nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, o tratamento com o simpatomimético formoterol reverteu a atrofia observada no músculo EDL dos animais miastênicos. Houve a atrofia da fibra tipo IIX contrabalançada pela hipertrofia da fibra tipo IIB. Verificou-se também a redução da frequência da fibra oxidativa tipo IIA, e não observamos um aumento significativo na expressão das fibras tipo IIX e IIB. Contudo, apesar de não observarmos aumento da expressão de fibras glicolíticas, acreditamos que o efeito compensatório da redução da fibra tipo IIA foi distribuído entre as fibras glicolíticas do tipo IIX e IIB. Sendo assim, o formoterol é capaz de promover alterações estruturais das fibras musculares esqueléticas e reverter a condição atrofica no músculo EDL dos animais VACHT-KD^{HOM}.

4.2.4 Tratamento de 90 dias com o formoterol tem efeito hipertrófico e glicolítico no músculo sóleo de camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}.

Músculos oxidativos apresentam maior densidade de receptores β 2-adrenérgicos, porém, são menos responsivos à administração de agonistas β 2-adrenérgicos em comparação com músculos glicolíticos (Martin; Murphee; Saffitz, 1989; Ryall et al., 2002). Ainda assim, o uso a longo prazo de agonistas β 2 induz efeitos hipertróficos em músculos com perfil oxidativo (Kim; Sainz, 1992; Cairns; Dulhunty, 1993). Magalhães-Gomes et al. (2018) observaram que por um mecanismo de compensação à atrofia muscular do gastrocnêmio, as fibras musculares do músculo sóleo são hipertrofiadas nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, nos quais há também a hipertrofia das fibras tipo I e IIA e, ainda, há uma maior proporção de fibras oxidativas nos animais miastênicos em relação aos animais selvagens. Posto que observamos que o tratamento a longo prazo induziu o aumento da área da placa motora no sóleo, buscamos avaliar se o formoterol teria efeitos anabólicos e induziria alterações tanto na área de secção transversal das fibras musculares quanto no padrão de expressão das isoformas da MyHC no músculo sóleo dos animais VACHT-KD^{HOM}.

Da mesma forma que no músculo EDL, observamos uma maior área de secção transversal no sóleo dos animais WT tratados em relação aos animais WT SAL (WT SAL: 717.5 ± 6.22 , WT FOR: 966.1 ± 7.76 ; $p < 0.05$) (**Figura 30C**). Assim como no estudo de

Magalhães-Gomes et al. (2018), notamos que a área muscular dos animais miastênicos veículos estava hipertrofiada em comparação aos camundongos WT não tratados (WT SAL: 717.5 ± 6.22 , VACHT-KD^{HOM} SAL: 898.3 ± 7.80) (**Figura 30C**). Ainda, observamos que a área do músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR apresentou atrofia em relação ao seu grupo controle VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL: 898.3 ± 7.80 , VACHT-KD^{HOM} FOR: 878.6 ± 7.30) (**Figura 30C**). Em seguida, ao mensurar a área de secção transversal de cada isoforma da MyHC, constatamos a hipertrofia de todos os tipos de fibras musculares dos camundongos WT FOR em relação aos animais WT SAL (WT SAL^{TIPO I}: 714.7 ± 8.81 , WT FOR^{TIPO I}: 998.3 ± 12.96 , WT SAL^{TIPO IIA}: 705.7 ± 9.0 , WT FOR^{TIPO IIA}: 838.8 ± 8.87 , WT SAL^{TIPO IIX}: 829.7 ± 34.22 , WT FOR^{TIPO IIX}: 1067.0 ± 19.44 , WT SAL^{TIPO IIB}: 775.2 ± 42.97 , WT FOR^{TIPO IIB}: 1369.0 ± 48.33 ; $p < 0.05$) (**Figura 30D**). Já nos animais miastênicos tratados com o formoterol, notamos a atrofia da fibra tipo IIA e a hipertrofia das fibras tipo IIB em comparação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIA}: 843.8 ± 11.0 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIA}: 749.5 ± 10.51 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIB}: 0 ± 0 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIB}: 1069.0 ± 55.85 ; $p < 0.05$) (**Figura 30E**). Nas análises de frequência do padrão de expressão das isoformas da MyHC, observamos que nos camundongos WT FOR, quando comparados aos camundongos WT SAL, houve o aumento da proporção das fibras glicolíticas do tipo IIX e IIB (WT SAL^{TIPO IIX}: 5.82 ± 1.77 , WT FOR^{TIPO IIX}: 14.44 ± 1.25 , WT SAL^{TIPO IIB}: 0.16 ± 0.16 , WT FOR^{TIPO IIB}: 4.34 ± 2.26 ; $p < 0.05$) (**Figura 30F**). Nos animais VACHT-KD^{HOM}, o tratamento com o agonista β 2-adrenérgico reduziu a frequência da fibra tipo IIA e, semelhante aos animais WT FOR, induziu o aumento das fibras glicolíticas tipo IIX e IIB (VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIA}: 40.76 ± 33.16 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIA}: 30.15 ± 1.07 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIX}: 2.32 ± 1.35 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIX}: 14.73 ± 9.43 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIB}: 0 ± 0 , VACHT-KD^{HOM} FOR^{TIPO IIB}: 4.02 ± 1.53 ; $p < 0.05$) (**Figura 30G**).

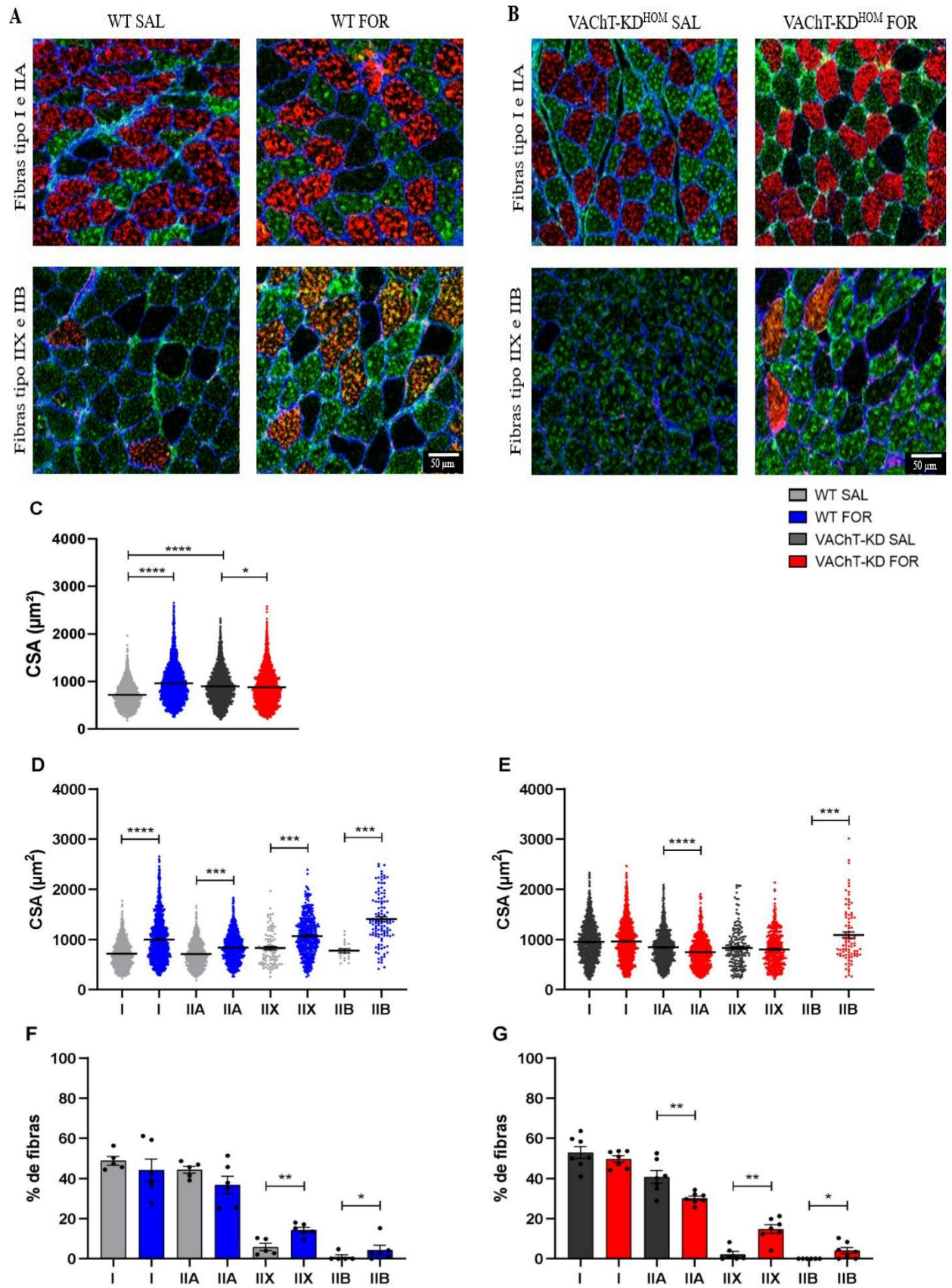


Figura 30. Formoterol tem efeito hipertrófico e glicolítico no músculo sóleo de camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} no músculo sóleo. **A e B-** Imagens representativas em microscopia de fluorescência das fibras musculares esqueléticas do músculo sóleo dos grupos experimentais utilizados. No painel superior, é possível identificar as fibras tipo I e IIA marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcações em vermelho correspondem às fibras tipo I e marcações em verde correspondem às fibras tipo IIA. Marcações em negativo podem corresponder às fibras tipo IIX ou IIB. No painel inferior, é possível identificar as fibras tipo IIX e IIB marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcações em negativo correspondem às fibras tipo IIX e marcações em laranja correspondem às fibras tipo IIB. Marcações em verde podem corresponder às fibras tipo I ou IIA. **C-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) do músculo sóleo. Os camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} SAL apresentam hipertrofia da área muscular em comparação aos camundongos WT SAL (teste de Mann-Whitney, **** $p < 0.0001$). Já os animais VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram atrofia da área muscular em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, * $p < 0.05$). **D-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo sóleo dos camundongos WT. Os animais WT tratados apresentaram hipertrofia de todos os tipos de fibras (teste de Mann-Whitney, *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$). **E-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Os animais VACHT-KD^{HOM} FOR tiveram atrofia da fibra tipo IIA e hipertrofia da fibra glicolítica IIB em relação aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, *** $p < 0.0005$; **** $p < 0.0001$). **F-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo sóleo dos camundongos WT. Os camundongos WT FOR tiveram aumento de expressão das fibras glicolíticas tipo IIX e IIB (teste t de Student não pareado, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). **G-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Os camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR apresentaram redução da expressão da fibra tipo IIA, mas aumento da expressão das fibras de contração rápida tipo IIX e IIB em comparação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste t de Student não pareado, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas fibras musculares esqueléticas de 5 camundongos WT SAL, 5 camundongos WT FOR, 5 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 7 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR. Barra de escala de 50 μm .

As análises dos dados do tratamento com o agonista β 2-adrenérgico formoterol no músculo sóleo mostram que a administração a longo prazo do fármaco induziu efeitos hipertróficos nas fibras musculares esqueléticas e conversão de fibras oxidativas para glicolíticas nos camundongos selvagens. Nos animais VACHT-KD^{HOM}, o tratamento de 90 dias com o formoterol promoveu atrofia no tamanho da área muscular do sóleo e atrofia da fibra tipo IIA em relação aos VACHT-KD^{HOM} SAL, revertendo a hipertrofia das fibras musculares observada por Magalhães-Gomes et al. (2018). Observamos também a conversão da fibra tipo IIA para fibras com perfil mais glicolítico tipo IIX e IIB. Assim, o tratamento a longo prazo do formoterol, além de reverter as alterações hipertróficas existentes nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, induz a diferenciação do perfil oxidativo para o perfil glicolítico no músculo sóleo.

4.3 Tratamento combinado de 30 dias com o anticolinesterásico piridostigmina e o agonista β 2-adrenérgico formoterol.

A administração do anticolinesterásico piridostigmina inicialmente melhora os déficits motores e musculares apresentados pelos pacientes e modelos murinos na maioria dos quadros de SMCs (Engel et al., 2015). Porém, o tratamento com a piridostigmina atenua apenas parcialmente o comprometimento motor e muscular de pacientes diagnosticados com SMC pré-sináptica (Pugliese et al., 2023) e dos camundongos VACHT-KD^{HOM} (Magalhães-Gomes et al., 2018). Dado o crescente uso de agonistas β 2-adrenérgicos para o tratamento das SMCs (Beeson, 2023), um estudo demonstrou que a administração do simpatomimético conjugado com a piridostigmina atenua os efeitos adversos causados pela administração somente do anticolinesterásico e, ainda, reduz a fraqueza e fadiga muscular, além de promover o aumento da placa motora em camundongos modelo para SMC pós-sináptica (Vanhaesebrouck et al., 2019). Desse modo, tendo em vista que a piridostigmina aumenta a disponibilidade de ACh na fenda sináptica, pensamos que a combinação do anticolinesterásico junto ao agonista β 2-adrenérgico seria uma estratégia farmacológica pertinente para o nosso modelo de SMC pré-sináptica, uma vez que animais VACHT-KD^{HOM} apresentam alterações na liberação de ACh nas sinapses neuromusculares (Prado et al., 2006). Portanto, realizamos um tratamento combinado de 30 dias de piridostigmina com o formoterol para investigar se os fármacos combinados também seriam capazes de induzir alterações do fenótipo motor, das JNMs e das fibras musculares esqueléticas nos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

4.3.1 Tratamento conjugado de piridostigmina com formoterol promove ganho de massa corporal e massa muscular do EDL e melhora a disfunção motora dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

Assim como nos outros esquemas farmacológicos realizados neste estudo, fizemos a pesagem dos animais durante todos os dias de tratamento e a pesagem dos músculos e do coração após a eutanásia. Também realizamos os testes comportamentais pré e pós-tratamento para avaliar se haveria alterações motoras nos animais VACHT-KD^{HOM}.

Inicialmente, semelhante aos outros tratamentos, observamos o aumento na massa corporal dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} tratados em relação aos seus respectivos grupos controle, com um ganho de massa corporal aproximado de 5% (VACHT-KD^{HOM} SAL: -0.11 ± 0.53 , VACHT-KD^{HOM} PF: 4.08 ± 1.21) (**Figuras 31A e 31B**). Em relação à massa dos músculos, nesta estratégia farmacológica, os animais WT PF exibiram redução na massa muscular do EDL em comparação aos animais WT SAL (WT SAL: 10.28 ± 0.51 , WT PF: 8.44 ± 0.52) enquanto os camundongos VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram aumento da massa no mesmo músculo em relação ao seu grupo veículo VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL: 9.45 ± 0.47 , VACHT-KD^{HOM} PF: 11.02 ± 0.48) (**Figura 31C**). Por outro lado, no músculo sóleo e no coração, não observamos diferenças nas massas entre os grupos experimentais (**Figuras 31D e 31E**).

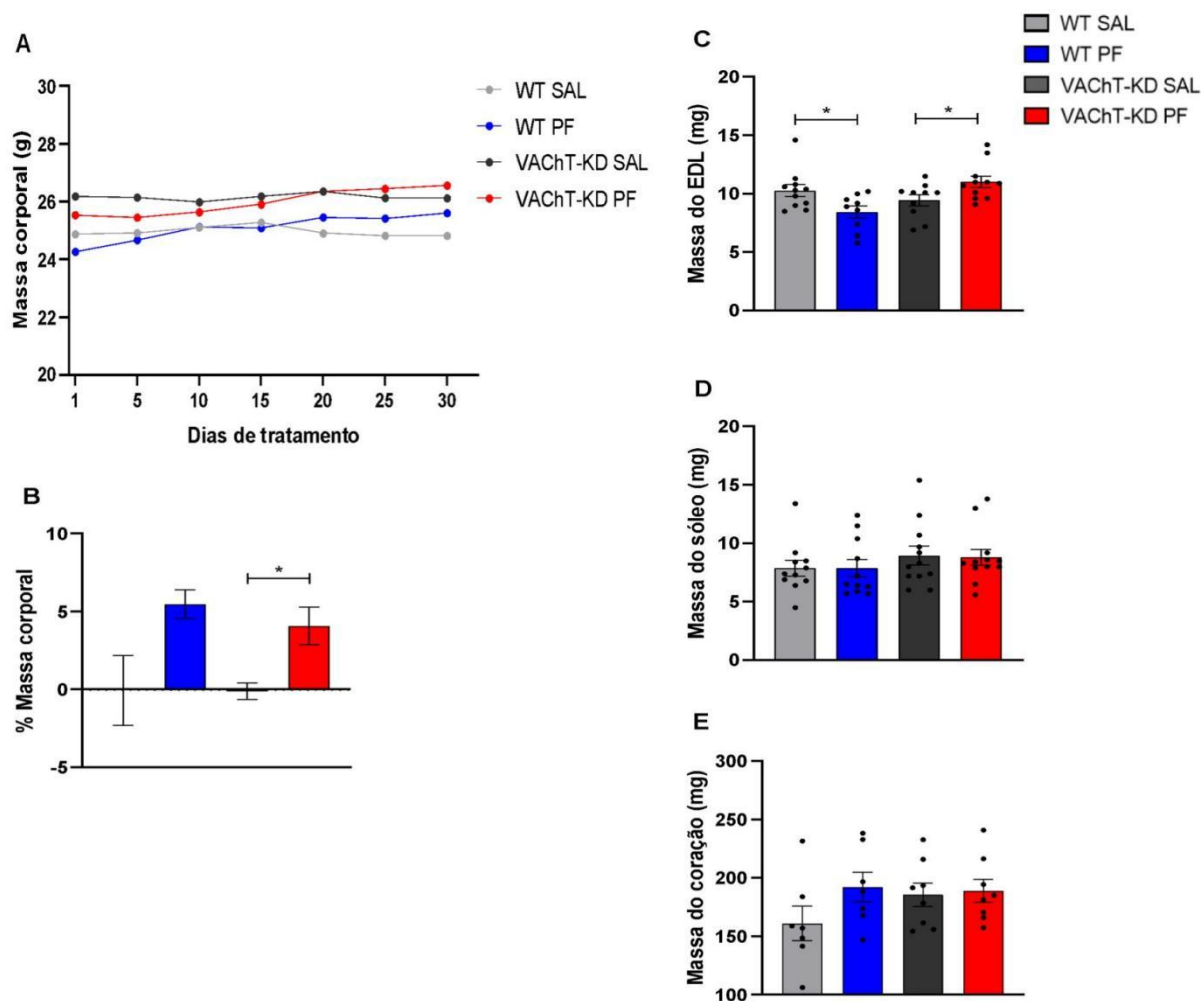


Figura 31. Tratamento combinado induz aumento de massa corporal e massa do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF e promove redução da massa do músculo glicolítico dos animais WT PF. **A-** Curva da massa corporal em gramas (g) durante os 30 dias de tratamento combinado dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}. **B-** Diferença em porcentagem (%) da massa corporal em relação ao primeiro dia de tratamento. Os camundongos VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram um ganho de massa em relação ao seu grupo controle VACHT-KD^{HOM} SAL, enquanto os animais WT apresentaram perda de massa corporal em relação aos animais WT SAL (teste de Wilcoxon, * $p < 0.05$). **C-** Massa do músculo EDL em miligramas (mg). Camundongos WT PF e VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram aumento da massa muscular do EDL em comparação aos seus grupos veículos (teste t de Student não pareado, * $p < 0.05$). **D-** Massa do músculo sóleo em miligramas (mg). Não foi observada diferença da massa muscular entre os grupos experimentais. **E-** Massa do coração em miligramas. Não houve diferença entre os grupos experimentais. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram utilizados 10 camundongos WT SAL, 10 camundongos WT PF, 11 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 11 camundongos VACHT-KD^{HOM} PF.

A respeito dos testes comportamentais motores, os animais miastênicos tratados não exibiram alteração na força muscular das patas anteriores (**Figura 32A**), mas apresentaram um aumento na força muscular das quatro patas em relação ao seu desempenho no teste realizado pré-tratamento e também quando comparados ao seu grupo controle VACHT-KD^{HOM} SAL no pré e pós-tratamento (VACHT-KD^{HOM} SAL^{PRÉ}: 1.35 ± 0.06 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{PÓS}: 1.38 ± 0.06 , VACHT-KD^{HOM} PF^{PRÉ}: 1.36 ± 0.07 , VACHT-KD^{HOM} PF^{PÓS}: 1.63 ± 0.05 ; $p < 0.05$) (**Figura 32B**). A melhora dos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF pós-tratamento também foi observada no teste esteira giratória nos dois parâmetros analisados. No tempo de latência para queda, os animais VACHT-KD^{HOM} PF exibiram maior tempo de latência em relação ao seu desempenho no pré-tratamento e em comparação com a performance no pré-tratamento dos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL^{PRÉ}: 137.5 ± 12.7 , VACHT-KD^{HOM} PF^{PRÉ}: 133.3 ± 10.6 , VACHT-KD^{HOM} PF^{PÓS}: 189.5 ± 15.81 ; $p < 0.05$) (**Figura 32C**). Para o número de quedas, os camundongos VACHT-KD^{HOM} tratados apresentaram redução de quedas em comparação com o desempenho no pré-tratamento dos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL^{PÓS}: 9.29 ± 0.19 , VACHT-KD^{HOM} PF^{PÓS}: 3.49 ± 1.02 ; $p < 0.05$) (**Figura 32D**). Assim como observado nos tratamentos anteriores, a performance dos animais VACHT-KD^{HOM} no teste grade invertida não foi alterada (**Figura 32E**). Para os camundongos WT tratados com os fármacos, não houve alterações nos testes comportamentais força de agarre e esteira giratória em relação aos animais WT SAL (**Figuras 32A, 32B, 32C e 32D**). Contudo, na grade invertida, os camundongos WT PF apresentaram uma piora parcial no seu desempenho em relação ao pré-tratamento (**Figura 32E**).

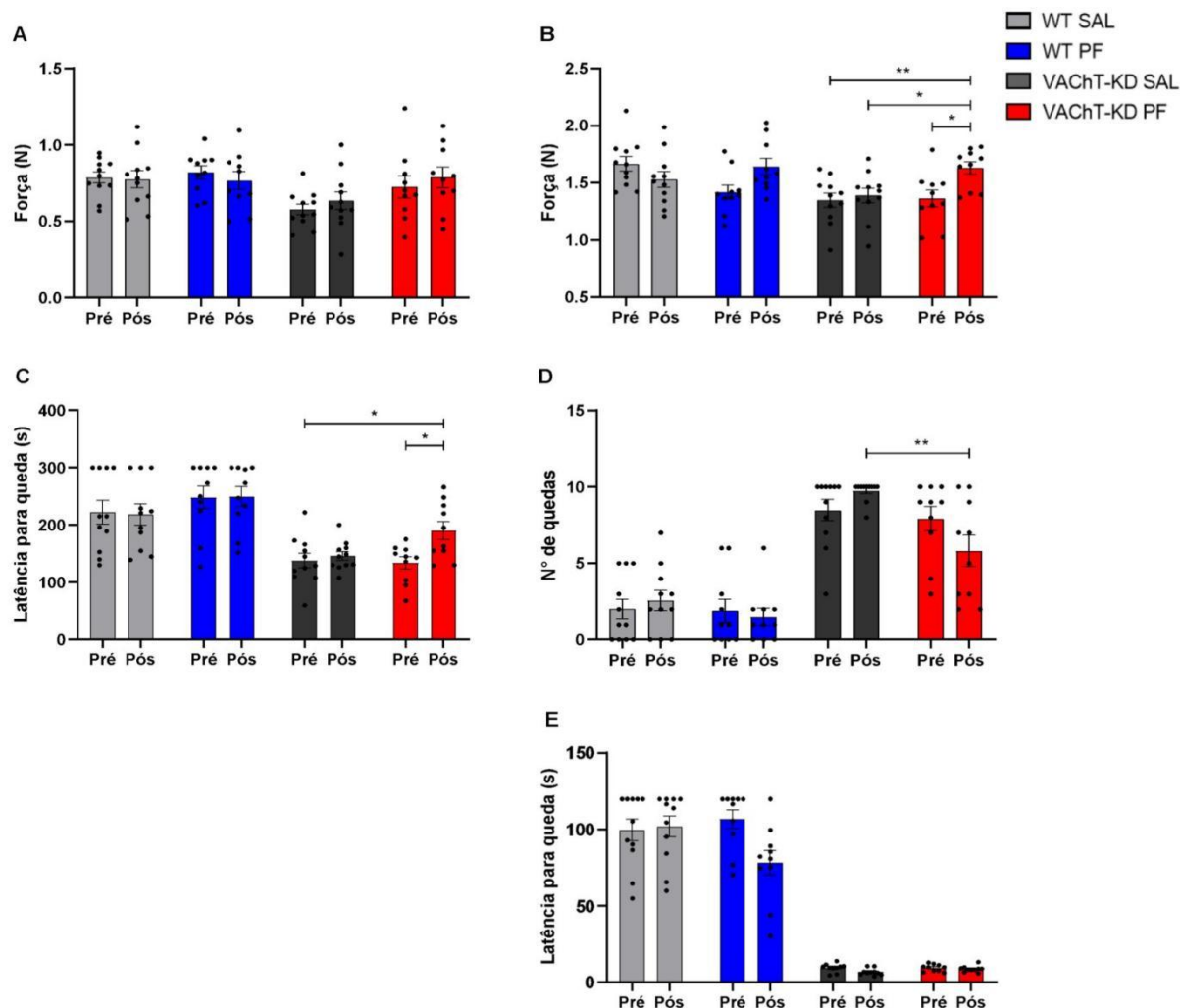


Figura 32. Tratamento de 30 dias utilizando o anticolinesterásico piridostigmina junto ao agonista $\beta 2$ -adrenérgico formoterol atenua disfunção motora dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. **A-** Mensuração da força de agarre das patas anteriores em Newton (N), na qual não observamos diferenças estatísticas entre os camundongos tratados e os seus respectivos grupos controle. **B-** Mensuração da força de agarre das quatro patas em Newton (N). Os camundongos VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram maior força de agarre no pós-tratamento em comparação ao seu desempenho no pré-tratamento e, também, em relação aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL no pré e pós-tratamento (Ordinary one-way ANOVA, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). **C-** Avaliação do tempo de latência para queda em segundos (s) na esteira giratória. Os animais VACHT-KD^{HOM} PF aumentaram seu tempo de latência no pós-tratamento em comparação ao seu desempenho no pré-tratamento e também em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL no pré-tratamento. (Ordinary one-way ANOVA, * $p < 0.05$). **D-** Avaliação do número de quedas totais durante todo o período de teste esteira giratória. Neste parâmetro, os camundongos VACHT-KD^{HOM} PF reduziram o número de quedas com o

tratamento em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL pós-tratamento (Kruskal-Wallis test, $**p<0.005$). E- Avaliação do tempo de latência para queda em segundos (s) na grade invertida dos camundongos. O tratamento não alterou o desempenho dos animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} PF em relação aos animais controle. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram utilizados 10 camundongos WT SAL, 10 camundongos WT PF, 11 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 11 camundongos VACHT-KD^{HOM} PF.

Portanto, os resultados da massa corporal e da massa do músculo EDL, junto com os dados obtidos dos testes comportamentais, indicam que o tratamento combinado de 30 dias do anticolinesterásico piridostigmina com agonista β 2-adrenérgico formoterol também é capaz de promover o ganho de massa e o aumento da força muscular, além de atenuar os déficits motores dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

4.3.2 Tratamento combinado de 30 dias dos fármacos piridostigmina e formoterol promove aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

Observada a melhora da função muscular e motora dos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF, o próximo experimento foi investigar se o esquema farmacológico modificaria a estrutura das JNMs nos músculos EDL e sóleo. Vanhaesebrouck et al. (2019) demonstraram que, após a adição de agonista β 2-adrenérgico junto à piridostigmina na estratégia terapêutica, os animais modelos para SMC pós-sináptica apresentaram um aumento da área sináptica do músculo EDL. Sendo assim, utilizando a mesma metodologia citada no item 4.2.2, realizamos análises para mensurar a área da terminação axonal e da placa motora, assim como o índice de colocalização das terminações.

Nas análises dos nossos dados para o músculo EDL, nos animais WT PF, não observamos nenhuma alteração de tamanho da área sináptica tanto pré quanto pós-sináptica. (**Figuras 33A, 33B e 33C**), porém, na análise do índice de colocalização, notamos que os camundongos selvagens tratados apresentaram uma redução da colocalização da terminação a terminação pós-sináptica quando comparados aos camundongos WT SAL (WT SAL: 95.52 ± 0.48 , WT PF: 93.32 ± 0.6 ; $p<0.05$) (**Figura 33D**). Já nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, o tratamento combinado induziu o aumento de tamanho da área da terminação axonal (VACHT-KD^{HOM} SAL: 423.1 ± 25.74 , VACHT-KD^{HOM} FOR: 495.2 ± 16.10 ; $p<0.05$) e da placa motora no músculo glicolítico EDL (VACHT-KD^{HOM} SAL: 443.0 ± 26.13 , VACHT-KD^{HOM} FOR:

530.0 $\pm$ 16.94; $p < 0.05$) (**Figuras 33A, 33B, 33C**), mas não alterou o grau de colocalização das terminações pré e pós-sinápticas em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (**Figura 33D**).

No músculo sóleo, não observamos alterações na área pré e pós-sináptica dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} tratados quando comparados aos seus respectivos grupos controle, WT SAL e VACHT-KD^{HOM} SAL (**Figuras 34A, 34B e 34C**). Para o índice de colocalização das terminações, não observamos diferenças na colocalização sináptica dos animais VACHT-KD^{HOM} PF em relação aos animais miastênicos veículos (**Figura 34D**). Todavia, assim como ocorreu no músculo EDL, para o músculo sóleo, o índice de colocalização da terminação pré-sináptica com a pós-sináptica foi menor nos camundongos WT PF em relação aos animais WT SAL (WT SAL: 93.51 $\pm$ 0.56, WT PF: 91.91 $\pm$ 0.59; $p < 0.05$) (**Figura 34D**).

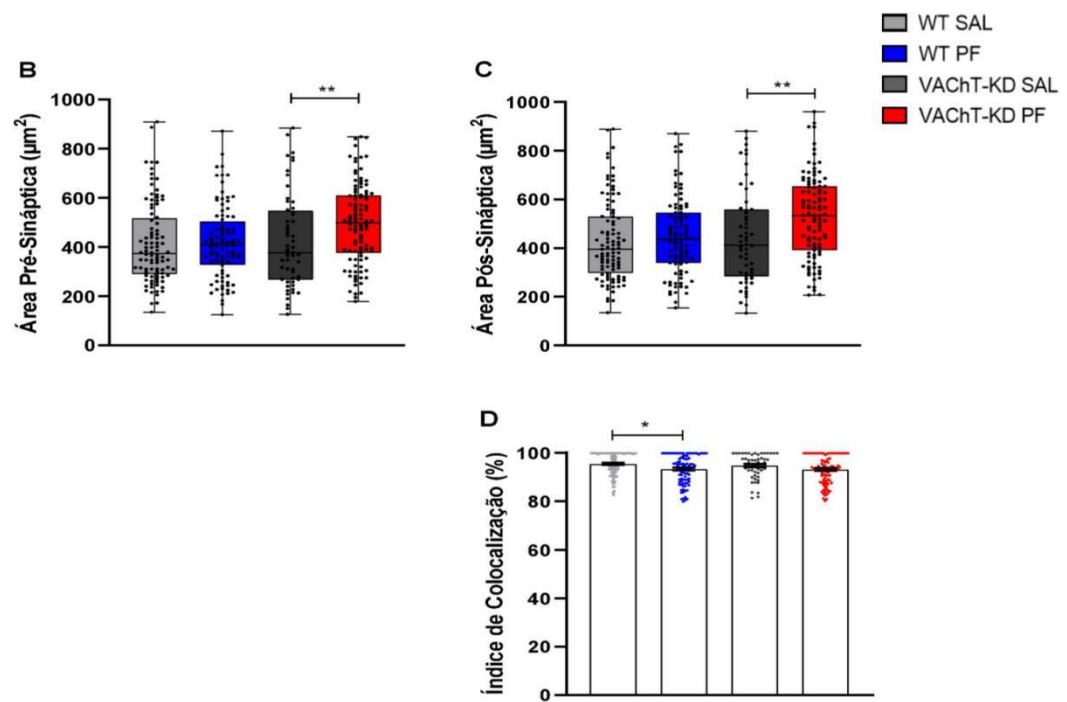
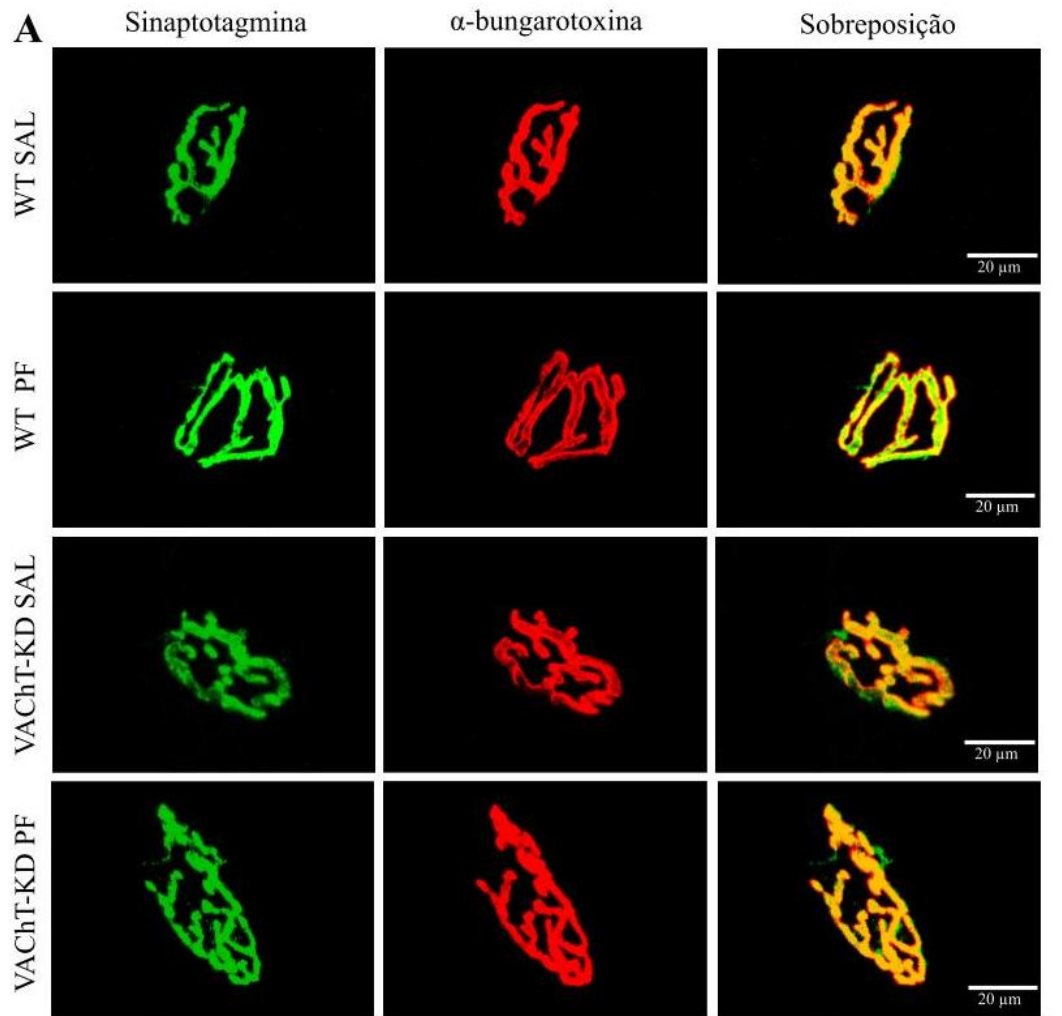


Figura 33. Tratamento combinado de 30 dias da piridostigmina com formoterol induz aumento das áreas pré e pós-sinápticas no músculo glicolítico EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}, mas redução do grau de colocalização dos camundongos WT PF. A- Imagens representativas em microscopia de fluorescência das JNMs do músculo EDL marcadas com o anticorpo anti-sinaptotagmina (terminação pré-sináptica), com o anticorpo α -bungarotoxina (terminação pós-sináptica) e a sobreposição de ambas as terminações. À esquerda, escrito verticalmente, estão os grupos experimentais utilizados neste estudo. **B-** Gráfico das análises quantitativas da área da terminação pré-sináptica em micrômetros (μm^2) do músculo EDL. Os camundongos VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram maior área da terminação axonal em comparação aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, $**p<0.005$). **C-** Gráfico das análises quantitativas da área da terminação pós-sináptica em micrômetros (μm^2) do músculo EDL. Os VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram aumento da área da placa motora em relação ao seu grupo controle VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, $**p<0.005$). **D-** Quantificação do índice de colocalização das terminações em porcentagem (%) do músculo EDL. Os animais WT PF exibiram grau de colocalização reduzido em comparação aos animais WT SAL (teste de Mann-Whitney, $*p<0.05$). Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas JNMs de 5 a 7 animais por grupo experimental. Barra de escala de 20 μm .

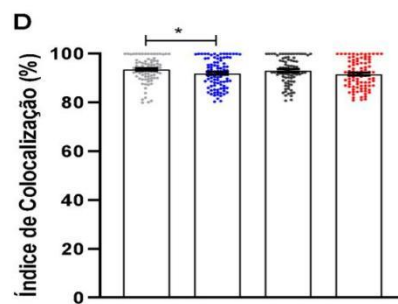
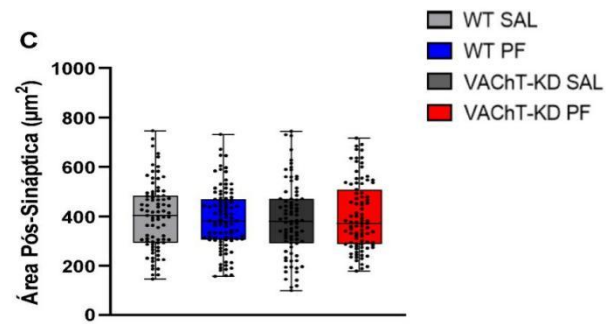
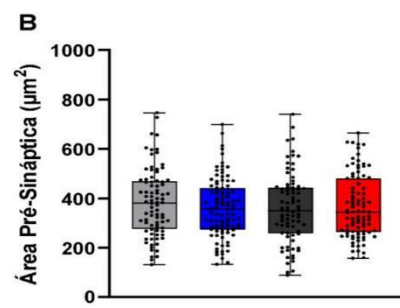
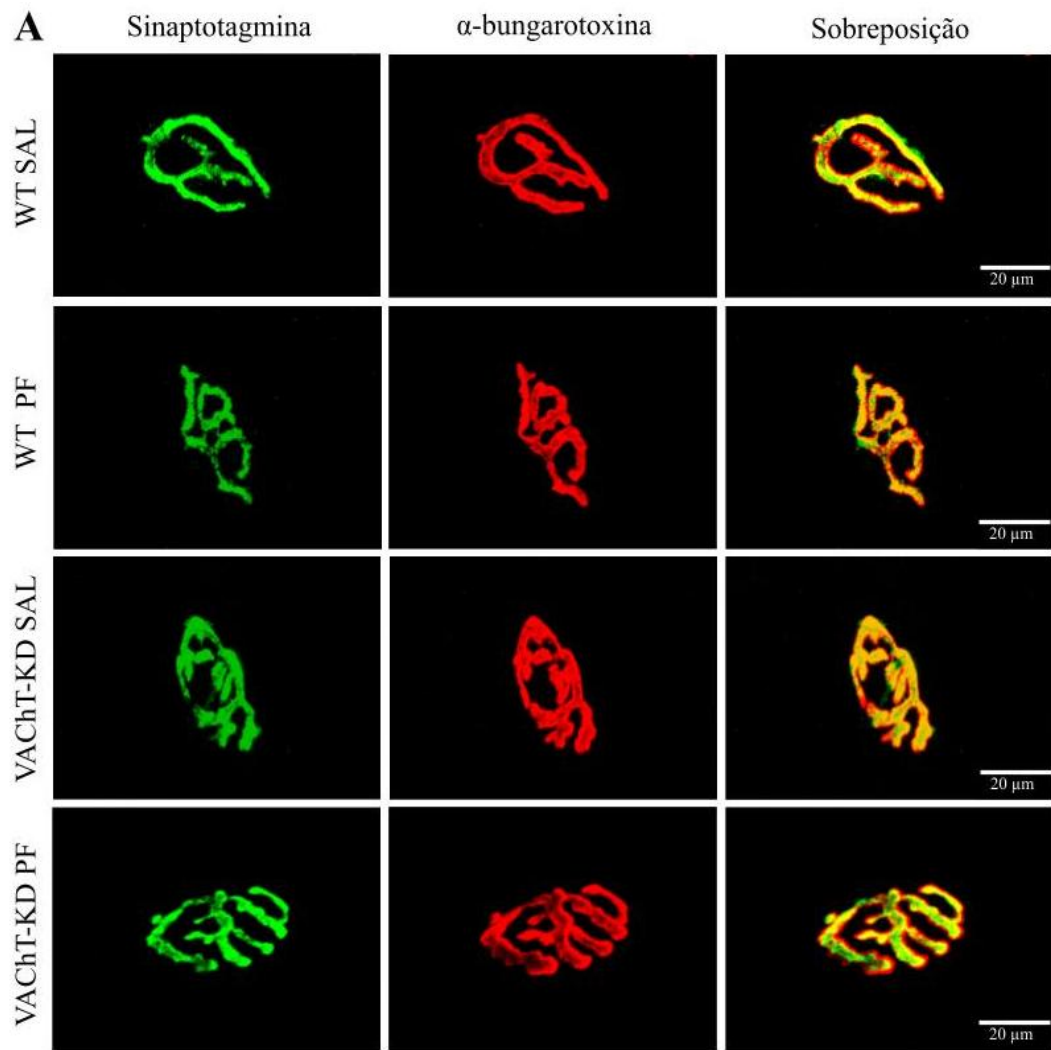


Figura 34. Tratamento de 30 dias combinando piridostigmina e formoterol não altera a área das terminações pré e pós-sinápticas no músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. **A-** Imagens representativas em microscopia de fluorescência das JNMs do músculo sóleo marcadas com o anticorpo anti-sinaptotagmina (terminação pré-sináptica), com o anticorpo α -bungarotoxina (terminação pós-sináptica) e a sobreposição de ambas as terminações. À esquerda, escrito verticalmente, estão os grupos experimentais utilizados neste estudo. **B e C-** Gráficos das análises quantitativas da área das terminações pré-sináptica e pós-sinápticas em micrômetros (μm^2) do músculo sóleo. Não observamos diferenças estatísticas da área das terminações pré e pós-sinápticas entre os animais tratados e seus respectivos grupos controle. **D-** Quantificação do índice de colocalização das terminações em porcentagem (%) do músculo sóleo. Observamos a redução do índice de colocalização dos camundongos WT PF em comparação aos camundongos WT SAL (teste de Mann-Whitney, $*p<0.05$). Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas JNMs de 5 a 7 animais por grupo experimental. Barra de escala de 20 μm .

Diante destes dados obtidos das JNMs, nós observamos que o tratamento combinado de 30 dias do anticolinesterásico piridostigmina com o agonista β 2-adrenérgico formoterol causa efeitos distintos na estrutura morfológica das JNMs em músculos com o perfil metabólico oposto. Para os camundongos VACHT-KD^{HOM} PF, no músculo EDL, houve um aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas, enquanto no músculo oxidativo sóleo não houve alteração do tamanho da área sináptica. Nos animais WT PF, a perda de colocalização das terminações sinápticas em ambos os músculos indica que, em animais saudáveis, a combinação dos fármacos pode ter efeitos deletérios na estrutura morfológica das sinapses neuromusculares.

4.3.3 Tratamento de 30 dias de piridostigmina com formoterol causa hipertrofia muscular e alteração dos tipos de fibras no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

Dados da literatura mostram que o uso de anticolinesterásico altera a musculatura esquelética de maneira indireta ao induzir alterações funcionais das JNMs (Millard; Broomfield, 1995). Além disso, o nosso grupo de pesquisa observou que a administração de piridostigmina no modelo VACHT-KD^{HOM} altera parcialmente a área de secção transversal das fibras musculares do EDL e promove mudanças no padrão de expressão das isoformas da

MyHC (Magalhães-Gomes et al., 2018). Por outro lado, como já mencionado, agonistas β 2-adrenérgicos têm ação hipertrófica no músculo glicolítico (Lynch; Ryall, 2008). Acrescenta-se também que os dados obtidos neste estudo mostraram que a administração do formoterol no músculo EDL induz hipertrofia e mudanças dos tipos de fibras nos camundongos VACHT-KD^{HOM} (item 4.2.3). Dessa forma, posto que observamos que o tratamento de piridostigmina com o formoterol nos camundongos VACHT-KD^{HOM} causou ganho da massa muscular do EDL, aumento da força muscular e melhora da função motora nos testes comportamentais, além de causar o aumento das áreas das pré e pós-sinápticas do músculo EDL, nosso próximo passo foi investigar se o tratamento combinado também teria efeitos nas fibras musculares esqueléticas neste músculo dos camundongos miastênicos.

Na análise da área de secção transversal, o tratamento combinado promoveu a atrofia da área muscular dos camundongos WT PF em comparação com o seu grupo controle WT SAL (WT SAL: 665.2 ± 8.92 , WT PF: 639.1 ± 6.75 ; $p < 0.05$) (**Figura 35C**). Já para os animais VACHT-KD^{HOM}, o tratamento promoveu o aumento da área muscular do músculo glicolítico em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL: 610.3 ± 8.06 , VACHT-KD^{HOM} PF: 869.0 ± 10.83 ; $p < 0.05$) (**Figura 35C**). Ao avaliarmos a área de secção transversal de cada fibra expressando isoformas da MyHC, observamos que os animais WT PF quando comparados aos animais WT SAL, apresentaram hipertrofia das fibras tipo I e IIX, e atrofia da fibra tipo IIA (WT SAL^{TIPO I}: 148.4 ± 20.43 , WT PF^{TIPO I}: 237.2 ± 10.97 , WT SAL^{TIPO IIA}: 234.0 ± 5.68 , WT PF^{TIPO IIA}: 216.6 ± 3.64 , WT SAL^{TIPO IIX}: 426.7 ± 8.80 , WT PF^{TIPO IIX}: 507.0 ± 8.40 ; $p < 0.05$) (**Figura 35D**). Nos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF, observamos o aumento da área de secção transversal das fibras tipo IIA, IIX e IIB em comparação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIA}: 251.5 ± 5.68 , VACHT-KD^{HOM} PF^{TIPO IIA}: 316.7 ± 8.35 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIX}: 361.4 ± 4.87 , VACHT-KD^{HOM} PF^{TIPO IIX}: 507.0 ± 8.40 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIB}: 901.3 ± 11.39 , VACHT-KD^{HOM} PF^{TIPO IIB}: 1198.0 ± 12.95 ; $p < 0.05$) (**Figura 35E**). O tratamento combinado não alterou o padrão de expressão das isoformas da MyHC nos camundongos WT PF em relação aos animais WT SAL (**Figura 35F**). Por outro lado, o esquema farmacológico promoveu alterações no padrão de expressão das isoformas da MyHC nos animais VACHT-KD^{HOM} PF, nos quais observamos a redução da expressão da fibra tipo IIX e o aumento de expressão da fibra tipo IIB em comparação aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIX}: 47.60 ± 3.17 , VACHT-KD^{HOM} PF^{TIPO IIX}: 34.28 ± 2.67 , VACHT-KD^{HOM} SAL^{TIPO IIB}: 44.85 ± 3.33 , VACHT-KD^{HOM} PF^{TIPO IIB}: 56.36 ± 3.08 ; $p < 0.05$) (**Figura 35G**).

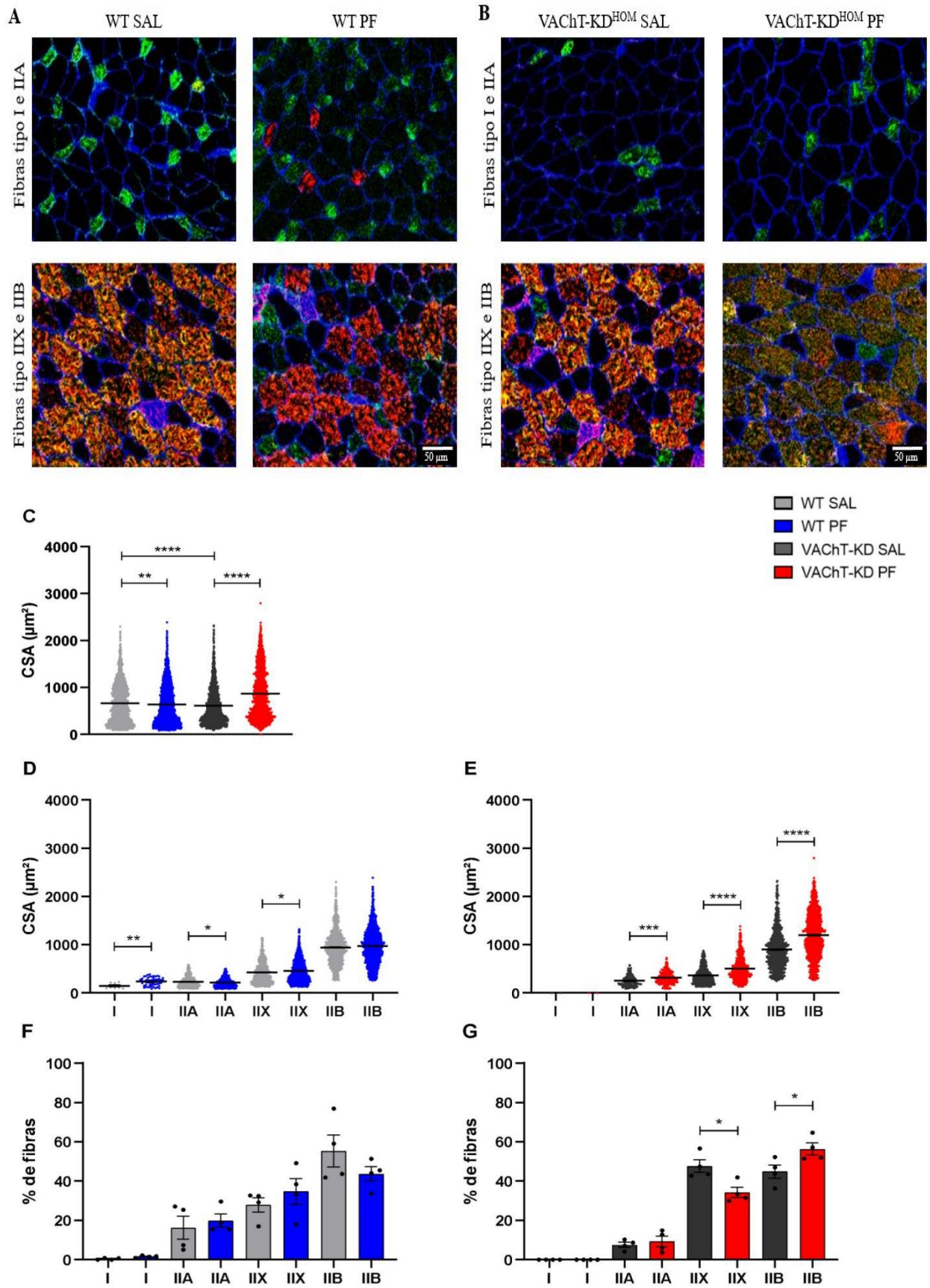


Figura 35. Tratamento de piridostigmina com formoterol amplia área muscular e induz alteração dos tipos de fibras no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. A e B- Imagens representativas em microscopia de fluorescência das fibras musculares esqueléticas do músculo EDL dos grupos experimentais utilizados. No painel superior, é possível identificar as fibras tipo I e IIA marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcações em vermelho correspondem às fibras tipo I e marcações em verde correspondem às fibras tipo IIA. Marcações em negativo podem corresponder às fibras tipo IIX ou IIB. No painel inferior, é possível identificar as fibras tipo IIX e IIB marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcações em negativo correspondem às fibras tipo IIX e marcações em laranja correspondem às fibras tipo IIB. Marcações em verde podem corresponder às fibras tipo I ou IIA. **C-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) do músculo EDL. Os camundongos WT PF exibiram atrofia da área muscular em relação ao seu grupo controle WT SAL. Os camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL tem atrofia em relação aos camundongos WT SAL. Os animais VACHT-KD^{HOM} PF tiveram hipertrofia da área muscular em comparação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, $**p<0.005$; $****p<0.0001$). **D-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo EDL dos camundongos WT. Os animais WT tratados apresentaram atrofia da fibra tipo IIA e hipertrofia das fibras tipo I e IIX em relação aos animais WT SAL (teste de Mann-Whitney, $*p<0.05$; $**p<0.005$). **E-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Todas as fibras quantificadas dos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram hipertrofia (fibras tipo IIA, IIX e IIB) quando comparadas aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, $***p<0.0005$; $****p<0.0001$). **F-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo EDL dos camundongos WT. Não observamos diferenças na expressão dos tipos de fibras entre os camundongos selvagens tratados e veículos. **G-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Os camundongos VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram redução da expressão da fibra tipo IIX, mas aumento da expressão da fibra de contração rápida tipo IIB em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (teste t de Student não pareado, $*p<0.05$). Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas fibras musculares esqueléticas de 4 camundongos WT SAL, 4 camundongos WT FOR, 4 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 5 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR. Barra de escala de 50 μm .

Os resultados das análises das fibras musculares do músculo EDL indicam que o tratamento combinado do anticolinesterásico piridostigmina com o agonista β 2-adrenérgico formoterol promove a atrofia das fibras musculares nos animais WT em comparação aos animais WT não tratados. Em contrapartida, para os animais VACHT-KD^{HOM}, o esquema farmacológico combinado induziu o aumento da área muscular e a hipertrofia das fibras musculares tipo II no músculo EDL, revertendo a atrofia observada nestes animais (Magalhães-Gomes et al., 2018). Ainda, o tratamento testado alterou a frequência de expressão das fibras musculares, na qual observamos o aumento de fibra tipo IIB compensando a redução da fibra tipo IIX, indicando que o músculo EDL está assumindo um perfil ainda mais glicolítico. Portanto, o tratamento conjugado da piridostigmina com formoterol se mostra positivo ao reverter as alterações musculares observadas nos camundongos VACHT-KD^{HOM} por promover a hipertrofia das fibras e induzir a alteração de perfil metabólico no músculo EDL nestes animais.

4.3.4 Tratamento combinado de 30 dias com piridostigmina e formoterol induz hipertrofia das fibras musculares do músculo sóleo dos animais VACHT-KD^{HOM}.

Como mencionado anteriormente, Magalhães-Gomes et al. (2018) demonstraram que o músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM} também sofre alterações musculares e que o tratamento com o anticolinesterásico piridostigmina não induz nenhuma atenuação destas alterações. Embora o tratamento combinado não tenha promovido alterações na estrutura das terminações sinápticas das JNMs no músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM} (item 4.3.2), procuramos investigar se a administração dos fármacos em conjunto iria alterar a área das fibras musculares esqueléticas e, também, o padrão de expressão dos tipos de fibras.

Diferentemente do observado nas análises da área das terminações das sinapses neuromusculares, aqui observamos que o tratamento combinado induziu o aumento da área muscular no músculo sóleo dos animais VACHT-KD^{HOM} PF em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL (VACHT-KD^{HOM} SAL: 742.2 ± 7.96 , VACHT-KD^{HOM} PF: 808.8 ± 6.64 ; $p < 0.05$) (**Figura 36C**). Por outro lado, nos animais WT PF em comparação aos camundongos WT SAL, o esquema farmacológico não alterou a área de secção transversal muscular (**Figura 36C**). Para as análises da área de secção transversal de cada tipo de fibra, os camundongos WT PF, quando comparados aos camundongos WT SAL, apresentaram hipertrofia das fibras oxidativas tipo I e atrofia das fibras glicolíticas tipo IIB (WT SAL^{TIPO I}: 775.1 ± 11.51 , WT

$PF^{TIPO\ I}: 843.0 \pm 13.59$, $WT\ SAL^{TIPO\ IIB}: 1383.0 \pm 81.56$, $WT\ PF^{TIPO\ IIB}: 1064.0 \pm 77.0$; $p < 0.05$) (**Figura 36D**). Já para os camundongos $VACHT-KD^{HOM}$ PF em relação ao seu grupo veículo $VACHT-KD^{HOM}$ SAL, foi observado o aumento da área de secção transversal das fibras tipo IIA e IIX ($VACHT-KD^{HOM}$ SAL $TIPO\ IIA: 703.6 \pm 10.76$, $VACHT-KD^{HOM}$ PF $TIPO\ IIA: 762.5 \pm 8.94$, $VACHT-KD^{HOM}$ SAL $TIPO\ IIX: 620.5 \pm 35.08$, $VACHT-KD^{HOM}$ PF $TIPO\ IIX: 872.0 \pm 26.10$; $p < 0.05$) (**Figura 36E**). Nas análises de frequência do padrão de expressão das isoformas da MyHC, notamos que houve apenas a redução das fibras tipo I nos animais WT PF em relação aos animais WT SAL ($WT\ SAL^{TIPO\ I}: 43.36 \pm 0.77$, $WT\ PF^{TIPO\ I}: 35.14 \pm 1.27$; $p < 0.05$) (**Figura 36F**), e não observamos mudanças no padrão de expressão dos tipos de fibra nos camundongos $VACHT-KD^{HOM}$ tratados com a piridostigmina junto ao formoterol em comparação aos camundongos $VACHT-KD^{HOM}$ SAL (**Figura 36G**).

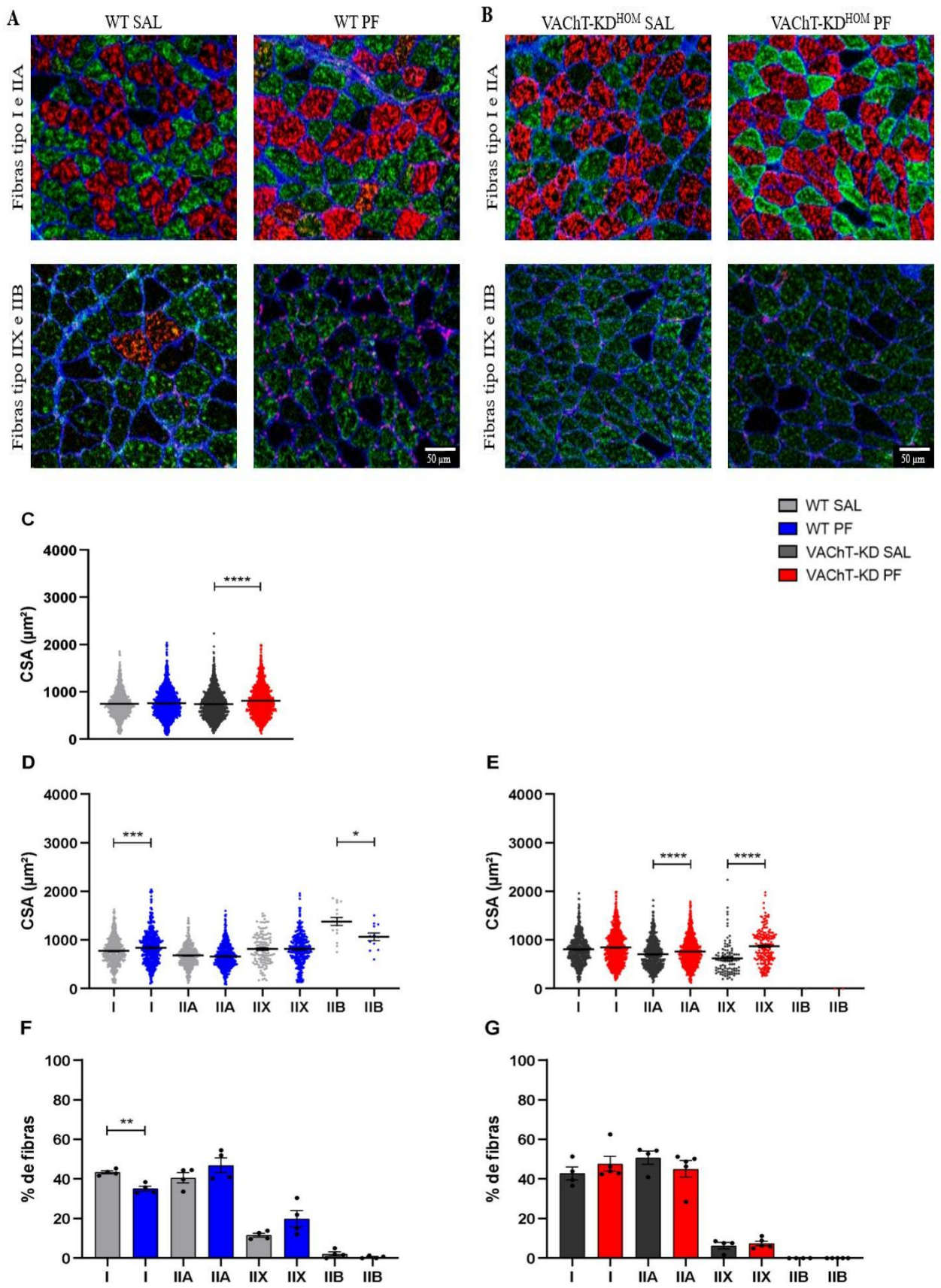


Figura 36. Tratamento de piridostigmina com formoterol induz hipertrofia no músculo oxidativo sóleo dos animais VACHT-KD^{HOM}. A e B- Imagens representativas em microscopia de fluorescência das fibras musculares esqueléticas do músculo sóleo dos grupos experimentais utilizados. No painel superior, é possível identificar as fibras tipo I e IIA marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcações em vermelho correspondem às fibras tipo I e marcações em verde correspondem às fibras tipo IIA. Marcações em negativo podem corresponder às fibras tipo IIX ou IIB. No painel inferior, é possível identificar as fibras tipo IIX e IIB marcadas com seus respectivos anticorpos. Marcações em negativo correspondem às fibras tipo IIX e marcações em laranja correspondem às fibras tipo IIB. Marcações em verde podem corresponder às fibras tipo I ou IIA. **C-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) do músculo sóleo. Os animais VACHT-KD^{HOM} PF apresentaram hipertrofia da área muscular em comparação com o seu grupo controle VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, **** $p < 0.0001$). **D-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo sóleo dos camundongos WT. Os animais WT PF apresentaram hipertrofia da fibra oxidativa tipo I e atrofia da fibra glicolítica tipo IIB em comparação aos animais WT SAL (teste de Mann-Whitney, * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$). **E-** Gráfico quantitativo da área de secção transversal em micrômetros (μm^2) para cada isoforma da MyHC do músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Os animais VACHT-KD^{HOM} PF exibiram hipertrofia das fibras tipo IIA e IIX em relação aos camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL (teste de Mann-Whitney, **** $p < 0.0001$). **F-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo sóleo dos camundongos WT. Os camundongos WT FOR tiveram apenas a redução da expressão da fibra de contração lenta tipo I (teste t de Student não pareado, ** $p < 0.005$). **G-** Gráfico de frequência da expressão das isoformas da MyHC do músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. O tratamento combinado não alterou a expressão das isoformas da MyHC nos animais VACHT-KD^{HOM} PF em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL. Os dados expressam a média $\pm$ EPM. Foram analisadas fibras musculares esqueléticas de 4 camundongos WT SAL, 4 camundongos WT FOR, 4 camundongos VACHT-KD^{HOM} SAL e 5 camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR. Barra de escala de 50 μm .

As análises destes dados indicam que o tratamento combinado de 30 dias induz o aumento da área muscular e hipertrofia das isoformas tipo IIA e IIX no músculo sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. No entanto, o esquema farmacológico não é capaz de alterar o padrão de expressão das isoformas da MyHC nestes animais.

5. DISCUSSÃO

As Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs) caracterizam-se como desordens neurodegenerativas hereditárias relacionadas às variantes patogênicas em genes que codificam proteínas localizadas nas junções neuromusculares (JNMs). A disfunção nestas proteínas sinápticas resulta no comprometimento motor, levando à fraqueza e à fadiga muscular nos pacientes miastênicos (Engel et al., 2015; Ohno et al., 2023). Portanto, para atenuar os déficits motores, a intervenção terapêutica com anticolinesterásicos é utilizada como primeira opção para o tratamento da maioria dos casos de SMCs. Contudo, é sabido que o uso desses fármacos pode resultar em efeitos adversos para alguns quadros miastênicos e induzir a piora dos sinais clínicos (Vanhaesebrouck; Beeson, 2019; Beeson, 2023). Assim, nos anos recentes, novas estratégias terapêuticas vêm sendo desenvolvidas visando aprimorar o tratamento das miastenias. Dentre elas, destaca-se o uso de agonistas β 2-adrenérgicos. Seu uso na clínica e em modelos murinos para SMCs de origem pós-sináptica e SMCs associadas à lâmina basal sináptica foi associado à melhora dos sintomas motores e musculares (McMacken et al., 2019; Spendiff et al., 2020; Webster et al., 2020; Beeson, 2023). Ademais, demonstraram que a administração de agonista β 2-adrenérgico junto a piridostigmina é capaz de atenuar e melhorar as disfunções motoras e estruturais das JNMs em camundongos para SMC pós-sináptica (Vanhaesebrouck et al., 2019). Contudo, todas essas abordagens farmacológicas foram realizadas em pacientes e em modelos murinos com as SMCs pós-sinápticas e SMCs associadas à lâmina basal sináptica. Dessa forma, neste estudo, objetivamos testar diferentes esquemas terapêuticos utilizando o agonista β 2-adrenérgico formoterol e o anticolinesterásico piridostigmina em um modelo murino que mimetiza uma SMC pré-sináptica. Aqui, de forma inédita, utilizamos o agonista β 2 formoterol, uma vez que este agonista apresenta maior duração e início de ação rápida em relação a outros agonistas β 2-adrenérgicos utilizados para o tratamento das SMCs, como o clenbuterol e o salbutamol (Lecaillon et al., 1999; Szlenk; Gc; Natesan, 2021). Neste trabalho, utilizamos camundongos geneticamente modificados que apresentam a redução de 65% de expressão da proteína Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT-KD^{HOM}) e, portanto, possuem déficits motores e musculares, caracterizando-os como um modelo murino para SMC pré-sináptica (Prado et al., 2006).

5.1 Tratamento de 30 dias com o agonista β 2-adrenérgico formoterol não causa atenuação do fenótipo miastênico dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

Magalhães-Gomes et al. (2018) demonstraram que através de intervenção terapêutica utilizando anticolinesterásico, os camundongos VACHT-KD^{HOM} têm a atenuação parcial da sua disfunção muscular. Por outro lado, há o crescente uso clínico de agonistas β 2-adrenérgicos, os quais têm sido associados ao aumento de força muscular e prevenção da perda de massa muscular em condições nas quais há comprometimento motor (Carter; Lynch, 1994; Lynch; Ryall, 2008), e também em modelos murinos que mimetizam as SMCs pós-sinápticas (Burke et al., 2013; McMacken et al., 2019). Recentemente, Rossi et al. (2024) demonstraram que a administração por 30 dias do agonista β 2-adrenérgico formoterol induziu alterações na unidade motora em um modelo murino com a deleção completa do VACHT em α -motoneurônios (mnVACHT-KD). Contudo, o referido estudo utilizou um modelo murino nocaute condicional, portanto, o animal não mimetiza clinicamente as SMCs pré-sinápticas observadas em pacientes humanos (O'Grady et al., 2016; Aran et al., 2017; Schwartz et al., 2018; Della Marina et al., 2021). Com isso, a primeira estratégia farmacológica realizada foi a administração do agonista β 2-adrenérgico formoterol por 30 dias. Neste tratamento, observamos o aumento de massa corporal dos animais tratados em relação aos animais veículos. O aumento da massa corporal decorrente da administração de agonistas β 2-adrenérgicos é um achado bem consolidado na literatura e geralmente está associado ao ganho de massa muscular (Lynch; Ryall, 2008; Gonçalves et al. 2019). No entanto, para os animais VACHT-KD^{HOM}, o tratamento de 30 dias com o simpatomimético não induziu o ganho de massa muscular nos músculos pesados. Ainda, não observamos a atenuação ou a melhora do fenótipo motor nos testes comportamentais dos camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR. Semelhante aos nossos achados, outros estudos utilizando agonistas β 2 em pacientes diagnosticados com SMC demonstraram que o tratamento a curto prazo não foi capaz de amenizar os sintomas motores, contudo, quando a intervenção terapêutica foi entendida por períodos mais longos, houve a redução dos déficits motores nesses pacientes (Lashley et al., 2010; Lorenzoni et al., 2013). Ademais, estudos utilizando agonista β 2-adrenérgico em modelos murinos para SMC associada à lâmina basal sináptica e para SMC pós-sináptica demonstraram que a abordagem farmacológica com o simpatomimético por 30 dias não resultou na atenuação do fenótipo miastênico, ao passo que o tratamento a longo prazo produziu maiores efeitos na redução das disfunções motoras (McMacken et al., 2019; Vanhaesebrouck et al., 2019). Dessa forma, partimos então para um tratamento estendido com o formoterol, sem alterar a sua concentração final, nos animais miastênicos.

5.2 Tratamento de 90 dias com o formoterol melhora a performance motora e induz alterações estruturais nas JNMs e fibras musculares dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM}.

Dado que o tratamento de 30 dias não induziu alterações do fenótipo miastênico, realizamos um esquema farmacológico com o agonista β 2-adrenérgico formoterol a longo prazo, totalizando 90 dias de tratamento. Esta abordagem baseia-se em dados na literatura que mostram que o tratamento a longo prazo utilizando agonistas β 2-adrenérgicos promove o aumento da força muscular associada com efeitos anabólicos e anticatabólicos de proteínas musculares (Zeman et al., 1988) em animais com miopatias (Hayes; Williams, 1994; Calabrò et al., 2024). Para as doenças neurodegenerativas e SMCs de origem pós-sináptica e associada à lâmina basal sináptica, a administração a longo prazo de simpatomiméticos atenua os déficits motores e estruturais das JNMs e induz o aumento da força muscular (Lashley et al., 2010; Bartus et al., 2016; McMacken et al., 2019). Os nossos dados mostraram um aumento de massa corporal dos animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR em relação aos animais veículos, acompanhado de um ganho de massa muscular no EDL nos animais VACHT-KD^{HOM} FOR. Além disso, não foi observado um aumento de massa do coração nos animais tratados com o simpatomimético, sinalizando uma ausência de efeito secundário adverso cardíaco. Agonistas β 2 de nova geração, como o formoterol, são conhecidos por produzir efeitos hipertróficos na musculatura esquelética e minimizar a resposta anabólica no sistema cardiovascular (Lynch; Ryall, 2008). Assim, estes dados sugerem que o aumento da massa corporal tem relação com os eventos hipertróficos da musculatura esquelética e não da massa cardíaca. Nos testes comportamentais, o tratamento de 90 dias com o formoterol induziu aumento da força muscular, atenuação e melhora da coordenação motora dos camundongos VACHT-KD^{HOM}. A melhora do fenótipo motor dos animais VACHT-KD^{HOM} com o tratamento poderia ser resultante de alterações estruturais no plano das JNMs e das fibras musculares esqueléticas, dessa forma, realizamos experimentos a fim de avaliar esses componentes nos músculos EDL e sóleo. Esses dois músculos foram selecionados para o estudo por exibirem diferentes características metabólicas, bioquímicas e funcionais (Schiaffino; Reggiani, 2011). O músculo EDL é majoritariamente composto por fibras glicolíticas tipo IIX e IIB e é recrutado durante atividades de alta intensidade (Bloemberg; Quadrilatero, 2012). Em contrapartida, o músculo sóleo tem predominância de fibras oxidativas tipo I e IIA e é descrito como um músculo postural e, dessa forma, é mais resistente à fadiga muscular (Di Giulio et al., 2009).

Ao avaliarmos a área das terminações sinápticas do músculo EDL, constatamos que o tratamento de 90 dias com formoterol induziu o aumento das áreas das pré e pós-sinápticas dos camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR em comparação aos seus respectivos grupos controle, WT SAL e VACHT-KD^{HOM} SAL, e causou um maior índice de colocação das terminações dos animais VACHT-KD^{HOM} FOR em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} SAL. Nas análises do músculo sóleo, notamos que somente a área da placa motora estava aumentada nos camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR em comparação ao seu grupo veículo VACHT-KD^{HOM} SAL. Nossos achados corroboram outros estudos que demonstraram uma relação entre o aumento da área das JNMs com a atenuação e melhora do fenótipo miastênico em camundongos modelos para outros quadros miastênicos (McMacken et al., 2019; Spendiff et al., 2020; Webster et al., 2020; Beeson, 2023). Similarmente ao observado neste trabalho, McMacken et al. (2019) mostraram que o tratamento utilizando o salbutamol, outro agonista β 2-adrenérgico, promove o aumento da área sináptica e também induz o aumento do grau de colocação das terminações sinápticas, sendo que a melhora de ambos os parâmetros refletiu no incremento da função motora em um modelo murino para SMC associada à lâmina basal sináptica. A respeito do mecanismo de ação pelo qual os agonistas β 2-adrenérgicos modulam as sinapses neuromusculares, Rodrigues et al. (2019) demonstraram que a simpatectomia induz a maior endocitose de receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChRs), acompanhada da ativação da via autofágica Hdac4-miogenina-MuRF1-miR-206, responsável pela degradação de nAChRs. Por outro lado, a estimulação de receptores β 2-adrenérgicos na placa motora por catecolaminas endógenas ou por simpatomiméticos induz a inibição da via autofágica e promove a maior densidade, aglomeração e estabilidade de nAChRs através da ativação da via de sinalização cAMP/PKA, que é fundamental para a manutenção das JNMs (Rodrigues et al., 2019; Straka et al., 2021; Rudolf; Kettelhut; Navegantes, 2024). Ademais, a utilização de agonistas β 2 aumenta a expressão de calpastatina, uma proteína endógena que inibe a calpaína, uma protease dependente de cálcio que induz a dispersão e fragmentação de nAChRs (Groshong et al., 2007). Com isso, a expressão de calpastatina eventualmente pode estar associada à modulação positiva das JNMs (Chen et al., 2007; Machado et al., 2019). Acerca da terminação pré-sináptica, os efeitos da ativação de receptores β 2-adrenérgicos foram pouco elucidados. No entanto, já se é sabido que a estimulação de adrenoreceptores β 2 por meio do acoplamento à proteína Gs induz a elevação de cAMP/PKA através da produção da adenilato ciclase, resultando na fosforilação de proteínas pré-sinápticas e canais para Ca^{++} dependentes de voltagem envolvidos na liberação das vesículas sinápticas (Polishchuk et al., 2024). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que o formoterol induz a mobilização

e exocitose de vesículas sinápticas em preparações neuromusculares *ex vivo*, e este evento exocítico é dependente de canais para Ca^{++} dependentes de voltagem do tipo P/Q e TRPV1 localizados na terminação axonal (Santos et al., 2025). Juntos, nossos dados corroboram essas observações e indicam que o formoterol a longo prazo é capaz de modular de maneira positiva as estruturas das JNMs no nosso modelo murino para SMC pré-sináptica VACHT-KD^{HOM}. O fato de observarmos o aumento das áreas pré e pós-sinápticas das JNMs no músculo EDL e o aumento somente da área pós-sináptica no músculo sóleo pode ser em decorrência da maior responsividade de músculos glicolíticos à ação de agonistas β 2-adrenérgicos (Lynch; Ryall, 2008), e/ou por algum mecanismo ainda não esclarecido. No entanto, ainda é necessário investigar os mecanismos funcionais e as vias intracelulares pelas quais o agonista β 2-adrenérgico induz a melhora na morfologia das JNMs dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

Nosso próximo passo foi investigar os efeitos do tratamento de 90 dias com o formoterol nas fibras musculares nos animais tratados. O conhecimento acerca dos efeitos hipertróficos de agonistas β 2-adrenérgicos na musculatura esquelética já foi bem descrito na literatura (Kim; Sainz, 1992; Hinkle et al., 2002). Inicialmente, realizamos os experimentos no EDL e nossos resultados demonstraram que os animais selvagens tratados com o formoterol apresentaram hipertrofia da área muscular. Dados publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o músculo EDL é atrofiado nos animais VACHT-KD^{HOM} (Magalhães-Gomes et al., 2018). Porém, nossos resultados indicam que o tratamento com o simpatomimético foi capaz de reverter o processo atrofico nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, no qual observamos que a área de secção transversal do EDL se assemelha à área muscular dos animais selvagens veículos. No músculo sóleo, o tratamento a longo prazo com o formoterol induziu efeitos distintos nos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} em comparação aos respectivos grupos controle, WT SAL e VACHT-KD^{HOM} SAL. Nos camundongos selvagens, a administração do agonista β 2 induziu hipertrofia na área muscular em comparação aos animais WT SAL, enquanto nos camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR observamos a atrofia da área do músculo em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} não tratados. No entanto, previamente, nosso grupo de pesquisa observou que por meio de um mecanismo de hipertrofia compensatória à atrofia do músculo gastrocnêmio, o músculo oxidativo sóleo tem a área muscular hipertrofiada nos camundongos miastênicos (Magalhães-Gomes et al., 2018). Em nosso estudo, observamos que a área muscular do sóleo dos animais VACHT-KD^{HOM} SAL é aumentada em relação aos camundongos WT SAL, mas observamos também que a área muscular do mesmo músculo foi maior nos camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR em comparação aos animais WT não tratados. Acerca destes dados, não podemos descartar a

hipótese de que o processo hipertrófico observado nos camundongos VACHT-KD^{HOM} FOR se difere da hipertrofia compensatória dos animais miastênicos descrita por Magalhães Gomes et al. (2018). Com isso, o aumento da área de secção transversal do músculo sóleo dos camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR pode ser resultante de processos pró-anabólicos e anti-proteolíticos do formoterol a longo prazo (Lynch; Ryall, 2008). Ademais, apesar de músculos oxidativos serem menos responsivos em relação aos músculos glicolíticos a ativação de receptores β 2-adrenérgicos, achados na literatura mostram que a administração de simpatomiméticos também induz a hipertrofia no sóleo em roedores (Ryall et al., 2002; Cairns; Borrani, 2015). Desse modo, a administração a longo prazo do formoterol tem ação hipertrófica nos camundongos WT e tem efeitos positivos na reversão das alterações musculares observadas nos camundongos miastênicos.

Na sequência, analisamos a área de secção transversal, separando as fibras musculares de acordo com a expressão das diferentes isoformas da MyHC nos animais WT e VACHT-KD^{HOM} tratados ou não com o formoterol. O tratamento de 90 dias com o simpatomimético induziu a atrofia da fibra tipo IIX e hipertrofia da fibra tipo IIB no músculo EDL em ambos os genótipos. No músculo sóleo, a administração do formoterol promoveu a hipertrofia de todos os tipos de fibras musculares nos camundongos WT FOR, enquanto nos camundongos miastênicos, o tratamento induziu a atrofia da fibra tipo IIA e hipertrofia da fibra tipo IIB. Esse resultado observado no sóleo dos animais miastênicos sugere que o formoterol reverte a hipertrofia da fibra tipo IIA nos camundongos VACHT-KD^{HOM} (Magalhães-Gomes et al., 2018) e ainda induz a produção de fibras glicolíticas tipo IIB. Os efeitos hipertróficos das fibras glicolíticas observadas no EDL e sóleo dos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} podem ser decorrentes da ativação de vias anabólicas e inibição de vias catabólicas desencadeadas pela estimulação dos receptores β 2-adrenérgicos provocadas pelo formoterol, o qual já foi mostrado que os tipos de fibras de contração rápida são mais responsivos às ações de agonistas β 2 (Zeman et al., 1988; Lynch; Ryall, 2008). O mecanismo de ação dessas vias pró-anabólicas e anti-proteolíticas ocorre através da estimulação da proteína Gas acoplada ao adrenoceptor- β 2, que induz a ativação intracelular da adenilato ciclase que por sua vez aumenta a via cAMP-PKA-CREB e estimula a cascata de sinalização PI3K-Akt-mTORC1 (Baviera et al., 2010; Joassard et al., 2013; Gonçalves et al., 2019). Ambas as vias estão intimamente associadas ao aumento da síntese proteica e da expressão dos genes musculares MyoD e Mef2, além de suprimir vias proteolíticas através da inibição dos reguladores transcricionais FoxO e miostatina, que ativam cascatas de sinalização dos atrogenes MuRF1 e MAFbx/atrogina-1 (Stitt et al., 2004; Berdeaux et al., 2007; Gonçalves et al., 2012; Schiaffino

et al., 2021). Além disso, a estimulação da subunidade $G_{\alpha i}$ acoplada aos adrenoreceptores- β_2 também ativa vias anabólicas a partir da sinalização de mTORC1 via PKC (proteína quinase C) e suprime a expressão de reguladores atrofícos, como Hdac4, FoxO e Smad2/3, que induzem a proteólise das fibras musculares mediada por vias de ubiquitina-proteossomo e autofagia-lisossomo (Minetti et al., 2011; Bonaldo; Sandri, 2013; Wang; Pessin, 2013; Egerman; Glass, 2014). Para os efeitos hipertróficos observados nas fibras oxidativas no sóleo dos animais WT FOR, há artigos que demonstram que fibras oxidativas também são suscetíveis à hipertrofia decorrente da ativação de adrenoreceptores- β_2 por vias de sinalização semelhante às fibras glicolíticas, mesmo que de forma menos pronunciada em relação às fibras de contração rápida (Maltin; Delday; Reeds, 1986; Cairns; Dulhunty, 1993). Ainda é válido acrescentar que a administração de agonista β_2 -adrenérgico induz a expressão de PGC-1 α , fator requerido para a biogênese mitocondrial e manutenção de fibras oxidativas, contribuindo para a hipertrofia deste tipo de fibra (Lin et al., 2002; Sato et al., 2011; Joassard et al., 2013; Berdeaux; Hutchins, 2019; Schaffino et al., 2021). Dessa forma, dado que a ativação da subunidade estimulatória (G_s) e da subunidade inibitória (G_i) acopladas aos receptores β_2 -adrenérgicos regulam as vias de hipertrofia e atrofia muscular, os mecanismos de sinalização destas vias poderiam estar modificados nos camundongos WT e VACHT-KD^{HOM} tratados com o formoterol, resultando em processos hipertróficos nos diferentes tipos de fibras musculares.

Em relação à expressão de cada isoforma da MyHC no EDL, observamos a redução da frequência das isoformas do tipo I, IIA e IIX, mas aumento de expressão da fibra glicolítica tipo IIB nos animais WT FOR. De modo interessante, nos animais VACHT-KD^{HOM} FOR, também houve a redução da fibra tipo IIA, mas sem aumento significativo da expressão das isoformas da MyHC com características glicolíticas (fibras tipo IIX e IIB). Nossa hipótese é que a redução da fibra tipo IIA foi distribuída entre as fibras tipo IIX e IIB, uma vez que nossos resultados mostram o aumento parcial da expressão dessas fibras nos animais VACHT-KD^{HOM} tratados com o formoterol em relação aos animais VACHT-KD^{HOM} salina. No músculo sóleo, em que há predominância de fibras oxidativas (Schiaffino; Reggiani, 2011), o formoterol induziu a conversão de fibras oxidativas em fibras glicolíticas. Isso é evidenciado pelo aumento da expressão das fibras tipo IIX e IIB em ambos os genótipos tratados, WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR. Essa plasticidade das fibras musculares para o perfil glicolítico em ambos os músculos pode ser resultante da estimulação das cascatas anabólicas citadas anteriormente, somada à via de sinalização ERK1/2 ativada por $G_{\alpha i}$ e $G_{\beta\gamma}$ dos receptores β_2 -adrenérgicos (Xiao, 2001; Gosmanov; Wong; Thomason, 2002; Shi et al., 2007; Carriere et al.,

2011; Schiafino et al., 2021). Essas vias promovem a ativação do fator de transcrição MyoD, que está associado à conversão de fibras oxidativas em fibras glicolíticas (Maves et al., 2007; Meissner et al., 2007; Talbot; Maves, 2016). Outro fator que contribui para a plasticidade das fibras musculares em virtude da administração de agonistas $\beta 2$ é a supressão da via FoxO-miostatina/MuRF1 pelo aumento da expressão de PGC-1 α , a qual é estimulada pela via cAMP-PKA-CREB (Silveira et al., 2020). A expressão de PGC-1 α impede que as vias catabólicas sejam expressas (Sandri et al., 2006; Bonaldo; Sandri, 2013). Ainda, tanto a miostatina quanto a MuRF1 são mais abundantes em fibras glicolíticas, e é sabido que a interação da miostatina junto ao seu receptor de activina tipo IIB (ActRIIB) resulta na proteólise de fibras glicolíticas (Hennebry et al., 2009; Wang; Pessin, 2013; Han et al., 2019). Com isso, a inibição de MuRF1 e do complexo miostatina/ActRIIB permite que haja a maior manutenção das fibras glicolíticas em relação às fibras oxidativas. Portanto, estes dados da literatura levantam a hipótese das possíveis alterações moleculares que ocorreram nas fibras musculares dos animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR e resultaram na mudança para o perfil metabólico mais glicolítico.

Em resumo, a administração por 90 dias do agonista $\beta 2$ -adrenérgico formoterol induz o ganho de massa corporal e muscular, promove o aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas no músculo EDL dos camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR, e induz o aumento da área da placa motora no músculo sóleo dos animais VACHT-KD^{HOM} FOR. O tratamento com o simpatomimético a longo prazo induz a hipertrofia das isoformas da MyHC glicolíticas, além de promover a plasticidade das fibras musculares, convertendo-as em fibras glicolíticas nos camundongos WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR. Dessa forma, o ganho de massa muscular, o aumento das áreas sinápticas das JNMs, somado à mudança de perfil metabólico dos músculos EDL e sóleo, tem relação com o aumento da força muscular e do desempenho motor nos testes comportamentais realizados dos animais WT FOR e VACHT-KD^{HOM} FOR. Assim, nossos resultados levantam a hipótese de que o tratamento de 90 dias com o formoterol altera os mecanismos de liberação das vesículas sinápticas e de estabilização de nAChRs e, também, modifica as cascatas de sinalização intracelular relacionadas a eventos de anabolismo e catabolismo muscular, além de alterar as vias associadas com a plasticidade das fibras musculares esqueléticas. Com isso, o formoterol emerge como um potencial fármaco para o tratamento das SMC pré-sinápticas. No entanto, para confirmar nossa hipótese, é preciso realizar estudos funcionais e análises moleculares nas JNMs e nos músculos a fim de quantificar a expressão das proteínas e fatores de transcrição associados às vias de sinalização.

5.3 Tratamento combinado do anticolinesterásico piridostigmina com o agonista β 2-adrenérgico formoterol induz melhora comportamental, sináptica e muscular dos camundongos VACHT-KD^{HOM}.

A terapia farmacológica com os inibidores da AChE (anticolinesterásicos) perdura por muitos anos como a primeira opção para o tratamento das SMCs. Dentre os anticolinesterásicos, destaca-se a piridostigmina, um carbamato reversível contendo um grupo amônio quaternário, que prolonga a presença de ACh nas JNMs, aumentando a probabilidade do neurotransmissor se ligar ao nAChR e atingir o limiar de despolarização para geração de um potencial de ação muscular (Engel; Lambert; Santa, 1973). Na maioria dos casos, o anticolinesterásico induz a melhora das disfunções motoras e musculares em pacientes e modelos murinos para SMCs (Beeson, 2023). Contudo, há estudos que mostram que, a longo prazo, os anticolinesterásicos podem causar a dessensibilização dos nAChRs, reduzindo a eficácia do tratamento e ocasionando disfunções da neurotransmissão colinérgica e, por consequência, déficits motores para alguns quadros de SMC pós-sináptica e SMC associada à lâmina basal sináptica (Engel; Lambert; Santa, 1973; Gwilt; Wray, 1986; Richtsfeld; Blobner, 2013; Ramdas; Beeson, 2021; Beeson, 2023). Ainda, a administração do fármaco na clínica teve efeitos moderados nas debilitações motoras apresentadas pelos pacientes diagnosticados com SMC de origem pré-sináptica (O'Grady et al., 2016; Schwartz et al., 2018; Lamond et al., 2021; Della Marina et al., 2021; Ohno et al., 2025). Para o modelo murino VACHT-KD^{HOM}, o tratamento com a piridostigmina sozinha reverteu apenas parcialmente as disfunções motoras e as alterações das fibras musculares (Magalhães-Gomes et al., 2018). Sendo assim, a administração de anticolinesterásicos para o tratamento de SMC de origem pré-sináptica não aparenta ser eficaz em reverter os sinais clínicos apresentados pelos pacientes e modelo murino.

Diante do fato dessa classe farmacológica não apresentar efetividade para alguns quadros miastênicos (Ramsas; Beeson, 2021), novas estratégias farmacológicas foram investigadas com o objetivo de atenuar os efeitos indesejáveis da piridostigmina. Assim, o tratamento utilizando agonistas β 2-adrenérgicos emergiu como alternativa ao uso do anticolinesterásico para as SMCs (Bartus et al., 2016; McMacken et al., 2019). Vanhaesebrouck et al. (2019) demonstraram em seu estudo que a adição do agonista β 2-adrenérgico salbutamol no esquema terapêutico reverteu os efeitos adversos da piridostigmina e ainda promoveu uma melhora motora em pacientes humanos e a melhora funcional e

estrutural das JNMs em um modelo murino com SMC de origem pós-sináptica. Portanto, objetivamos investigar os efeitos da administração conjugada do anticolinesterásico piridostigmina com o agonista β 2-adrenérgico formoterol durante 30 dias no nosso modelo VACHT-KD^{HOM}.

Inicialmente, assim como nos outros esquemas farmacológicos testados neste estudo, observamos que o tratamento combinado promoveu o aumento da massa corporal em ambos os genótipos tratados, WT PF e VACHT-KD^{HOM} PF. Nos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF, houve o ganho de massa muscular do EDL. Em contrapartida, para os animais WT, o tratamento induziu a perda da massa muscular neste mesmo músculo. Em seguida, nossos resultados demonstraram que o tratamento combinado resultou na melhora do fenótipo motor nos camundongos VACHT-KD^{HOM} que, nos testes comportamentais realizados pós-tratamento, estes animais exibiram maior força muscular e coordenação motora. Estes achados são semelhantes aos dados de Vanhaesebrouck et al. (2019), nos quais observaram que o tratamento combinado do anticolinesterásico com o agonista β 2 induziu a melhora motora nos pacientes e camundongos com SMC pós-sináptica. Por outro lado, nos testes comportamentais, os animais WT PF não apresentaram melhora em comparação ao seu grupo controle, inclusive, os animais selvagens tiveram redução parcial de desempenho no teste grade invertida. Dessa forma, a perda de massa muscular do EDL e a parcial piora no teste comportamental grade invertida dos animais WT tratados poderia estar relacionada com os efeitos adversos resultantes da administração da piridostigmina nas sinapses neuromusculares e, de modo indireto, nas fibras musculares esqueléticas, com o formoterol não sendo capaz de impedir estas implicações. Por outro lado, a utilização do anticolinesterásico junto ao agonista β 2-adrenérgico se mostrou fundamental para a atenuação motora e aumento da força muscular no modelo VACHT-KD^{HOM}. Visto estas alterações nos grupos experimentais, nossos próximos experimentos investigaram a estrutura morfológica das JNMs e das fibras musculares nos músculos EDL e sóleo, uma vez que há uma relação das alterações comportamentais com o remodelamento desses dois componentes.

Nas análises de estrutura das JNMs vimos que os camundongos WT PF apresentaram redução do índice de colocalização das terminações sinápticas dos músculos EDL e sóleo. A perda de colocalização das terminações nestes músculos observada nos animais WT PF é explicada pela dessensibilização dos nAChRs na placa motora em decorrência da administração da piridostigmina. Sabe-se que o uso prolongado de anticolinesterásico resulta em degeneração, disfunção funcional e estrutural nas JNMs em um contexto neuromuscular saudável (Engel; Lambert; Santa, 1973; Gwilt; Wray, 1986; Morsch et al., 2013; Richtsfeld;

Blobner, 2013). Sugita et al. (2016) demonstraram, em um modelo que superexpressa a proteína VAcHT, que o aumento da exocitose da ACh na fenda sináptica resulta em defeitos estruturais nas JNMs e na maior incidência de fragmentação e dispersão de nAChRs na placa motora. Ainda, um outro estudo demonstrou que a superregulação de nAChRs decorrente do uso de anticolinesterásicos em condições homeostáticas induz a troca da subunidade γ pela subunidade imatura ϵ dos nAChRs (Naguib et al., 2002). A ativação da subunidade ϵ causa um aumento de influxo de íons Ca^{++} no citoplasma subsináptico. A elevada concentração de íons Ca^{++} resulta em processos degenerativos na placa motora e nas fibras musculares esqueléticas (Leonard; Salpeter, 1979; Cash et al., 1996). Estes dados corroboram os nossos achados, nos quais a utilização da piridostigmina nos animais WT e consequente aumento de ACh na fenda sináptica causam a redução do grau de colocalização das terminações sinápticas. Dessa forma, a estimulação dos adrenoceptores- $\beta 2$ na placa motora pelo formoterol aparentou não ser o suficiente para suprimir os efeitos deletérios do anticolinesterásico no plano das JNMs. Para os animais VAcHT-KD^{HOM}, o tratamento combinado induziu um aumento significativo das áreas da terminação axonal e da placa motora somente no músculo EDL, sem afetar o tamanho estrutural das JNMs do sóleo. Semelhante aos nossos dados, Vanhaesebrouck et al. (2019) observaram que a combinação do anticolinesterásico com agonista $\beta 2$ -adrenérgico induz a melhora estrutural das JNMs em um modelo murino para SMC pós-sináptica. Como mencionado no tratamento de 90 dias com o formoterol, estudos descreveram que a ativação de adrenoceptores- $\beta 2$ promove maior exocitose das vesículas sinápticas na terminação axonal e induz a aglomeração e estabilidade de nAChRs na placa motora (Rodrigues et al., 2019; Santos et al., 2025). Assim, estes eventos podem contribuir para o aumento da área das terminações pré e pós-sinápticas, como observado nos camundongos VAcHT-KD^{HOM} PF. Em relação ao aumento da área sináptica somente no músculo EDL dos camundongos VAcHT-KD^{HOM}, este fenômeno pode estar relacionado com a maior responsividade de músculos glicolíticos aos efeitos de agonistas $\beta 2$ -adrenérgicos (Lynch; Ryall, 2018). Ademais, há uma relação direta da quantidade de AChE na lâmina basal sináptica com a alta atividade muscular, como é o caso de músculos glicolíticos (Brockman; Younkin; Younkin, 1984; Rossi; Vazquez; Rotundo, 2000). Sendo assim, estudos demonstraram que a inibição dessa enzima pela piridostigmina resultou na maior atividade da neurotransmissão colinérgica no músculo glicolítico (Lintern; Smith; Ferry, 1997; Naguib et al., 2002). Dessa forma, nossos resultados acerca das estruturas das JNMs indicam que no modelo murino VAcHT-KD^{HOM}, que apresenta déficits colinérgicos, o aumento da disponibilidade de ACh na fenda sináptica mediante a utilização da piridostigmina soma-se

aos efeitos do formoterol na terminação axonal e na placa motora, resultando no aumento da área sináptica dos camundongos miastênicos.

Posteriormente, nas análises das fibras musculares do EDL e sóleo, o tratamento combinado induziu uma redução da área muscular do EDL nos animais WT PF, sem alterar a área de secção transversal do sóleo nestes animais em comparação aos camundongos WT SAL. Essa atrofia observada nos camundongos WT tratados tem forte relação com as alterações observadas nas JNMs destes animais, dado que as características musculares são influenciadas pela atividade do neurotransmissor ACh nas sinapses neuromusculares (Reid; Slater; Bewick, 1999; Naguib et al., 2002; Schiaffino; Reggiani, 2011; Ehmsen; Höke, 2020). Nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, o tratamento induziu o aumento da área muscular de ambos os músculos em relação ao seu grupo controle, VACHT-KD^{HOM} SAL. Aqui, o efeito hipertrófico parcial promovido pelo anticolinesterásico, demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa anteriormente (Magalhães-Gomes et al., 2018), foi amplificado pela adição do formoterol no esquema terapêutico, uma vez que agonistas β_2 têm ações anabólicas e anticatabólicas e, assim, promovem hipertrofia muscular (Kim; Sainz, 1992; Hinkle et al., 2002).

Para as análises da área de secção transversal de cada isoforma da MyHC, os camundongos WT PF apresentaram hipertrofia da fibra oxidativa tipo I e da fibra tipo IIX, mas atrofia da fibra tipo IIA no músculo EDL. Por outro lado, no mesmo músculo, o tratamento combinado induziu a hipertrofia de todas as fibras quantificadas nos animais VACHT-KD^{HOM} PF (tipos IIA, IIX e IIB). No músculo sóleo, a estratégia farmacológica nos animais WT tratados induziu a hipertrofia da fibra tipo I e atrofia da fibra tipo IIX, enquanto nos camundongos VACHT-KD^{HOM} houve a hipertrofia das fibras tipo IIA e IIX. Estes dados indicam que a ação hipertrófica do agonista β_2 -adrenérgico nas isoformas da MyHC observadas no tratamento de 90 dias com o formoterol é suprimida pela adição da piridostigmina nos camundongos WT, ou seja, a dessensibilização de nAChRs resultante do aumento de ACh causa alterações importantes nas cascatas de sinalização mediada pelos adrenoceptores- β_2 , responsáveis pela ativação de vias que promovem a hipertrofia muscular e vias que inibem a proteólise muscular. Porém, análises moleculares que regulam estas sinalizações devem ser realizadas para verificar estas possíveis alterações nos animais WT. Em contrapartida, semelhante ao tratamento de 90 dias com formoterol, a estratégia farmacológica resultou em efeitos hipertróficos nas fibras do tipo II nos músculos EDL e sóleo dos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF. Nota-se que o efeito hipertrófico nesse esquema terapêutico foi ainda mais acentuado do que a administração a longo prazo somente com o

agonista β 2-adrenérgico formoterol. Dessa forma, nossos dados sugerem que o aumento da disponibilidade de ACh nas JNMs a partir da administração da piridostigmina no modelo murino que apresenta déficit pré-sináptico, VACHT-KD^{HOM}, está associado à maior ativação das cascatas de sinalização hipertróficas e anti-atróficas nas fibras musculares esqueléticas de contração rápida induzidas pelo formoterol, conforme mencionado no tópico do tratamento de 90 dias com o formoterol (Bonaldo; Sandri, 2013; Joassard et al., 2013; Wang; Pessin, 2013; Gonçalves et al., 2019).

A respeito da expressão das diferentes isoformas da MyHC, nos camundongos WT, o tratamento conjugado não causou diferenças no padrão de expressão de fibras no músculo EDL, mas reduziu a expressão da fibra oxidativa tipo I no músculo sóleo. Estas observações nos animais WT PF sugerem, mais uma vez, que a desregulação de nAChRs na placa motora a partir do uso da piridostigmina afeta as cascatas de sinalização que controlam a manutenção das fibras musculares esqueléticas. É válido mencionar que a duração do tratamento combinado foi de 30 dias, portanto, menor em relação ao tratamento de 90 dias com o formoterol, no qual foi demonstrado que o simpatomimético induziu a conversão das fibras oxidativas em fibras glicolíticas. Outro estudo também observou que a administração do agonista β 2-adrenérgico formoterol por 30 dias não foi capaz de induzir a transição dos tipos de fibras (Gonçalves et al., 2019). Nos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF, a estratégia farmacológica promoveu a redução da expressão da fibra tipo IIX e o aumento da fibra tipo IIB no músculo EDL. Estes dados indicam que, nos animais miastênicos, os efeitos do formoterol na plasticidade das fibras musculares são potencializados junto à administração da piridostigmina no músculo EDL. Como mencionado no tratamento de 90 dias com o formoterol, a estimulação do receptor β 2-adrenérgico através do uso de agonista β 2 é responsável por ativar cascatas de sinalização que ativam proteínas e fatores de transcrição envolvidos na hipertrofia e plasticidade muscular, além de suprimir vias catabólicas. Estas vias estão relacionadas com a conversão de fibras oxidativas a fibras glicolíticas (Maves et al., 2007; Meissner et al., 2007; Wang; Pessin, 2013; Talbot; Maves, 2016; Schiafino et al., 2021). No músculo sóleo, não houve alterações na expressão das isoformas da MyHC dos animais VACHT-KD^{HOM} PF. A ausência da plasticidade no sóleo, mais uma vez, pode ser explicada pela maior responsividade de músculos glicolíticos à administração de agonista β 2-adrenérgico (Lynch; Ryall, 2008) e, também, pela duração do tratamento de 30 dias, o qual aparenta não ser o suficiente para induzir a conversão das fibras musculares para um perfil glicolítico no músculo oxidativo sóleo. Possivelmente, realizar a mesma estratégia

farmacológica combinando a piridostigmina com o formoterol a longo prazo, resulte na plasticidade das fibras musculares no músculo sóleo.

Em síntese, nossos achados demonstram que o tratamento combinado de 30 dias de piridostigmina com formoterol promove o ganho de massa corporal e massa muscular no EDL dos animais miastênicos. O tratamento induz também o aumento da área sináptica no músculo EDL dos camundongos VACHT-KD^{HOM}, enquanto nos animais WT induz a perda de colocação das terminações sinápticas nos músculos EDL e sóleo. O esquema terapêutico testado causa um aumento da área muscular de ambos os músculos e induz a hipertrofia das isoformas tipo II nos camundongos VACHT-KD^{HOM} PF. Em contrapartida, para os animais WT, o tratamento causa a atrofia da área muscular do EDL. Ademais, o tratamento combinado promove a plasticidade das fibras musculares no EDL nos animais VACHT-KD^{HOM}, convertendo as fibras para um perfil ainda mais glicolítico. Estas alterações estruturais nas JNMs e nas fibras musculares esqueléticas, aliadas ao ganho de massa muscular no músculo EDL, refletiram na performance dos camundongos nos testes comportamentais motores realizados, em que foi observada a melhora motora dos animais VACHT-KD^{HOM} PF. Por fim, as alterações estruturais das JNMs e das fibras musculares nos camundongos WT tratados resultaram na perda de massa muscular e na parcial piora de desempenho no teste comportamental grade invertida. Portanto, a estratégia farmacológica combinando o anticolinesterásico piridostigmina com o agonista β 2-adrenérgico formoterol emerge como um potencial tratamento das SMC que apresentam uma variante patogênica no gene que codifica a proteína VACHT e, também, para as demais SMCs oriundas de disfunções em outras proteínas pré-sinápticas.

6. CONCLUSÃO

Este estudo apresentou novos esquemas farmacológicos para o tratamento das SMCs pré-sinápticas, sendo o pioneiro em investigar as diferentes estratégias terapêuticas em um modelo murino que mimetiza uma SMC de origem pré-sináptica. Demonstramos que o tratamento com o agonista β 2-adrenérgico formoterol sozinho por 30 dias não causou alterações das disfunções motoras dos camundongos VACHT-KD^{HOM}, no entanto, a extensão do tratamento para 90 dias com o simpatomimético promoveu a atenuação e a melhora motora nestes animais. A melhora do fenótipo miastênico foi resultante do ganho de massa muscular do EDL e das alterações nas estruturas celulares das JNMs e fibras musculares esqueléticas. O fármaco induziu o aumento das áreas da terminação axonal e da placa motora do músculo EDL e promoveu somente o aumento da área da terminação pós-sináptica do músculo sóleo. Ainda, o tratamento a longo prazo com o formoterol induziu a hipertrofia da fibra tipo IIB nos músculos EDL e sóleo, além de provocar a conversão de fibras oxidativas para fibras glicolíticas no músculo sóleo dos animais VACHT-KD^{HOM}. Acerca do tratamento combinado do anticolinesterásico piridostigmina com o agonista β 2-adrenérgico formoterol, nossos experimentos mostraram que a estratégia farmacológica induziu o ganho de massa muscular, a melhora da coordenação e a maior força muscular nos camundongos VACHT-KD^{HOM}. Em contrapartida, nos animais WT, a intervenção farmacológica resultou na piora parcial da resistência motora, na perda de colocalização das terminações sinápticas dos músculos EDL e sóleo e na atrofia muscular no músculo EDL. Nos camundongos VACHT-KD^{HOM}, o tratamento combinado aumentou as áreas das terminações pré e pós-sinápticas no músculo EDL, promoveu o aumento da área muscular de ambos os músculos e induziu a hipertrofia das isoformas da MyHC tipo IIA, IIX e IIB no EDL. Ademais, para os animais VACHT-KD^{HOM}, o esquema farmacológico induziu a plasticidade das fibras musculares para o perfil ainda mais glicolítico nos músculos EDL e sóleo. Portanto, este trabalho demonstra que o tratamento de 90 dias com o formoterol e o tratamento combinado da piridostigmina com formoterol são capazes de melhorar os sintomas motores em um modelo murino que mimetiza uma SMC pré-sináptica e, assim, emergem como potenciais estratégias terapêuticas para o tratamento das SMCs com deficiências em proteínas pré-sinápticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E. X. *et al.* The density of acetylcholine receptors and their sensitivity in the postsynaptic membrane of muscle endplates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 7, p. 2818–2822, jul. 1974.
- ALBUQUERQUE, Edson X. *et al.* Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 73–120, jan. 2009.
- AMADOR, Fernando J. *et al.* Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies. **The FEBS journal**, v. 280, n. 21, p. 5456–5470, nov. 2013.
- ANDERSON, Gp; LINDEN, A.; RABE, Kf. Why are long-acting beta-adrenoceptor agonists long-acting? **European Respiratory Journal**, v. 7, n. 3, p. 569–578, 1 mar. 1994.
- AQUILONIUS, S.-M.; HARTVIG, P. Clinical Pharmacokinetics of Cholinesterase Inhibitors. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 11, n. 3, p. 236–249, 1 set. 1986.
- ARAN, A. *et al.* Vesicular acetylcholine transporter defect underlies devastating congenital myasthenia syndrome. **Neurology**, v. 88, n. 11, p. 1021–1028, 14 mar. 2017.
- BAI, Tony R. Beta2 adrenergic receptors in asthma: A current perspective. **Lung**, v. 170, n. 3, p. 125–141, 1 maio 1992.
- BARTUS, R. T. *et al.* β 2-Adrenoceptor agonists as novel, safe and potentially effective therapies for Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Neurobiology of Disease**, v. 85, p. 11–24, 1 jan. 2016.
- BAVIERA, Amanda Martins *et al.* Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, n. 1, p. 104–112, 5 fev. 2010.
- BEESON, D. Congenital myasthenic syndromes: beta adrenergic receptor agonist treatment. **RRNMF Neuromuscular Journal**, v. 4, n. 3, 29 ago. 2023.
- BEHNKE, Brad J. *et al.* Oxygen exchange profile in rat muscles of contrasting fibre types. **The Journal of Physiology**, v. 549, n. Pt 2, p. 597–605, 1 jun. 2003.
- BEITZEL, F. *et al.* β 2-Adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 4, p. 1385–1392, abr. 2004.
- BERDEAUX, Rebecca *et al.* SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. **Nature Medicine**, v. 13, n. 5, p. 597–603, maio 2007.
- BESTUE-CARDIEL, M. *et al.* Congenital endplate acetylcholinesterase deficiency responsive to ephedrine. **Neurology**, v. 65, n. 1, p. 144–146, 12 jul. 2005.

BLAIS, Alexandre *et al.* An initial blueprint for myogenic differentiation. **Genes & Development**, v. 19, n. 5, p. 553–569, 1 mar. 2005.

BLOEMBERG, Darin; QUADRILATERO, Joe. Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35273, 18 abr. 2012.

BODINE, Sue C.; BAEHR, Leslie M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 6, p. E469–E484, 15 set. 2014.

BONALDO, Paolo; SANDRI, Marco. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 1 jan. 2013.

BRITTAIN, R. T. Approaches to a long-acting, selective beta 2-adrenoceptor stimulant. **Lung**, v. 168 Suppl, p. 111–114, 1990.

BROCKMAN, S. K.; YOUNKIN, L. H.; YOUNKIN, S. G. The effect of spontaneous electromechanical activity on the metabolism of acetylcholinesterase in cultured embryonic rat myotubes. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 131–140, jan. 1984.

BUCKINGHAM, Margaret. Skeletal muscle formation in vertebrates. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 11, n. 4, p. 440–448, 1 ago. 2001.

BURKE, G. et al. Salbutamol benefits children with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. **Neuromuscular Disorders**, v. 23, n. 2, p. 170–175, 1 fev. 2013.

CAIRNS, Simeon P.; BORRANI, Fabio. β -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: key role of excitation–contraction coupling. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 21, p. 4713–4727, nov. 2015.

CAIRNS, S. P.; DULHUNTY, A. F. The effects of beta-adrenoceptor activation on contraction in isolated fast- and slow-twitch skeletal muscle fibres of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1133–1141, nov. 1993.

CALABRÒ, Sonia *et al.* Salbutamol repurposing ameliorates neuromuscular junction defects and muscle atrophy in Col6a1^{−/−} mouse model of collagen VI-related myopathies. **Clinical and Translational Medicine**, v. 14, n. 7, p. e1688, 10 jul. 2024.

CARRIERE, Audrey *et al.* ERK1/2 Phosphorylate Raptor to Promote Ras-dependent Activation of mTOR Complex 1 (mTORC1). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 567–577, 7 jan. 2011.

CARTER, W. J.; LYNCH, M. E. Comparison of the effects of salbutamol and clenbuterol on skeletal muscle mass and carcass composition in senescent rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 43, n. 9, p. 1119–1125, set. 1994.

CASH, Sydney *et al.* Postsynaptic Elevation of Calcium Induces Persistent Depression of Developing Neuromuscular Synapses. **Neuron**, v. 16, n. 4, p. 745–754, 1 abr. 1996.

CECCARELLI, B.; HURLBUT, W. P.; MAURO, A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. **The Journal of Cell Biology**, v. 57, n. 2, p. 499–524, maio 1973.

CHANADAY, Natali L. *et al.* The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 42, p. 8209–8216, 16 out. 2019.

CHEN, F. *et al.* Rapsyn Interaction with Calpain Stabilizes AChR Clusters at the Neuromuscular Junction. **Neuron**, v. 55, n. 2, p. 247–260, 19 jul. 2007.

CHEN, Xiaocheng *et al.* Three-Dimensional Structure of the Complexin/SNARE Complex. **Neuron**, v. 33, n. 3, p. 397–409, 31 jan. 2002.

ČOLOVIĆ, Mirjana B. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, maio 2013.

DARVESH, Sultan *et al.* Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 4200–4212, 1 jul. 2008.

DE CASTRO, Braulio M. *et al.* The Vesicular Acetylcholine Transporter Is Required for Neuromuscular Development and Function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 19, p. 5238–5250, out. 2009.

DEL CASTILLO, J.; KATZ, B. Quantal components of the end-plate potential. **The Journal of Physiology**, v. 124, n. 3, p. 560–573, 28 jun. 1954.

DELLA MARINA, Adela *et al.* Phenotypical and Myopathological Consequences of Compound Heterozygous Missense and Nonsense Variants in SLC18A3. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3481, 9 dez. 2021.

DENG, Lunbin *et al.* RIM Proteins Activate Vesicle Priming by Reversing Autoinhibitory Homodimerization of Munc13. **Neuron**, v. 69, n. 2, p. 317–331, 27 jan. 2011.

DI GIULIO, Irene *et al.* The proprioceptive and agonist roles of gastrocnemius, soleus and tibialis anterior muscles in maintaining human upright posture. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 10, p. 2399–2416, 2009.

DULHUNTY, A. F. *et al.* Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 79, n. 1, p. 45–75, 1 maio 2002.

DULUBOVA, I. *et al.* A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. **The EMBO journal**, v. 18, n. 16, p. 4372–4382, 16 ago. 1999.

EGERMAN, Marc A.; AND GLASS, David J. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 59–68, 1 jan. 2014.

EHMSEN, Jeffrey T.; HÖKE, Ahmet. Cellular and molecular features of neurogenic skeletal muscle atrophy. **Experimental Neurology**, v. 331, p. 113379, 1 set. 2020.

ENGEL, A. G.; LAMBERT, E. H.; SANTA, T. Study of long-term anticholinesterase therapy. Effects on neuromuscular transmission and on motor end-plate fine structure. **Neurology**, v. 23, n. 12, p. 1273–1281, dez. 1973.

ENGEL, Andrew G. *et al.* Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 420–434, 1 abr. 2015.

ERICKSON, J. D. *et al.* Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a “cholinergic” gene locus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 35, p. 21929–21932, 2 set. 1994.

FENG, Zhihua; KO, Chien-Ping. *The Role of Glial Cells in the Formation and Maintenance of the Neuromuscular Junction*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1132, n. 1, p. 19–28, jun. 2008.

FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. *In*: AMARA, S. G. *et al.* (Orgs.). **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2003. p. 159–216.

FRIEDMAN, Alon *et al.* Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. **Nature Medicine**, v. 2, n. 12, p. 1382–1385, dez. 1996.

GALLER, S. *et al.* Stretch activation and isoforms of myosin heavy chain and troponin-T of rat skeletal muscle fibres. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 18, n. 5, p. 555–561, out. 1997.

GAŠPERŠIČ, Rok *et al.* Acetylcholinesterase in the neuromuscular junction. **Chemico-Biological Interactions**, v. 119–120, p. 301–308, 14 maio 1999.

GONÇALVES, D. A. *et al.* Insulin/IGF1 signalling mediates the effects of β_2 -adrenergic agonist on muscle proteostasis and growth. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 2, p. 455–475, abr. 2019.

GONÇALVES, D. A. P. *et al.* Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 1, p. E123–E133, jan. 2012.

GOSMANOV, Aidar R.; WONG, Jennifer A.; THOMASON, Donald B. Duality of G protein-coupled mechanisms for beta-adrenergic activation of NKCC activity in skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 283, n. 4, p. C1025–1032, out. 2002.

GREEN, Stuart A. *et al.* Sustained Activation of a G Protein-coupled Receptor via “Anchored” Agonist Binding: MOLECULAR LOCALIZATION OF THE SALMETEROL EXOSITE

WITHIN THE β 2-ADRENERGIC RECEPTOR *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 24029–24035, 27 set. 1996.

GREFTE, Sander *et al.* Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 5, p. 857–868, out. 2007.

GROSHONG, Jason S. *et al.* Calpain activation impairs neuromuscular transmission in a mouse model of the slow-channel myasthenic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 10, p. 2903–2912, 1 out. 2007.

GWILT, M.; WRAY, D. The effect of chronic neostigmine treatment on channel properties at the rat skeletal neuromuscular junction. **British Journal of Pharmacology**, v. 88, n. 1, p. 25–31, maio 1986.

HAKONEN, Anna H. *et al.* *SLC18A3* variants lead to fetal akinesia deformation sequence early in pregnancy. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 179, n. 7, p. 1362–1365, jul. 2019.

HAN, Xiuqing *et al.* Mechanisms involved in follistatin-induced hypertrophy and increased insulin action in skeletal muscle. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 6, p. 1241–1257, dez. 2019.

HANSON, Phyllis I. *et al.* Structure and Conformational Changes in NSF and Its Membrane Receptor Complexes Visualized by Quick-Freeze/Deep-Etch Electron Microscopy. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 523–535, 8 ago. 1997.

HAYES, A.; WILLIAMS, D. A. Long-term clenbuterol administration alters the isometric contractile properties of skeletal muscle from normal and dystrophin-deficient mdx mice. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 21, n. 10, p. 757–765, out. 1994.

HENNEBRY, Alex *et al.* Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 296, n. 3, p. C525–C534, mar. 2009.

HEUSER, J. E.; REESE, T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. **The Journal of Cell Biology**, v. 57, n. 2, p. 315–344, maio 1973.

HEUSER, J.E.; SALPETER, S.R. Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen, deep-etched, and rotary-replicated Torpedo postsynaptic membrane. **The Journal of Cell Biology**, v. 82, n. 1, p. 150–173, 1 jul. 1979.

HINKLE, R. T. *et al.* Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the β 2-adrenergic receptor. **Muscle & Nerve**, v. 25, n. 5, p. 729–734, 2002.

HOGG, R. C.; RAGGENBASS, M.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 147, p. 1–46, 2003.

- HOMAN, Anne E.; MERINEY, Stephen D. Active zone structure-function relationships at the neuromuscular junction. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 72, n. 11, p. e22057, nov. 2018.
- JAHN, Reinhard; FASSHAUER, Dirk. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. **Nature**, v. 490, n. 7419, p. 201–207, out. 2012.
- JAHN, Reinhard; LANG, Thorsten; SÜDHOF, Thomas C. Membrane fusion. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 519–533, 21 fev. 2003.
- JOASSARD, O. R.; DURIEUX, A.-C.; FREYSSENET, D. G. β 2-Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Molecular Basis of Muscle Wasting. v. 45, n. 10, p. 2309–2321, 1 out. 2013.
- JOHNSON, M. Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 2, n. 1, p. 57–62, mar. 2001.
- JOHNSON, M. *et al.* The pharmacology of salmeterol. **Life Sciences**, v. 52, n. 26, p. 2131–2143, 1 jan. 1993.
- JUNG, Nadja; HAUCKE, Volker. Clathrin-Mediated Endocytosis at Synapses. **Traffic**, v. 8, n. 9, p. 1129–1136, 2007.
- JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. Histologia básica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KANDEL, Eric R.; SCHWARTZ, James H.; JESSELL, Thomas M. Princípios de Neurociências. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- KATZ, B. Quantal mechanism of neural transmitter release. **Science (New York, N.Y.)**, v. 173, n. 3992, p. 123–126, 9 jul. 1971.
- KATZ, Bernard. Mechanisms of Synaptic Transmission. **Reviews of Modern Physics**, v. 31, n. 2, p. 524–531, 1 abr. 1959.
- KHAN, Muzamil Majid *et al.* Role of autophagy, SQSTM1, SH3GLB1, and TRIM63 in the turnover of nicotinic acetylcholine receptors. **Autophagy**, v. 10, n. 1, p. 123–136, 1 jan. 2014.
- KHAN, Muzamil Majid *et al.* Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 3, p. 746–750, 19 jan. 2016.
- KIM, Y. S.; SAINZ, R. D. β -adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. **Life Sciences**, v. 50, n. 6, p. 397–407, 1 jan. 1992.
- KITAMOTO, T. *et al.* Isolation and characterization of mutants for the vesicular acetylcholine transporter gene in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Neurobiology**, v. 42, n. 2, p. 161–171, 5 fev. 2000.
- KLIN, William O. *et al.* Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 102, n. 2, p. 740–747, fev. 2007.

KO, Chien-Ping; ROBITAILLE, Richard. Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 10, p. a020503, 20 ago. 2015.

KOKOTOS, Alexandros C.; COUSIN, Michael A. Synaptic Vesicle Generation from Central Nerve Terminal Endosomes. **Traffic**, v. 16, n. 3, p. 229–240, 2015.

LAMOND, Allison *et al.* Variants of SLC18A3 leading to congenital myasthenic syndrome in two children with varying presentations. **BMJ Case Reports CP**, v. 14, n. 1, p. e237799, 1 jan. 2021.

LASHLEY, D. *et al.* Ephedrine treatment in congenital myasthenic syndrome due to mutations in DOK7(LOE Classification). **Neurology**, v. 74, n. 19, p. 1517–1523, 11 maio 2010.

LECAILLON, J. B. *et al.* Pharmacokinetics and tolerability of formoterol in healthy volunteers after a single high dose of Foradil dry powder Inhalation via aerolizerTM. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 131–138, 1 abr. 1999.

LEONARD, J. P.; SALPETER, M. M. Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. **Journal of Cell Biology**, v. 82, n. 3, p. 811–819, 1 set. 1979.

LIN, Jiandie *et al.* Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797–801, 15 ago. 2002.

LINTERN, Mc; SMITH, Me; FERRY, Cb. Effect of repeated treatment with pyridostigmine on acetylcholinesterase in mouse muscles. **Human & Experimental Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 158–165, mar. 1997.

LIU, Karen S. Y. *et al.* RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6062, p. 1565–1569, 16 dez. 2011.

LORENZONI, P. J. *et al.* Salbutamol therapy in congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutation. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 331, n. 1, p. 155–157, 15 ago. 2013.

LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of β -Adrenoceptor Signaling in Skeletal Muscle: Implications for Muscle Wasting and Disease. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 729–767, abr. 2008.

MA, Cong *et al.* Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 5, p. 542–549, maio 2011.

MAGALHÃES-GOMES, M. P. S. **Alterações neuromusculares em modelos animais de disfunção colinérgica e sua relação com as Síndromes Miastênicas Congênitas.** Orientador(a): Cristina Guatimosim. 2018. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MAGALHÃES-GOMES, M. P. S. et al. Fast and slow-twitching muscles are differentially affected by reduced cholinergic transmission in mice deficient for VACHT: A mouse model for congenital myasthenia. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 1–12, nov. 2018.

MAGGI, L.; MANTEGAZZA, R. Treatment of Myasthenia Gravis: Focus on Pyridostigmine. **Clinical Drug Investigation**, v. 31, n. 10, p. 691–701, out. 2011.

MALTIN, C. A.; DELDAY, M. I.; REEDS, P. J. The effect of a growth promoting drug, clenbuterol, on fibre frequency and area in hind limb muscles from young male rats. **Bioscience Reports**, v. 6, n. 3, p. 293–299, 1 mar. 1986.

MARQUES, M. J.; CONCHELLO, J. A.; LICHTMAN, J. W. From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 3663–3675, 15 maio 2000.

MARTIN, W. H.; MURPHREE, S. S.; SAFFITZ, J. E. Beta-adrenergic receptor distribution among muscle fiber types and resistance arterioles of white, red, and intermediate skeletal muscle. **Circulation Research**, v. 64, n. 6, p. 1096–1105, jun. 1989.

MAVES, Lisa *et al.* Pbx homeodomain proteins direct Myod activity to promote fast-muscle differentiation. **Development**, v. 134, n. 18, p. 3371–3382, 15 set. 2007.

MCMACKEN, G. M. et al. Salbutamol modifies the neuromuscular junction in a mouse model of ColQ myasthenic syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 14, p. 2339–2351, 15 jul. 2019.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 83–90, 1 maio 1997.

MECH, Aleksandra M. *et al.* Morphological variability is greater at developing than mature mouse neuromuscular junctions. **Journal of Anatomy**, v. 237, n. 4, p. 603, 13 jun. 2020.

MEISSNER, Joachim D. *et al.* Activation of the β myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 1, p. 138–148, 2007.

MILAN, Giulia *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin–proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6670, 10 abr. 2015.

MILLARD, Charles B.; BROOMFIELD, Clarence A. Anticholinesterases: Medical Applications of Neurochemical Principles. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 5, p. 1909–1918, maio 1995.

MINETTI, Giulia C. *et al.* Gai2 Signaling Promotes Skeletal Muscle Hypertrophy, Myoblast Differentiation, and Muscle Regeneration. **Science Signaling**, v. 4, n. 201, p. ra80–ra80, 29 nov. 2011.

MISHINA, M. *et al.* Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. **Nature**, v. 321, n. 6068, p. 406–411, 22 maio 1986.

MORRIS, A. J.; MALBON, C. C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1373–1430, out. 1999.

MORSCH, Marco *et al.* Pyridostigmine but not 3,4-diaminopyridine exacerbates ACh receptor loss and myasthenia induced in mice by muscle-specific kinase autoantibody. **The Journal of Physiology**, v. 591, n. Pt 10, p. 2747–2762, 15 maio 2013.

NAGUIB, Mohamed *et al.* Advances in Neurobiology of the Neuromuscular Junction: Implications for the Anesthesiologist. **Anesthesiology**, v. 96, n. 1, p. 202, 1 jan. 2002.

NAVEGANTES, L. C. C. *et al.* Catecholamines inhibit Ca²⁺-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β 2-adrenoceptors and cAMP. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 3 44-3, p. E449–E454, 2001.

O'GRADY, G. L. *et al.* Variants in SLC18A3, vesicular acetylcholine transporter, cause congenital myasthenic syndrome. **Neurology**, v. 87, n. 14, p. 1442–1448, 4 out. 2016.

OHKURA, N. *et al.* Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. **Gene**, v. 211, n. 1, p. 79–85, 28 abr. 1998.

OHNO, Kinji *et al.* Clinical and Pathologic Features of Congenital Myasthenic Syndromes Caused by 35 Genes—A Comprehensive Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 3730, jan. 2023.

OHNO, Kinji *et al.* Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9654–9659, 4 ago. 1998.

OHNO, Kinji; ITO, Mikako; OHKAWARA, Bisei. Review of 40 genes causing congenital myasthenic syndromes. **Journal of Human Genetics**, p. 1–10, 18 jun. 2025.

PAGE, Clive P.; BARNES, Peter J. (ORGS.). **Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD**. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 237

PANG, Zhiping P.; SÜDHOF, Thomas C. Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 4, p. 496–505, ago. 2010.

PARTON, Robert G.; RICHARDS, Ayanthi A. Lipid Rafts and Caveolae as Portals for Endocytosis: New Insights and Common Mechanisms. **Traffic**, v. 4, n. 11, p. 724–738, 2003.

PAUWELS, R. A. *et al.* Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 20, p. 1405–1411, 13 nov. 1997.

PETTE, Dirk; STARON, Robert S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 6, p. 500–509, 15 set. 2000.

POLISHCHUK, Aleksandra *et al.* BDNF/TrkB signalling, in cooperation with muscarinic signalling, retrogradely regulates PKA pathway to phosphorylate SNAP-25 and Synapsin-1 at the neuromuscular junction. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 371, 23 jul. 2024.

POTTHOFF, Matthew J.; OLSON, Eric N. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 23, p. 4131–4140, dez. 2007.

PRADO, Vania F. *et al.* Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. **Neuron**, v. 51, n. 5, p. 601–612, set. 2006.

PRADO, Vania F. *et al.* Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. **The Biochemical Journal**, v. 450, n. 2, p. 265–274, 1 mar. 2013.

PUGLIESE, Alessia *et al.* Presynaptic Congenital Myasthenic Syndromes: Understanding Clinical Phenotypes through In vivo Models. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 10, n. 5, p. 731–759, 8 set. 2023.

QUINN, Daniel M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 955–979, 1 out. 1987.

RASMUSSEN, Søren G. F. *et al.* Crystal structure of the human $\beta 2$ adrenergic G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 450, n. 7168, p. 383–387, nov. 2007.

REID, Brian; SLATER, Clarke R.; BEWICK, Guy S. Synaptic Vesicle Dynamics in Rat Fast and Slow Motor Nerve Terminals. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 2511–2521, 1 abr. 1999.

RICHMOND, J. E.; WEIMER, R. M.; JORGENSEN, E. M. An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. **Nature**, v. 412, n. 6844, p. 338–341, 19 jul. 2001.

RICHTSFELD, M.; BLOBNER, M. Prolonged Administration of Pyridostigmine Impairs Neuromuscular Function with and without Down-regulation of Acetylcholine Receptors. **CRITICAL CARE MEDICINE**, v. 119, n.2, p. 412–421, fev. 2013.

RIZO, Josep. Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. **Protein Science**, v. 27, n. 8, p. 1364–1391, 2018.

RIZZOLI, Silvio O. Synaptic vesicle recycling: steps and principles. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 8, p. 788–822, 16 abr. 2014.

RODRIGUES, A. C. Z. *et al.* The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. **Acta Physiologica**, v. 225, n. 3, p. e13195, mar. 2019.

RODRIGUES, Anna Zaia Carolina *et al.* Sympathomimetics regulate neuromuscular junction transmission through TRPV1, P/Q- and N-type Ca²⁺ channels. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 95, p. 59–70, mar. 2019.

RODRIGUES, Hermann A. *et al.* Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e78342, 2013.

RODRÍGUEZ CRUZ, P. M. *et al.* The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, p. 610964, 3 dez. 2020.

ROMMEL, Christian *et al.* Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1009–1013, nov. 2001.

ROSENBERRY, Terrone L. Acetylcholinesterase. *In: Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. [S.l.]*: John Wiley & Sons, Ltd, 1975. p. 103–218.

ROSSI, L. *et al.* Influence of β_2 -adrenergic selective agonist formoterol on the motor unit of a mouse model of a congenital myasthenic syndrome with complete VACHT deletion. **Neuropharmacology**, v. 260, p. 110116, 1 dez. 2024.

ROSSI, Susana G.; VAZQUEZ, Ana E.; ROTUNDO, Richard L. Local Control of Acetylcholinesterase Gene Expression in Multinucleated Skeletal Muscle Fibers: Individual Nuclei Respond to Signals from the Overlying Plasma Membrane. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 3, p. 919–928, 1 fev. 2000.

ROTHMAN, J. E.; WARREN, G. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. **Current biology: CB**, v. 4, n. 3, p. 220–233, 1 mar. 1994.

RUAS, Jorge L. *et al.* A PGC-1 α Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell**, v. 151, n. 6, p. 1319–1331, 7 dez. 2012.

RUDOLF, Rüdiger; KETTELHUT, Isis C.; NAVEGANTES, Luiz Carlos C. Sympathetic innervation in skeletal muscle and its role at the neuromuscular junction. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 45, n. 2, p. 79–86, 1 jun. 2024.

RYALL, J. G. *et al.* β_2 -Agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 6, p. R1386–R1394, 1 dez. 2002.

SANDRI, Marco *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399–412, 30 abr. 2004.

SANDRI, Marco *et al.* PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 44, p. 16260–16265, 31 out. 2006.

SANES, Joshua R.; LICHTMAN, Jeff W. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 11, p. 791–805, nov. 2001.

SANGO, K. et al. Mice lacking both subunits of lysosomal β -hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. **Nature Genetics**, v. 14, n. 3, p. 348–352, nov. 1996.

SANTOS, Kivia B. S. *et al.* Activation of the β 2-adrenoceptor by formoterol induces calcium-dependent exocytosis of synaptic vesicles at the neuromuscular junction in a sex-specific manner. **Neurochemistry International**, v. 190, p. 106040, 1 nov. 2025.

SANZ, G. et al. Muscle2View, a CellProfiler pipeline for detection of the capillary-to-muscle fiber interface and high-content quantification of fiber type-specific histology. **Journal of Applied Physiology**, v. 127, n. 6, p. 1698–1709, dez. 2019.

SARTORELLI, V. *et al.* Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 2, p. 1010–1026, fev. 1997.

SATO, Shogo *et al.* Muscle Plasticity and β 2-Adrenergic Receptors: Adaptive Responses of β 2-Adrenergic Receptor Expression to Muscle Hypertrophy and Atrophy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 729598, 2011.

SCHIAFFINO, S. et al. Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 8, n. 2, p. 169–183, 2 mar. 2021.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, out. 2011.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 77, n. 2, p. 493–501, ago. 1994.

SCHWARTZ, M. et al. How chromosomal deletions can unmask recessive mutations? Deletions in 10q11.2 associated with CHAT or SLC18A3 mutations lead to congenital myasthenic syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 176, n. 1, p. 151–155, 2018.

SHEN, Tongye *et al.* Molecular Dynamics of Acetylcholinesterase. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 6, p. 332–340, 1 jun. 2002.

SHI, H. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 292, n. 5, p. C1681–1689, maio 2007.

SHI, Lei; FU, Amy K. Y.; IP, Nancy Y. Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 7, p. 441–453, 1 jul. 2012.

SILMAN, Israel; SUSSMAN, Joel L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1–3, p. 3–10, set. 2008.

SILVEIRA, Wilian A. *et al.* cAMP-dependent protein kinase inhibits FoxO activity and regulates skeletal muscle plasticity in mice. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 34, n. 9, p. 12946–12962, set. 2020.

SPENDIFF, Sally *et al.* Modulation of the Acetylcholine Receptor Clustering Pathway Improves Neuromuscular Junction Structure and Muscle Strength in a Mouse Model of Congenital Myasthenic Syndrome. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, p. 594220, 17 dez. 2020.

STITT, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. **Molecular Cell**, v. 14, n. 3, p. 395–403, 7 maio 2004.

STRAKA, T. *et al.* Regulatory Function of Sympathetic Innervation on the Endo/Lysosomal Trafficking of Acetylcholine Receptor. **Frontiers in Physiology**, v. 12, 11 mar. 2021.

SÜDHOF, T. C.; RIZO, J. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. **Neuron**, v. 17, n. 3, p. 379–388, set. 1996.

SÜDHOF, Thomas C. The Molecular Machinery of Neurotransmitter Release (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 47, p. 12696–12717, 17 nov. 2014.

SÜDHOF, Thomas C.; ROTHMAN, James E. Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. **Science (New York, N.Y.)**, v. 323, n. 5913, p. 474–477, 23 jan. 2009.

SUGITA, Satoshi *et al.* VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions. **Skeletal Muscle**, v. 6, p. 31, 5 out. 2016.

SUTTON, R. B. *et al.* Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. **Nature**, v. 395, n. 6700, p. 347–353, 24 set. 1998.

SZLENK, Christopher T.; GC, Jeevan B.; NATESAN, Senthil. Membrane-Facilitated Receptor Access and Binding Mechanisms of Long-Acting β 2-Adrenergic Receptor Agonists. **Molecular Pharmacology**, v. 100, n. 4, p. 406–427, 1 out. 2021.

TALBOT, J.; MAVES, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **WIREs Developmental Biology**, v. 5, n. 4, p. 518–534, jul. 2016.

TASHKIN, Donald P. Formoterol for the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 15, p. 3105–3122, 27 nov. 2020.

TILSON, H. A.; CABE, P. A. Assessment of chemically-induced changes in the neuromuscular function of rats using a new recording grip meter. **Life Sciences**, v. 23, n. 13, p. 1365–1370, 2 out. 1978.

TORREJAIS, Marcia Miranda *et al.* Histochemical and SEM evaluation of the neuromuscular junctions from alcoholic rats. **Tissue & Cell**, v. 34, n. 2, p. 117–123, abr. 2002.

TSENTSEVITSKY, Andrei N.; KOVYAZINA, Irina V.; BUKHARAEVA, Ellya A. Diverse Effects of Noradrenaline and Adrenaline on the Quantal Secretion of Acetylcholine at the Mouse Neuromuscular Junction. **Neuroscience**, v. 423, p. 162–171, 15 dez. 2019.

TUCKER, Ward C.; CHAPMAN, Edwin R. Role of synaptotagmin in Ca^{2+} -triggered exocytosis. **The Biochemical Journal**, v. 366, n. Pt 1, p. 1–13, 15 ago. 2002.

USDIN, Ted B. *et al.* Molecular biology of the vesicular ACh transporter. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 5, p. 218–224, maio 1995.

VANHAESEBROUCK, A. E. *et al.* β 2-Adrenergic receptor agonists ameliorate the adverse effect of long-term pyridostigmine on neuromuscular junction structure. **Brain**, v. 142, n. 12, p. 3713–3727, 1 dez. 2019.

VANHAESEBROUCK, A. E.; BEESON, D. The congenital myasthenic syndromes: expanding genetic and phenotypic spectrums and refining treatment strategies. **Current Opinion in Neurology**, v. 32, n. 5, p. 696–703, out. 2019.

WANG, Y.; PESSIN, J. E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 16, n. 3, p. 243–250, maio 2013.

WANG, Yun *et al.* Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 593–598, ago. 1997.

WANG, Zhixin; RAUNSER, Stefan. Structural Biochemistry of Muscle Contraction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 92, p. 411–433, 20 jun. 2023.

WATANABE, Shigeki. Slow or fast? A tale of synaptic vesicle recycling. **Science**, v. 350, n. 6256, p. 46–47, 2 out. 2015.

WEBER, Thomas *et al.* SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 759–772, 20 mar. 1998.

WEBSTER, R. G. *et al.* Effect of salbutamol on neuromuscular junction function and structure in a mouse model of DOK7 congenital myasthenia. **Human Molecular Genetics**, v. 29, n. 14, p. 2325–2336, 11 ago. 2020.

WONG, J. A. *et al.* Insulin-independent, MAPK-dependent stimulation of NKCC activity in skeletal muscle. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 2, p. R561–571, ago. 2001.

WOOD, Sarah J.; R. SLATER, Clarke. Safety factor at the neuromuscular junction. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 4, p. 393–429, jul. 2001.

XIAO, Rui-Ping. β -Adrenergic Signaling in the Heart: Dual Coupling of the β_2 -Adrenergic Receptor to G_s and G_i Proteins. **Sciences STKE**, v. 2001, n. 104, 16 out. 2001.

YAN, Li *et al.* Neuromuscular junction disorders: Experimental models and pathophysiological mechanisms. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 82, n. 4, p. 501–510, 2022.

ZAMMIT, Peter S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 72, p. 19–32, dez. 2017.

ZEMAN, R. J. et al. Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 254, n. 6, p. E726–E732, 1 jun. 1988.

8. ANEXO 1: Artigo publicado durante o mestrado



Neuromuscular defects after infection with a beta coronavirus in mice

Leonardo Rossi^a, Kivia B.S. Santos^a, Barbara I.S. Mota^a, Jordane Pimenta^a, Bruna Oliveira^a, Caroline A. Machado^a, Heliana B. Fernandes^a, Leticia A. Barbosa^a, Hermann A. Rodrigues^d, Gabriel H.M. Teixeira^a, Gabriel A. Gomes-Martins^a, Gabriel F. Chaimowicz^a, Celso Martins Queiroz-Junior^a, Ian Chaves^a, Juan C. Tapia^c, Mauro M. Teixeira^b, Vivian V. Costa^a, Aline S. Miranda^a, Cristina Guatimosim^{a,*}

^a Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c School of Medicine, University of Talca, Talca, Chile

^d Departamento de Ciências Básicas da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, MG, Brazil

ABSTRACT

COVID-19 affects primarily the lung. However, several other systemic alterations, including muscle weakness, fatigue and myalgia have been reported and may contribute to the disease outcome. We hypothesize that changes in the neuromuscular system may contribute to the latter symptoms observed in COVID-19 patients. Here, we showed that C57BL/6J mice inoculated intranasally with the murine betacoronavirus hepatitis coronavirus 3 (MHV-3), a model for studying COVID-19 in BSL-2 conditions that emulates severe COVID-19, developed robust motor alterations in muscle strength and locomotor activity. The latter changes were accompanied by degeneration and loss of motoneurons that were associated with the presence of virus-like particles inside the motoneuron. At the neuromuscular junction level, there were signs of atrophy and fragmentation in synaptic elements of MHV-3-infected mice. Furthermore, there was muscle atrophy and fiber type switch with alteration in myokines levels in muscles of MHV-3-infected mice. Collectively, our results show that acute infection with a betacoronavirus leads to robust motor impairment accompanied by neuromuscular system alteration.

1. Introduction

In December 2019, a novel coronavirus named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was identified in Wuhan, China. By the middle of 2020, coronavirus disease 2019 (COVID-19, named by WHO on Feb 11, 2020), became a global pandemic, affecting individuals all around the world. The virus is a member of the coronavirus family that caused the 2002–2004 SARS and 2012 MERS outbreaks, and primarily spreads through respiratory droplets produced by the infected people. Noteworthy, it can be transmitted even if the infected person has no symptoms. The clinical manifestations of COVID-19 can range from no symptoms to severe ailment. Fever, cough, headache, myalgia, and difficulty of breathing are among the typical symptoms. Severe symptoms, on the other hand, lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS), with systemic inflammatory response, and lung-organ failure, which frequently culminates in the patient's death. Additionally, it is important to note that the severity of COVID-19 disease, although varies widely from person to person, seems to be higher in older adults, people with underlying health conditions, or

individuals with compromised immune systems (Del Valle et al., 2020; Lu et al., 2020).

Because of all symptoms described above in humans, animal models for COVID-19 are key to study the disease, providing valuable insights into mechanisms of viral-induced disease (Andrade et al., 2021; Sia et al., 2020; Winkler et al., 2020; Gurumurthy et al., 2020; Rockx et al., 2020). The SARS-CoV-2 virus adsorbs cells via the spike (S) glycoprotein, which has a high affinity (>10 fold more than previous SARS-CoV-1) for ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2), localized at the surface of host cells (Bourgonje et al., 2020). Since ACE2 is expressed in several tissues i.e., nasal tissue, lungs, kidneys, liver, blood vessels, gut, brain, immune system, and skeletal muscles; COVID-19 infects not only lung cells but many other cell types and organs throughout the body (Bourgonje et al., 2020; Motta-Santos et al., 2016). Thus, a detailed understanding of the pathophysiological consequences of COVID-19 on various cells and organs remains elusive.

The use of the murine coronavirus has been suggested as a strategy to mimic the key aspects of human coronavirus infection in a biosafety level 2 environment (Albuquerque et al., 2006; Yang et al., 2014;

* Corresponding author.

E-mail address: cguati@icb.ufmg.br (C. Guatimosim).

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105567>

Received 13 April 2023; Received in revised form 14 June 2023; Accepted 19 June 2023

Available online 20 June 2023

0197-0186/© 2023 Elsevier Ltd. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).

Andrade et al., 2021). Among them, murine hepatitis coronavirus (MHV) stands out as a natural pathogen of mice (Weiss and Leibowitz, 2011). Different MHV viruses, for instance, MHV-1 and MHV-A59 have initial pulmonary system preferences. On the other hand, MHV-3 is capable of causing severe hepatitis in many strains of mice (Weiss and Leibowitz, 2011; Graff Reis et al., 2022). Thus, MHV viruses-based infection models are valuable tools to investigate preclinical pathophysiological alterations in many physiological systems (Körner et al., 2020), such as nervous system and skeletal muscle, adding the fact that this mouse model requires only a biosafety level 2 laboratory.

Muscle weakness, fatigue, myalgia and muscle injury are symptoms and signs reported by many COVID-19 patients (Wu et al., 2020; Sun et al., 2020; Lahiri et al., 2020; Mao et al., 2020). We hypothesized that infection with SARS-CoV-2 may alter the neuromuscular system and contribute to the latter observations in COVID-19 patients. To this end, in this work, we used a murine beta coronavirus directly injected into the nose (intranasal inoculation) (Andrade et al., 2021) to investigate if MHV-3 infection would affect the neuromuscular system in mice. We characterized the model and described the COVID-19-related symptoms showing that the infection with MHV-3 causes impairment in motor function and performance and that such alterations are in part explained by a decrease in both muscle fiber size (CSA, cross-sectional area) and alterations in muscle fiber type, with neuromuscular junction degeneration (reduced NMJ area, with increased fragmentation). We also observed signs of motoneuron degeneration (cell death and organelles disruptions) along with alterations in myokines, signaling proteins involved in the COVID-19 inflammatory immune response. Overall, our findings are relevant since postural skeletal muscles, along with respiratory muscles, are responsible for conducting forces that allow motor behavior and alveolar ventilation respectively (Gransee et al., 2015). Understanding neuromuscular degeneration due to MHV-3 infection gives mechanistic insights into their collapse during COVID-19 disease.

2. Materials and Methods

2.1. Mouse strains and MHV-3 infection

All experimental procedures were performed following the guidance of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) Ethical Committee for Animal Experimentation and received approval number under No 190/2020. Female C57BL/6J wild-type mice (Central Animal Housing of the UFMG) aged 6–7 weeks were randomly divided into two groups: mock and MHV-3. As described in Andrade et al. (2021), mice were anesthetized using intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), and then given an intranasal inoculation of 30 µl sterile saline solution loaded with MHV-3 at a concentration of 3×10^5 PFU. This viral titer was chosen after a dose-response study showing that induced drastic symptoms at 5 dpi, with few deaths before that time (Andrade-Junior et al., 2021). We chose 3 dpi to represent the intermediate phase and 5 dpi to represent the peak of the pulmonary infection and symptoms. At the end of 5 dpi mice started to quickly perish (Andrade et al., 2021). Mock mice received the same intranasal inoculation but without any MHV-3. Mice were housed in individually ventilated cages placed in an animal care facility at $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h light/dark cycle with water and food *ad libitum*.

2.2. Behavioral tests

2.2.1. Open field test

To assess locomotor activity, the animals were submitted to the open field test as described elsewhere (Takahashi et al., 2006). Each animal was gently placed in the cage and allowed to explore the arena for 30 min. The total distance and the mean velocity traveled in the cage was recorded. Video tracking was performed by an infrared-sensitive video camera installed in the top unit of each cage. The X–Y coordinates of each mouse were acquired using EthoVision software (EthoVision HTP

2.1.2.0, based on EthoVision XT 4.1, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) (Takahashi et al., 2006).

2.2.2. Wire hang test

The wire hang test was used to assess motor strength and coordination as described elsewhere (Tanaka et al., 2009). Briefly, the mice were placed on a metal grid 45 cm above a large tub filled to the top with wood-chip bedding. Mice were prompted to grip the wires with forepaws by gently vibrating the cage lid. The cage lid was then inverted and the latency to fall from the cage lid was recorded with a 180-s cut-off time (Tanaka et al., 2009).

2.2.3. Grip force test

Grip-force in the forelimbs and all limbs were measured using Grip Strength Meter (Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, SP) as previously described (Kolisnyk et al., 2013). Mice were allowed to grasp the smooth pull bar with forelimbs and also with the all limbs by holding their tails. Mice were then pulled backward in the horizontal plane and the peak force (N) applied to the bar was recorded. Three trials were performed per mouse within the same session and the average of the three trials was recorded (Kolisnyk et al. (2013).

2.3. Muscle morphometrical analyses

MHV-3 infected (COVID-19) and mock mice (PBS) were anesthetized with pentobarbital followed by cervical dislocation. The extensor digitorum longus (EDL), soleus, and sternomastoideus (STM) muscles from both mice were surgically excised, immersed in O.C.T compound (Tissue Plus, Fisher Health Care) inside freezing molds, frozen in isopentane (M32631, Sigma-Aldrich), cooled with liquid nitrogen, and stored at -80°C . Samples were then sectioned using a cryostat (Leica CM3050S), and 10 µm cross sections were collected on gelatin-coated slides. The slides containing tissue sections underwent a blocking step with 3% BSA +0.1% Triton X-100 for 30 min followed by 5% normal goat serum +0.1% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Sections were then incubated with Wheat Germ Agglutinin (WGA) Alexa Fluor 647 Conjugate (W32466, Invitrogen) and washed three times with PBS. Sections were mounted using ProLong Gold Antifade Mountant Medium (P36934, Thermo Fisher Scientific). Images were acquired using Zeiss LSM 880 confocal microscope (Zeiss GMBH, Germany) equipped with 40x 1.2 NA and 63x 1.3 NA apochromatic objectives and Argon and He-Ne lasers. The total number of fibers and their cross-sectional area were obtained using ImageJ (NIH).

2.4. Neuromuscular junction analysis

MHV-3 infected (COVID-19) and mock mice (PBS) were anesthetized, followed by intracardiac perfusion using 20 ml of PBS followed by 20 ml of paraformaldehyde (PFA) at 4%. Muscles were surgically excised and stored in PBS at 4°C . Whole-mount EDL, soleus, and STM were used to evaluate changes in NMJ from both MHV-3 infected (COVID-19) and mock mice (PBS) controls. The NMJ staining protocol has been previously described (Valadão et al., 2017). Briefly, the presynaptic element was stained using a monoclonal primary antibody against synaptotagmin (1:250 dilution, ZNP1S, DSHB) for 12 h, followed by the secondary antibody IgG2A goat anti-mouse conjugated with AlexaFluor 488 (1:800 dilution, A21131, Life Technologies) together with tetramethylrhodamine conjugated α -bungarotoxin 647 (1:800 dilution, B35450, Life Technologies) for labeling the postsynaptic acetylcholine receptors (nAChRs). Images were acquired using the Z-stack imaging tool from Zeiss LSM 880 confocal microscope, and 20 NMJs per animal had their pre- and post-synaptic areas assessed by the ImageJ polygon tool as well as the colocalization of pre- and post-synaptic elements, followed by particle analysis to estimate the fragmentation index at the neuromuscular junction terminals.

2.5. Motoneurons morphometrical analysis

MHV-3 infected (COVID-19) and control mice were anesthetized, and intracardially perfused as indicated above. Spinal cord cervical and lumbar segments from both were collected and stored in PFA 4% for 12 h at 4 °C. The next day, the respective spinal cord segments were immersed in sucrose solution (30%) for three days, excised from the vertebrae, and embedded in O.C.T frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen. The O.C.T blocks were then sectioned using a cryostat at 30 µm thickness and collected on gelatin-coated slides. The MHV-3 infected (COVID-19) and control sections went through the blocking step with 3% BSA + 0.5% Triton X-100 for 30 min followed by 5% donkey serum + 0.5% Triton X-100 for 30 min at room temperature and incubated for 12 h with a primary antibody against osteopontin (goat anti-OPN; 1:100 dilution, BDO0615081, RD Systems) at 4 °C. Sections were washed three times with PBS + 0.5% Triton X-100, and incubated with DAPI to label all cells, and mounted in ProLong Gold. Images from both strains were acquired using the Z-stack imaging tool from LSM 880 confocal microscope, and the total number of cells (DAPI+), motor neuron (OPN+), and the motor neurons area analyzed using ImageJ (NIH).

2.6. Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), we used a protocol previously described (Rodrigues et al., 2013). Briefly, mice were anesthetized with ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), transcardiac perfused with modified Karnovsky fixative (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer) and maintained in this solution for at least 24 h at 4 °C. Spinal cord segments from mock and MHV-3 infected mice were removed and the samples were then washed with cacodylate buffer (0.1 M), cut into several fragments, post-fixed in reduced osmium (2% osmium tetroxide containing 1.6% potassium ferrocyanide), contrasted en bloc with uranyl acetate (UA, 2% in deionized water), dehydrated through an ascending series of ethanol solutions and embedded in EPON. Sections of 50 nm were collected on 200 or 300 mesh copper grids and contrasted with lead citrate. Samples were examined with a Tecnai-G2-Spirit FEI/Quanta electron microscope (120 kV Philips).

2.7. ELISA analyses of cytokines/myokines, chemokines and neurotrophic factor

Spinal Cord and muscular tissues were carefully removed and homogenized in an extraction solution (100 mg of tissue per milliliter), containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax. Lysates were centrifuged at 13,000g for 10 min at 4 °C, supernatants were collected and stocked at -70 °C until use. The concentration of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), chemokine CX3CL1 and myokines irisin and interleukin-6 (IL-6) was determined by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) in accordance to the manufacturer's instructions. Results are expressed as picogram per 100 mg of tissue. The detection limit of the ELISA assays was around 5 pg/mL.

2.8. qPCR assay

Viral RNA was extracted with kit QIAamp® Viral RNA from MHV-3 infected (COVID-19) and mock mice (PBS) following the manufacturer's guidelines with adaptations that the tissues were macerated in the first step with the lysis buffer. Samples were eluted and quantified in a spectrophotometer (NanoDrop™, Thermo Scientific). cDNA was synthesized starting with 500 ng of total RNA using the kit iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) following the manufacturer's guidelines. The cDNA obtained was diluted 1:10 to be used in the qPCR

assay with Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™) and primers in a concentration of 5 nM: Forward primer 5'-CAGATCCTT-GATGATGGCGTAGT-3'; Reverse primer 5'-AGAGTGTCTATCCC-GACTTTCTC-3'. The standard was obtained by extracting RNA from a known amount of PFU from MHV-3. Results were expressed in Arbitrary Units.

2.9. Immunohistochemistry

Slides containing 30 µm cross-sections of 4% PFA fixed spinal cord of mock and MHV-3-infected mice were washed with 1% bovine serum albumin. Then, endogenous peroxidase blockade was performed with 0.3% hydrogen peroxide and unspecific reactions were blocked with protein block (Abcam ab64226). The slides were washed with TBS-Triton X-100 0.1%, treated with fc-blocking reagents (Mouse-on-mouse kit; Vector) and incubated overnight with the primary antibody anti-dsRNA (1:50, Merck MABE1134, Clone rJ2). On the following day, the slides were washed with TBS-Triton X-100 0.1%, and the secondary antibody (biotinylated goat anti-mouse IgG, Mouse-on-mouse kit) was added for 10 min, followed by an avidin-peroxidase procedure. The reaction was revealed with DAB chromogenic solution.

3. Results

3.1. C57BL/6 mice display significant motor changes following MHV-3 infection

To first assess whether the MHV-3 infection leads to motor dysfunction in mice, we performed a series of well-characterized motor tests, including the open field, wire hang, and grip force tests. In the open field test, MHV-3 infected mice at 3 dpi did not show motor alterations with respect to the controls (mock mice), either in the total distance traveled or in the mean velocity reached, respectively (MOCK: 9528 ± 965.1 cm, MHV-3: 9535 ± 1136 cm, $p = 0.9868$; MOCK: 5.29 ± 0.53 cm/s, MHV-3: 5.29 ± 0.63 cm/s, $p = 0.9871$) (Fig. 1A and B). At 5 dpi however, the MHV-3 mice exhibited a significant reduction in both total distances traveled, and average velocity reached, respectively, when compared to mock animals (MOCK: 5492 ± 552.5 cm, MHV-3: 3529 ± 1739 cm $p = 0.0026$; MOCK: 3.06 ± 0.30 cm/s, MHV-3: 1.96 ± 0.96 cm/s, $p = 0.0025$), indicating significative locomotor changes (Fig. 1C and D).

Similarly, in the wire-hang test, the MHV-3 mice did not show significant changes at 3 dpi when compared to the mock animals (MOCK: 174.5 ± 11.65 s, MHV-3: 180.0 ± 0.00 s, $p = 0.1630$). At 5 dpi, the MHV-3 infected mice did not show a reduction in the latency to fall when compared to the control (MOCK: 180.0 ± 0.00 s, MHV-3: 152.0 ± 42.89 s, $p = 0.0669$) (Fig. 1E and F).

Another motor parameter assessed was the grip force for forelimbs followed by all limbs. MHV-3 mice at 3 dpi showed a significant reduction in the grip force in the forelimbs when compared to mock animals (MOCK: 609.6 ± 149.9 N, MHV-3: 502.5 ± 56.61 N, $p = 0.0361$). No significant changes were found in the all-limbs grip force at 3 dpi (MOCK: 1143 ± 168.5 N, MHV-3: 1077 ± 172.2 N, $p = 0.3435$) (Fig. 1G and H). As the infection progress, i.e. at 5 dpi, the MHV-3 mice displayed a drastic decay in the grip force in both forelimbs (MOCK: 541 ± 139.2 N, MHV-3: 350.1 ± 69.43 N, $p = 0.0003$) and all limbs (MOCK: 1244 ± 185.6 N, MHV-3: 860 ± 160.2 N, $p < 0.0001$) compared to controls (Fig. 1I and J).

3.2. MHV-3 infection induces motoneuron loss at the lumbar spinal cord

One putative cause of motor dysfunction is the damage of one or more components of the motor unit such as motoneurons, neuromuscular junctions and skeletal muscle fibers innervated by them. Therefore, the next set of experiments was designed to address if the MHV-3-associated motor impairment, which is more pronounced at 5 dpi, might

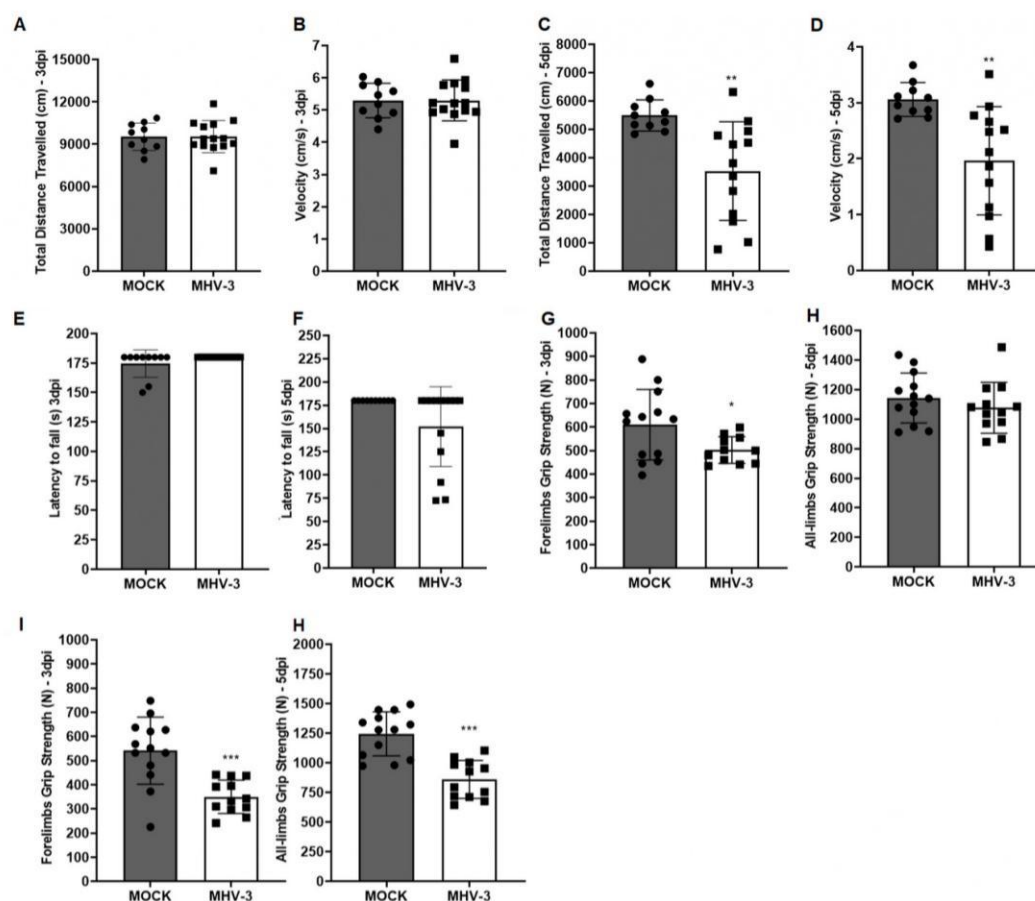


Fig. 1. MHV-3-infected mice showed reduced performance in behavioral tests. (A–B) Total distance traveled and velocity in the Open Field Test, respectively, at 3 dpi. (C–D) Total distance traveled and velocity in the Open Field Test, respectively, at 5 dpi. (E–F) Time sustaining the body weight in the wire hang test, at 3 dpi and 5 dpi, respectively. (G) Forelimbs strength in the grip force test, at 3 dpi. (H) All-limbs strength in the grip force test, at 3 dpi. (I) Forelimbs strength in the grip force test at 5 dpi. (J) All-limbs strength in the grip force test at 5 dpi. For Open Field and wire hang tests $n = 10$ animals for mock and $n = 14$ animals for MHV-3. For grip strength tests $n = 14$ animals for mock and $n = 12$ for MHV-3. Values were compared between groups by unpaired Student's *t*-test and results are presented as mean $\pm$ SD. For MHV-3 compared to mock group * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

result from loss or degeneration of spinal cord motoneurons. Motoneurons loss is known to be related to motor dysfunctions in both aging (Drey et al., 2014) or neurodegenerative diseases (Valadão et al., 2017).

We used DAPI to label all cells and osteopontin (OPN) to specifically stain α -MNs at the spinal segments (see Methods). We observed no differences in the number of OPN⁺ cells (MOCK: 33.67 ± 11.02 cells, MHV-3: 30.75 ± 3.86 cells, $p = 0.6359$) or area (MOCK: $503.6 \pm 190.2 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $561.3 \pm 193.2 \mu\text{m}^2$, $p = 0.3290$) in the cervical segments of MHV-3 and mock mice (Fig. 2A–D). We also quantified the total number of DAPI⁺ cells and found no differences between MHV-3 and mock samples (MOCK: 735.3 ± 96.02 cells, MHV-3: 700.3 ± 94.27 cells, $p = 0.6491$) (Fig. 2E).

Interestingly, a significant reduction of OPN⁺ MNs was found in the lumbar spinal cord of MHV-3 infected mice compared to controls (MOCK: 32.33 ± 1.52 cells, MHV-3: 24.75 ± 2.21 cells, $p = 0.0040$). No significant changes were found in the MNs area (MOCK: 454.1 ± 170.8

μm^2 , MHV-3: $460.4 \pm 180.6 \mu\text{m}^2$, $p = 0.8488$) (Fig. 2F–J). Again, we did not find any difference in DAPI⁺ cells (MOCK: 794.0 ± 162.4 cells, MHV-3: 741.3 ± 50.68 cells, $p = 0.5574$) (Fig. 2I), supporting the hypothesis of a loss/degeneration of α -MNs in the lumbar spinal cord.

3.3. Molecular and cellular signs of neurodegeneration in the spinal cord of MHV-3 infected mice

Fractalkine (CX3CL1) is a chemokine that is highly expressed in neurons and involved in the neuronal and microglial communication. Importantly, a neuroprotective role has been reported for CX3CL1 in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (Pawełec et al., 2020). Neuroprotective effects have been also associated with enhanced expression of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) in different areas of the central nervous system, including the spinal cord (Tejeda et al., 2019; Glowacka et al., 2022). To investigate molecular (BDNF and

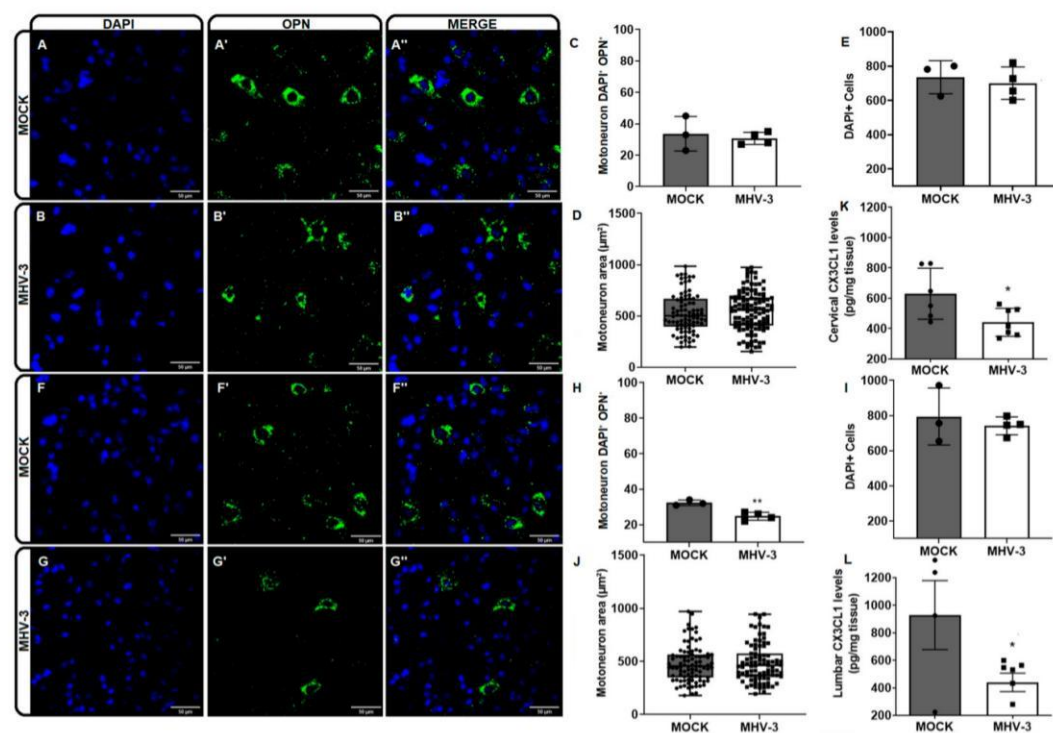


Fig. 2. Reduction in the number of motoneurons and decrease levels of CX3CL1 in MHV-3 mice spinal cords. (A-A'') Representative images of DAPI⁺, OPN⁺ and merged images, respectively, in the cervical segment of mock group. (B-B'') Representative images of DAPI⁺, OPN⁺ and merged images, respectively, in the cervical segment of MHV-3 group. (C-E) Quantification of MNs OPN⁺, MNs area and total DAPI⁺ cells, respectively, in the cervical segment, from mock and MHV-3 (n = 3 for mock and n = 4 for MHV-3; at least 100 MNs were analyzed for each experimental group). (F-H'') Representative images of DAPI⁺, OPN⁺ and merged images, respectively, in the lumbar segment of mock group. (G-G'') Representative images of DAPI⁺, OPN⁺ and merged images, respectively, in the lumbar segment of MHV-3 group. (H-I) Quantification of MNs OPN⁺, MNs area and total DAPI⁺ cells, respectively, in the lumbar segment, from mock and MHV-3 (n = 3 for mock and n = 4 for MHV-3; at least 100 MNs were analyzed for each experimental group). (K) Quantification of CX3CL1 levels of the cervical (n = 6 for mock, and n = 7 for MHV-3) and (L) lumbar (n = 4 animals for mock and n = 7 for MHV-3) segments of the spinal cord. Values were compared between groups by unpaired Student's t-test (mean $\pm$ SD) or Mann-Whitney test (median $\pm$ SD). For MHV-3 compared to mock group *p < 0.05; **p < 0.005.

CX3CL1) and cellular signs of MNs degeneration, we performed ELISA assays and ultrastructural analysis with TEM in both cervical and lumbar segments of the spinal cord.

Our results showed no signs of disturbances in the BDNF levels either in the cervical or lumbar segments of MHV-3 compared to mock mice (data not shown). Interestingly, a significant reduction in the levels of CX3CL1 in both cervical (MOCK: 630.1 ± 168.3 pg/mg of tissue, MHV-3: 441.9 ± 91.60 pg/mg of tissue, $p = 0.0265$) and lumbar segments (MOCK: 927.8 ± 500.4 pg/mg of tissue, MHV-3: 438.9 ± 176.3 pg/mg of tissue, $p = 0.0389$) was observed between MHV-3 compared to mock mice (Fig. 2 K and L, respectively).

At the ultrastructural level, we were able to identify MHV-3 infected MNs with a viral-like particle. These particles had a characteristic size of 100–150 nm in diameter (Fig. 3 E and F), with a well-recognizable structure that included surface projections corresponding to the spike protein crown-like halos, electron-dense membranes comparable to viral envelopes, and heterogeneous interiors representing viral RNA (Fig. 3 E, F, H and I). The MHV-3 viral-like particles could be clearly distinguished from other subcellular structures such as multi-vesicular bodies (Fig. 3 G), clathrin-coated vesicles with multiple electron-dense specks (Fig. 3 D), homogeneous interior and smaller sizes than MHV-3 particles. The

MHV-3-infected cells had a higher number of heterogeneous lipofuscin granules, a sign associated with recent subcellular damage, compared to the mock cells (Fig. 3 J–L). In addition, the MHV-3 MNs but not the mock cells depicted more membrane spirals (Fig. 3 N), a feature that has been assigned to organelle degeneration. We also observed that MHV-3-infected, but not mock, MNs often presented Golgi apparatus with dilated cisternae (Fig. 3 A–C), a finding associated with cellular stress.

To confirm the presence of MHV-3 particles in the spinal cord, qPCR assay and immunohistochemistry for the replicative viral RNA were performed. The cervical and lumbar spinal cord segments from the MHV-3 mice showed significant expression of the viral genetic material, as well as in the whole brain (Fig. 3 O). No viral gene expression was found in the cervical or lumbar spinal cord of mock mice. The immunostaining for the replicative viral RNA (dsRNA) showed positive MNs for dsRNA in the lumbar segment (Fig. 3 P and P') and in the cervical segment of the spinal cord (image not shown) of MHV-3-infected mice, but not in mock (Fig. 3 Q and Q'). Collectively, our results revealed that the MHV-3 virus invaded (Fig. 3 E, F, H, and I), and induced early signs of MNs degeneration.

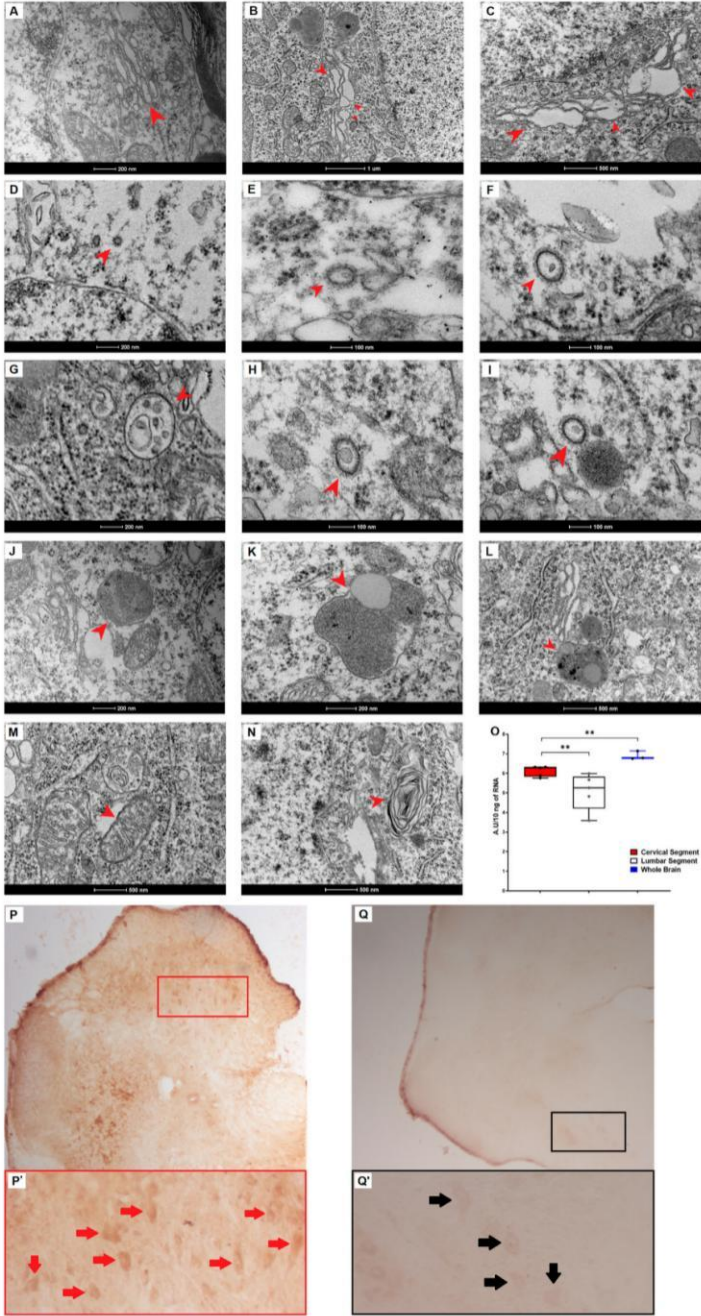


Fig. 3. MHV-3-infected mice present signs of MNs degeneration and particle-like virus at the ultrastructure level. (A–C) Representative image of dilated Golgi apparatus cisternae. (D) Representative image of clathrin-coated vesicles. (E, F, H and I) Representative image of the viral-like particle. (G) Representative image of multi-vesicular bodies. (J–L) Representative images of lipofuscin granules. (M) Representative image of altered mitochondria with warped external and internal membranes. (N) Representative image of membrane spirals. (O) qPCR for MHV-3 genetic material in cervical and lumbar segments of the spinal cord and in the brain. (P and P') Representative images of dsRNA immunostaining in spinal cord (red arrows highlight MN positive for replicative RNA) for MHV-3-infected mice. (Q and Q') Representative images of dsRNA immunostaining in spinal cord (black arrows highlight MN negative for dsRNA) for mock mice. n = 5 mice per group for TEM, n = 5 mice for cervical and lumbar segments of spinal cord and n = 3 mice for brain for qPCR, and n = 4 mice per group in immunohistochemistry for replicative RNA.

3.4. MHV-3 infected mice exhibit different signs of NMJ degeneration

Motoneurons communicate with skeletal muscles by their nerve endings named neuromuscular junctions (NMJs). To assess whether MNs changes in MHV-3 infected mice are followed by NMJs degeneration, we analyzed their features in various muscles with different biochemical properties and innervated by motor neurons (MNs) from different spinal cord segments. Therefore, we analyzed the following muscles: I- fast-twitching fibers EDL (extensor digitorum longus); II- the slow-twitching fibers SOL (soleus); III- and the hybrid fast-twitching fibers STM (sternomastoideus) from both MHV-3 infected (5 dpi) and control mice.

We observed that neither the fast EDL (MOCK pre-synaptic: $410.5 \pm 205.3 \mu\text{m}^2$, MHV-3 pre-synaptic: $417.4 \pm 171.1 \mu\text{m}^2$, $p = 0.5932$; MOCK post-synaptic: $397.7 \pm 201.2 \mu\text{m}^2$, MHV-3 post-synaptic: $420.0 \pm 173.8 \mu\text{m}^2$, $p = 0.8781$) nor the mixed STM (MOCK pre-synaptic: $330.2 \pm 169.7 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $379.1 \pm 178.4 \mu\text{m}^2$, $p = 0.2947$; MOCK post-synaptic: $351.5 \pm 157 \mu\text{m}^2$, MHV-3 post-synaptic: $390.5 \pm 203.5 \mu\text{m}^2$, $p = 0.3583$) muscles showed signs of NMJs atrophy in MHV-3 infected mice compared to mock counterparts (Fig. 4 A-B'' and 4 E-F'', respectively). In contrast, NMJs in SOL muscles showed significant alterations when comparing MHV-3 infected and mock mice in the area of pre (MOCK: $343.0 \pm 130.0 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $297.0 \pm 143.9 \mu\text{m}^2$, $p = 0.0273$) and postsynaptic (MOCK: $348.4 \pm 111.0 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $313.4 \pm 127.3 \mu\text{m}^2$, $p = 0.0326$) elements (Fig. 4 C-C'' and 4 D-D'', respectively).

The colocalization index between the pre- and postsynaptic elements was found to be different between MHV-3 and mock mice in the EDL but not in the other muscles (SOL and STM). For example, the EDL pre- and postsynaptic elements were significantly less colocalized than those from mock animals (MOCK: $96.97 \pm 5.61\%$, MHV-3: $94.19 \pm 6.97\%$, $p = 0.0004$) (Fig. 4 G).

The NMJs fragmentation index was assessed by measuring the α -bungarotoxin staining of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) in MHV-3 and mock mice. We found that in the NMJs from EDL muscle, α -bungarotoxin staining showed signs of discontinuity forming islands of fluorescent staining and were significantly more fragmented in the MHV-3 mice than in the mock ones (MOCK: $3.550 \pm 5.02\%$, MHV-3: $37.86 \pm 9.35\%$, $p = 0.0052$) (Fig. 5 A-A''). Similar findings were also observed in NMJs from STM of MHV-3 versus mock mice (MOCK: $1.385 \pm 1.95\%$, MHV-3: $20.03 \pm 8.75\%$, $p = 0.0480$) (Fig. 5 C-C''). On the contrary, NMJs from SOL (MOCK: $2.133 \pm 3.69\%$, MHV-3: $15.26 \pm 11.75\%$, $p = 0.1171$) (Fig. 5 B-B'') muscles did not show signs of fragmentation in both MHV-3 and mock mice. Altogether, these analyses showed significant NMJ degeneration in the MHV-3 infected animals, similar to those present in other neuromuscular diseases.

3.5. Morphometric analyses show a reduction in the cross-section area of fast and slow-twitching muscles in MHV-3 infected mice

Changes in skeletal muscle myofiber size and of myosin heavy chain isoforms expression are frequently observed in several neuromuscular diseases. Given our observations in MHV-3 infected mice signs of motoneuron degeneration in lumbar spinal cord and NMJs fragmentation, we next asked whether these alterations could cause any skeletal muscle atrophy. We measured muscle fiber sizes (cross-sectional area, CSA) of EDL, STM and SOL muscles stained with WGA (see Methods).

EDL (Fig. 6 A-A'') and SOL (Fig. 6 B-B'') myofibers from MHV-3 infected mice depicted significantly reduced CSAs when compared to the mock mice (EDL CSA: MOCK: $873.9 \pm 114.3 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $457.3 \pm 113.3 \mu\text{m}^2$, $p = 0.0049$; SOL CSA: MOCK: $1102 \pm 197 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $836.6 \pm 81.26 \mu\text{m}^2$, $p = 0.0471$). The STM muscle, on the other hand, did not show significant changes in the CSAs from MHV-3 infected mice at 5 dpi with respect to control (data not shown).

3.6. MHV-3 infection changes myofiber composition in EDL and SOL muscles

We then investigated whether muscle fiber type switching could also contribute to the decay in motor function observed in MHV-3 infected mice. We focused on EDL and SOL muscles to investigate fiber type switching because of their well-known cellular architecture (Bloemberg and Quadrilatero, 2012), and importantly, because both muscles showed significant alterations at the NMJ level and MNs in the MHV-3 infected mice. Thus, using antibody labeling against specific muscle fibers (see Methods), we compared the overall percentages of type I, IIA, IIX, and IIB muscle fibers among MHV-3 infected and mock mice.

The muscle fiber type-specific labeling showed that the EDL muscle from MHV-3 infected mice presented a significant switch towards slow muscle fibers, with a reduced number of type IIB fibers while increasing the percentage of type IIA cells (type IIA %: MOCK: 28.78 ± 4.3 , MHV-3: 56.63 ± 6.18 , $p = 0.0031$; type IIB %: MOCK: 30.77 ± 14.23 , MHV-3: 2.03 ± 1.48 , $p = 0.0253$) (Fig. 6 D). Interestingly, an opposite switch occurred in the SOL muscle from the MHV-3 mice with respect to control (type I %: MOCK: 49.33 ± 7.41 , MHV-3: 19.76 ± 10.19 , $p = 0.0153$; type IIB %: MOCK: 0.00 ± 0.00 , MHV-3: 12.41 ± 5.95 , $p = 0.0230$), a significant reduction in the percentage of type I fibers while the number of type IIB fibers increased (Fig. 6 G). In summary, EDL, a fast-twitching muscle, switched its fiber composition toward a slow-twitching profile while SOL, a slow-twitching muscle, switched its fiber composition toward a fast-twitching profile.

The next step was to examine whether the CSA of the specific fiber types in each muscle EDL and SOL differed between MHV-3 infected and mock mice. Fiber type I, IIA and IIX from MHV-3 mice EDL muscle showed a significant reduction in CSA when compared to mock fibers (type I CSA: MOCK: $417.5 \pm 282.9 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $246.0 \pm 379.4 \mu\text{m}^2$, $p = 0.0002$; type IIA CSA: MOCK: $720.5 \pm 309.5 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $202.0 \pm 238.3 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$; type IIX CSA: MOCK: $567.0 \pm 419.0 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $241.0 \pm 132.7 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$) (Fig. 6 E). There was no alteration in IIB fiber CSA among MHV-3 and mock mice, although the total number of IIB positive fibers in the EDL from MHV-3 mice was almost negligible, unusual for a muscle like the EDL (Bloemberg and Quadrilatero, 2012). In the SOL muscle, the CSAs of type IIA and IIX fibers from MHV-3 mice were also reduced when compared to mock mice (type IIA CSA: MOCK: $1284.0 \pm 623.4 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $473.0 \pm 420.5 \mu\text{m}^2$, $p < 0.0001$; type IIX CSA: MOCK: $834.0 \pm 210.3 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $670.0 \pm 347.1 \mu\text{m}^2$, $p = 0.0003$; type IIB CSA: MOCK: $0.00 \pm 0.00 \mu\text{m}^2$, MHV-3: $1137.0 \pm 313.18 \mu\text{m}^2$, $p = 0.0002$) (Fig. 6 H). As expected, the number of type IIB fibers present in the mock mice was minimal, but in the MHV-3 mice the number of type IIB fibers was significantly high; again, unusual for a muscle like SOL (Bloemberg and Quadrilatero, 2012).

3.7. MHV-3 infection altered IL-6 myokine expression in a muscle-type specific manner

To determine whether signaling factors produced by skeletal muscle fibers (myokines) may contribute to muscle atrophy observed in MHV-3 infected mice, we performed ELISA assays for classical factors such as IL-6, BDNF, and irisin.

We observed no significant changes in the expression levels of BDNF and irisin in both EDL and SOL muscles from either MHV-3 infected or mock mice (data not shown). On the other hand, higher levels of IL-6 were found in the EDL muscles of MHV-3 infected mice compared to mock animals (MOCK: $54.33 \pm 17.18 \text{ pg/mg}$ of tissue, MHV-3: $103.2 \pm 45.10 \text{ pg/mg}$ of tissue, $p = 0.0356$) (Fig. 6 F). Conversely, a significant decrease in IL-6 concentration was observed in the SOL muscles of MHV-3 infected mice (MOCK: $61.41 \pm 11.74 \text{ pg/mg}$ of tissue, MHV-3: $47.37 \pm 6.52 \text{ pg/mg}$ of tissue, $p = 0.0226$) (Fig. 6 I). These results suggest that changes in IL-6 levels in skeletal muscles from MHV-3 infected mice are altered depending on the biochemical properties of the muscle.

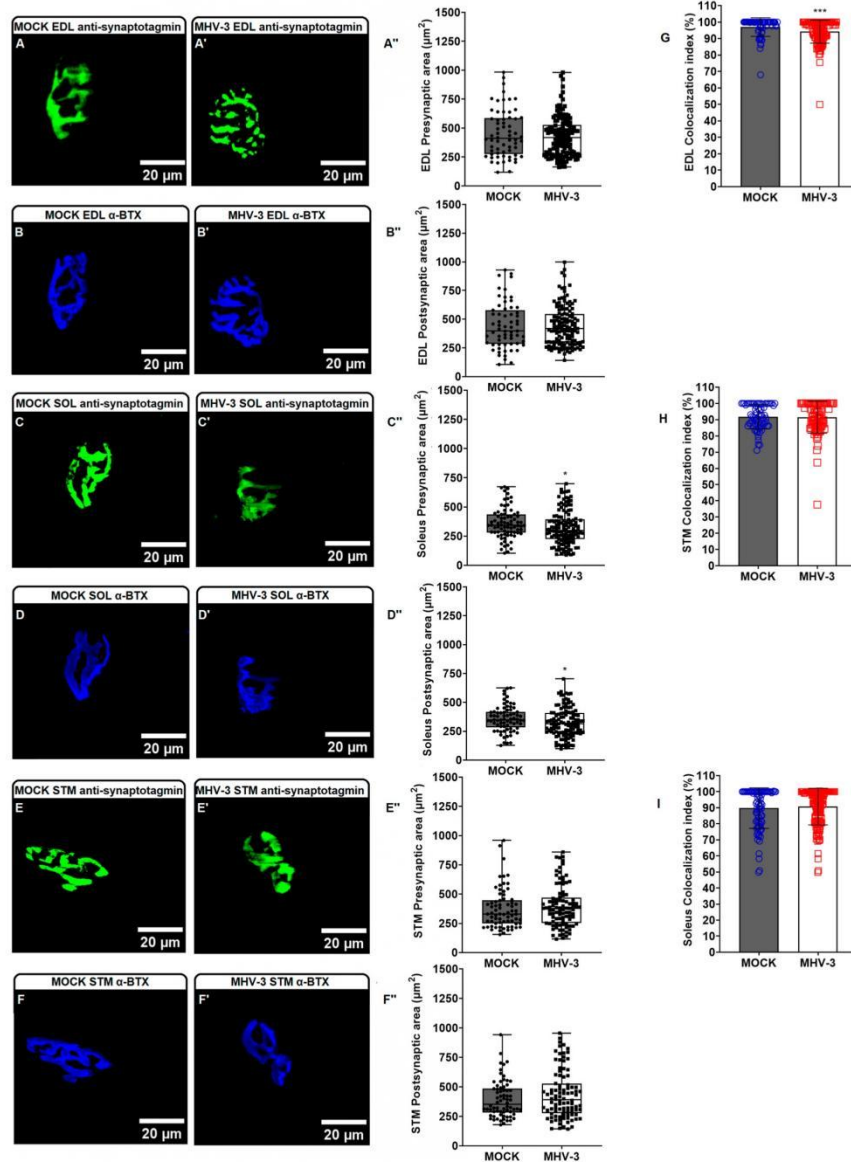


Fig. 4. MHV-3-infected mice showed alterations in the NMJ area and synaptic elements colocalization. (A-A') Representative images of EDL mock and MHV-3 pre-synaptic elements. (A'') Quantification of pre-synaptic element area from EDL muscle. (B-B') Representative images of EDL mock and MHV-3 post-synaptic elements. (B'') Quantification of post-synaptic element area. (C-C') Representative images of SOL mock and MHV-3 pre-synaptic elements. (C'') Quantification of pre-synaptic element area from SOL muscle. (D-D') Representative images of SOL mock and MHV-3 post-synaptic elements. (D'') Quantification of post-synaptic element area from SOL muscle. (E-E') Representative images of STM mock and MHV-3 pre-synaptic elements. (E'') Quantification of pre-synaptic element area from STM muscle. (F-F') Representative images of STM mock and MHV-3 post-synaptic elements. (F'') Quantification of post-synaptic element area from STM muscle. (G-I) Quantification of synaptic elements colocalization from EDL, SOL and STM, respectively. $n = 4$ animals for mock and $n = 6$ animals for MHV-3 and a minimum of 20 NMJ per animal were analyzed. Values were compared between groups by Mann-Whitney test (median $\pm$ SD). For MHV-3 compared to mock group * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$.

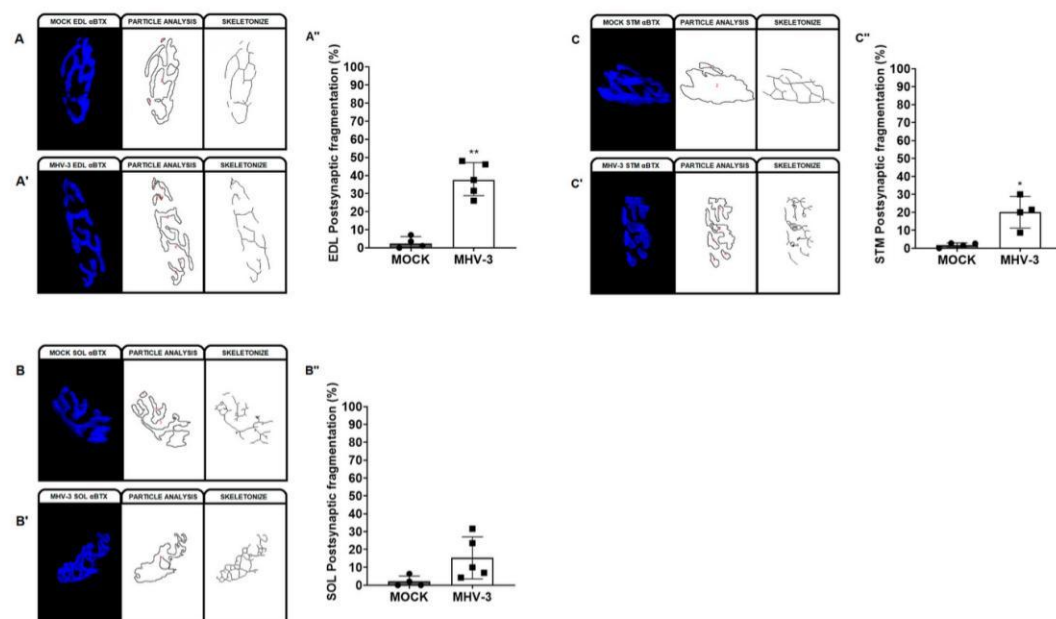


Fig. 5. NMJs from MHV-3-infected mice showed signs of fragmentation. (A-A') Representative images of EDL mock and MHV-3 NMJ fragmentation islands. (A'') Fragmentation index quantification. (B-B') Representative images of SOL mock and MHV-3 NMJ fragmentation islands. (B'') Fragmentation index quantification. (C-C') Representative image of STM mock and MHV-3 NMJ fragmentation islands. (C'') Fragmentation index quantification. $n = 4$ animals for mock and $n = 6$ animals for MHV-3 for EDL and SOL and $n = 4$ animals for mock and MHV-3 for STM. A minimum of 20 NMJ per animal were analyzed. Values were compared between groups by unpaired Student's t-test and results are presented as mean $\pm$ SD. For MHV-3 compared to mock group * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

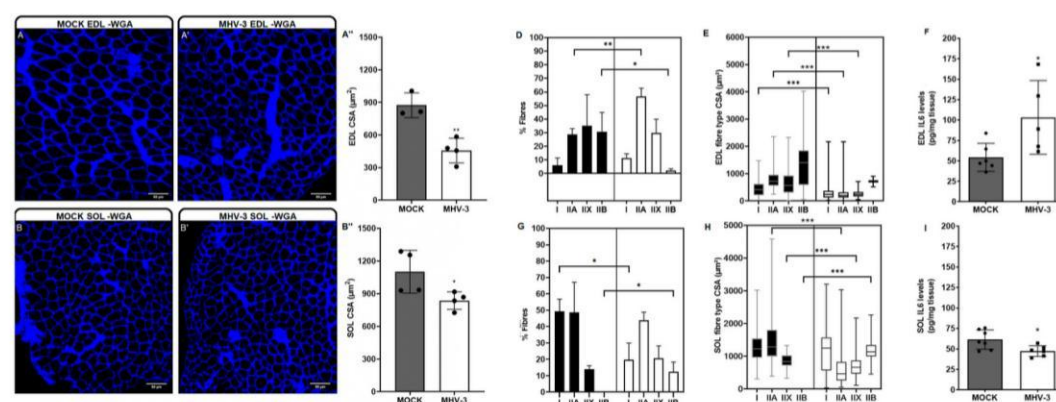


Fig. 6. MHV-3-infected mice presented muscle atrophy and fiber type switch that are accompanied by changes in muscle chemokines. (A-A') Representative images of EDL mock and MHV-3 muscle CSA. (A'') Quantification of CSA from EDL muscle ($n = 3$ animals for mock and $n = 4$ animals for MHV-3. Bars represent the mean of 1908 muscle fibers analyzed per group). (B-B') Representative images of SOL mock and MHV-3 muscle CSA. (B'') Quantification of CSA from SOL muscle ($n = 4$ animals for mock and MHV-3. Bars represent the mean of 1228 muscle fibers analyzed for mock and 1825 muscle fibers analyzed for MHV-3). (D and E) EDL % of fibers and CSA of specific fiber type, respectively. (F) EDL quantification of IL6 levels ($n = 6$ animals for mock and $n = 5$ animals for MHV-3). (G and H) SOL % of fibers and CSA of specific fiber type, respectively. (I) SOL quantification of IL6 ($n = 7$ animals for mock and 6 animals for MHV-3). Values were compared between groups by unpaired Student's t-test (mean $\pm$ SD) or Mann-Whitney test (median $\pm$ SD). For MHV-3 compared to mock group * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

4. Discussion

COVID-19 is now recognized as a complex disorder involving many systems in the human body. Here, using MHV-3-infected mice, a mouse model for COVID-19 (Andrade et al., 2021), we showed that this virus causes significant reduction in motor function as early as 3 dpi. The MHV-3 motor dysfunction can be explained, at least in part, by MNs and NMJ degeneration accompanied by muscle atrophy. Our results provide original evidence at the cellular structure level that contribute to a better understanding of typical symptoms and signs – i.e., muscle weakness, fatigue, myalgia, and muscle injury – observed in many patients infected with SARS-CoV-2 (Wu et al., 2020; Sun et al., 2020; Lahiri et al., 2020; Mao et al., 2020). For instance, Mao et al. (2020) showed that of 214 patients with COVID-19 (Wuhan, China), 23 presented skeletal muscle injury (17 classified as severe cases). Andrade-Junior et al. (2021) followed 32 critically ill patients for 10 days and found that nine showed a significant reduction in the handgrip test when comparing the first and tenth day of the trial. It is important to mention that 23 patients could not complete the task because of sedation or assisted ventilation, suggesting that the number of patients with muscle strength alterations may be even higher. In another clinical study with 41 patients, 86% and 73% of them showed quadriceps and biceps weakness, respectively (Paneroni et al., 2021).

In this study, we examined the motor capacity of MHV-3 infected mice using open field, wire hang, and grip force tests. Infected animals performed much worse at 5 dpi than at 3 dpi in all motor behavior tests. It is important to mention that this is not associated with sickness-behavior, once we used locomotor activity to measure it, and found no early alterations in the open field test but a reduction in the forelimb grip strength at 3 dpi. We, thus, hypothesized that changes in the motor unit components could be related to motor impairment. Next, we investigated MNs from both the cervical and lumbar segment of the spinal cord and found a reduction in their number in the lumbar segment from MHV-3-infected mice.

Fractalkine (CX3CL1) is expressed predominantly on neurons and mediates microglia activation through its receptor (CX3CR1). CX3CL1 is reported to have neuroprotective and anti-inflammatory effects in several animal models of neurodegenerative diseases, probably due to its key role in the neuron-glia crosstalk (Sheridan and Murphy 2013; Subbarayan et al., 2022). For example, in traumatic brain and spinal cord injury, disruption in CX3CL1/CX3CR1 signaling affects neuronal survival contributing to the pathogenesis of these and other CNS-related disorders (Poniatowski et al., 2017; Subbarayan et al., 2022; Pottorf et al., 2022). Because we observed here a significant reduction in both MNs number and fractalkine levels in spinal cords from MHV-3 infected mice, we can speculate that this could be related to an attempt to stimulate microglial activation, enhancing secretion of inflammatory mediators, leading to neuronal loss (Poniatowski et al., 2017).

Because SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 and MHV-3 neuroinvasion has been reported previously (McCray et al., 2007; Netland et al., 2008; Song et al., 2021) we wondered if MHV-3 is also able to infect the CNS, especially the spinal cord ventral horn where MNs are located. Previous report has shown that MHV-3 viruses are able to cross the blood brain barrier and infect the brain at the optical microscopy level (Bleau et al., 2015). Here, we confirmed the presence of the MHV-3 virus RNA in the brains and spinal cords of infected mice by qPCR, replicative virus RNA using immunohistochemistry, and we identified virus-like structures inside spinal cord MNs at the TEM level. We also found organelles alterations in MHV-3 infected MNs such as Golgi cisternae dilation, lipofuscin granules, membrane spirals, that were not described before and that may be related to consequences of direct viral invasion of the CNS.

Considering that the MNs connect to skeletal muscle fibers by their final portion, the motor end plates (NMJs), we asked if those structures were also affected in a set of muscles from MHV-3 infected mice. We have previously shown that MHV-3 infected mice showed structural changes such as reduction in the NMJs sizes and an increase in the

fragmentation index in the diaphragm, a muscle essential for breathing (Andrade et al., 2021). Here, we found alterations in the NMJs area from SOL, co-localization index from EDL and fragmentation on EDL and STM neuromuscular junctions that could also interfere with neuromuscular communication in these muscles. Because MNs and their NMJs regulate skeletal muscle contraction, we analyzed some myofibers features such as CSA and fiber type in limb muscles from MHV-3 infected mice. We found EDL and SOL muscles atrophy and fiber type switching in MHV-3 infected mice compared to control. Patients with COVID-19 may present a decrease in CSA of muscles, such as rectus femoris (Andrade-Junior et al., 2021). Indeed, Suh et al. (2021) showed that post-mortem samples from human patients presented type 2 fiber atrophy in 32 out of 35 patients. To our knowledge, our study is the first to address systematically the fiber type composition and individual fiber CSA in a COVID-19 mice model. Fiber type switch is present in several neuromuscular diseases (Glaser and Suzuki 2018; Molotsky et al., 2022), consisting of a common compensatory muscle response. Improving muscle function plays a significant role in the recovery from critical illness either by increasing muscle mass or strength (Wolfe, 2006). In addition, it highly correlates with the length of stay in the hospital in cases of moderate to severe COVID-19 (Gil et al., 2021).

In addition to muscle fiber type switching and atrophy, we also found alterations in IL-6 expression in EDL and SOL muscles. It is already known that different muscles with different biochemical properties, for example, EDL and SOL, have different IL-6 levels, with slow-oxidative muscles producing more IL-6 than fast-glycolytic (Liang et al., 2018). Once we found fiber type switching in EDL and SOL, this can be one explanation for IL-6 changes in the same muscles, with EDL shifting towards slow-oxidative profile and SOL shifting towards fast-glycolytic profile. Moreover, in sepsis animal models, IL-6 plays an important role in muscle atrophy and KO mice for IL-6 have attenuated muscle atrophy (Yang et al., 2022; Zanders et al., 2022). Other molecular determinants could also be related to muscle function impairment and muscle atrophy (Disser et al., 2020).

In conclusion, to our knowledge, this is the first study providing evidence of significant alterations in the motor behavior accompanied by motor unit changes induced by MHV-3 infection, a mice model for COVID-19, that might help to explain some motor alterations seen in COVID-19 patients. We cannot assure which component of the motor unit is altered first, whether the damage starts at the MNs side and continues toward the NMJs and muscle or if it starts at the muscle levels progressing towards the spinal cord. Further experiments are necessary to identify cellular and molecular mechanisms involved in neuromuscular degeneration induced by MHV-3.

Author statement

Leonardo Rossi: Conceptualization, Experimentation, Analysis, Writing; Kivia B.S. Santos: Experimentation, Analysis; Barbara I.S. Mota: Experimentation, Analysis; Jordane Pimenta: Experimentation; Bruna Oliveira: Experimentation, Analysis; Caroline A. Machado: Experimentation, Analysis; Heliana B. Fernandes: Experimentation; Leticia A. Barbosa: Experimentation; Hermann A. Rodrigues: Experimentation, Analysis; Gabriel H.M. Teixeira: Experimentation; Gabriel A. Gomes-Martins: Experimentation; Gabriel F. Chaimowicz: Experimentation, Writing; Celso Martins Queiroz-Junior: Experimentation; Ian Chaves: Experimentation; Juan C. Tapia: Analysis and Writing; Mauro M. Teixeira: Writing; Vivian V. Costa: Conceptualization, Experimentation, Analysis, Writing, Reviewing; Aline S. Miranda: Conceptualization, Experimentation, Analysis, Writing, Reviewing; Cristina Guatimosim: Conceptualization, Experimentation, Analysis, Writing, Reviewing.

Declaration of competing interest

We have no conflict of interest to declare.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Center of Acquisition and Processing of Images (CAPI) – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais and Microscopy Center at Universidade Federal de Minas Gerais for providing the equipment and technical support for experiments involving confocal and electron microscopy respectively. The authors thank Dr. Nathalia Augusta de Oliveira for her assistance in statistical analysis of the qPCR assay. This work was supported by grants from CNPq (# 402567/2021-8) FAPEMIG (APQ-00092-18), International Society for Neurochemistry and Chan Zuckerberg Initiative. This work also received financial support from the National Institute of Science and Technology in Dengue and Host-microorganism Interaction (INCT dengue), a program funded by The Brazilian National Science Council (CNPq, Brazil process 465425/2014-3) and Minas Gerais Foundation for Science (FAPEMIG, Brazil process 25036/2014-3) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) – process 88881.507175/2020-01. The authors also thank the PhD scholarship provided by CAPES to JP and IC under project process 88881.507175/2020 – n.

References

- Albuquerque, N., Baig, E., Ma, X., Zhang, J., He, W., Rowe, A., Habal, M., Liu, M., Shalev, I., Downey, G.P., Gorczynski, R., Butany, J., Leibowitz, J., Weiss, S.R., McGilvray, I.D., Phillips, M.J., Fish, E.N., Levy, G.A., 2006. Murine Hepatitis virus strain 1 produces a clinically relevant model of severe acute respiratory syndrome in A/J mice. *J. Virol.* 80, 10382–10394. <https://doi.org/10.1128/JVI.00747-06>.
- Andrade, A.C.S.P., Campolina-Silva, G.H., Queiroz-Junior, C.M., de Oliveira, L.C., Lacerda, L. de S.B., Gaggino, J.C.P., de Souza, F.R.O., de Meira Chaves, I., Passos, I. B., Teixeira, D.C., Bittencourt-Silva, P.G., Valadão, P.A.C., Rossi-Oliveira, L., Antunes, M.M., Figueiredo, A.F.A., Wnuk, N.T., Temerozo, J.R., Ferreira, A.C., Cramer, A., Oliveira, C.A., Duraes Carvalho, R., Weis Arns, C., Guimarães, P.P.G., Costa, G.M.J., de Menezes, G.B., Guatimosim, C., da Silva, G.S.F., Souza, T.M.L., Barrioni, B.R., Pereira, M. de M., de Sousa, L.P., Teixeira, M.M., Costa, V.V., 2021. A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. *J. Virol.* 95. <https://doi.org/10.1128/JVI.01276-21>.
- Andrade-Junior, M.C. de, Salles, L.C.D. de, de Brito, C.M.M., Pastore-Junior, L., Righetti, R.F., Yamaguti, W.P., 2021. Skeletal muscle wasting and function impairment in intensive care patients with severe COVID-19. *Front. Physiol.* 12, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.640973>.
- Bleau, C., Filliol, A., Sanson, M., Lamontagne, L., 2015. Brain invasion by mouse hepatitis virus depends on impairment of tight junctions and beta interferon production in brain microvascular endothelial cells. *J. Virol.* 89, 9896–9908. <https://doi.org/10.1128/JVI.01501-15>.
- Bloembergen, D., Quadrilatero, J., 2012. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS One* 7, e35273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035273>.
- Bourgonje, A.R., Abdulle, A.E., Timens, W., Hillebrands, J., Navis, G.J., Gordijn, S.J., Bolling, M.C., Dijkstra, G., Voors, A.A., Osterhaus, A.D.M.E., Voort, P.H., Mulder, D. J., Goor, H., 2020. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J. Pathol.* 251, 228–248. <https://doi.org/10.1002/path.5471>.
- Del Valle, D.M., Kim-Schulze, S., Huang, H.-H., Beckmann, N.D., Nirenberg, S., Wang, B., Lavin, Y., Swartz, T.H., Madduri, D., Stock, A., Marron, T.U., Xie, H., Patel, M., Tuballes, K., Van Oekelen, O., Rahman, A., Kovatch, P., Aberg, J.A., Schadt, E., Jagannath, S., Mazumdar, M., Chamey, A.W., Firpo-Betancourt, A., Mendu, D.R., Jhang, J., Reich, D., Sigel, K., Cordon-Cardo, C., Feldmann, M., Parekh, S., Merad, M., Gnjatic, S., 2020. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat. Med.* 26, 1636–1643. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>.
- Disser, N.P., De Micheli, A.J., Schonk, M.M., Konnaris, M.A., Piacentini, A.N., Edon, D.L., Torresdahl, B.G., Rodeo, S.A., Casey, E.K., Mendias, C.L., 2020. Musculoskeletal consequences of COVID-19. *J. Bone Jt Surg* 102, 1197–1204. <https://doi.org/10.2106/JBJS.20.00847>.
- Drey, M., Krieger, B., Sieber, C.C., Bauer, J.M., Hettwer, S., Bertsch, T., Dahinden, P., Mäder, A., Vrijbloed, J.W., Schuster, G., Zollinger, S., Beeler, C., Unterer, T., 2014. Motoneuron loss is associated with sarcopenia. *J. Am. Med. Assoc.* 315, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.jama.2014.02.002>.
- Gil, S., Jacob Filho, W., Shinjo, S.K., Ferrioli, E., Busse, A.L., Avelino-Silva, T.J., Longobardi, L., Oliveira Júnior, G.N., Swinton, P., Gualano, B., Roschel, H., 2021. Muscle strength and muscle mass as predictors of hospital length of stay in patients with moderate to severe COVID-19: a prospective observational study. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* 12, 1871–1878. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12789>.
- Glaser, J., Suzuki, M., 2018. Skeletal muscle fiber types in neuromuscular diseases. In: *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79474>.
- Głowacka, A., Ji, B., Szczepankiewicz, A.A., Skup, M., Gajewska-Woźniak, O., 2022. BDNF spinal overexpression after spinal cord injury partially protects soleus neuromuscular junction from disintegration, increasing VACht and AChE transcripts in soleus but not tibialis anterior motoneurons. *Biomedicines* 10, 2851. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112851>.
- Graff Reis, J., Dai Prá, I., Michelon, W., Vianelli, A., Piedrahita Marquez, D.G., Schmitz, C., Maraschin, M., Moura, S., Thaís Silva, I., de Oliveira Costa, G., Tizziani, T., Sandjo, L.P., Rodríguez-Lázaro, D., Fongaro, G., 2022. Characterization of planktchlorella nurekis extracts and virucidal activity against a coronavirus model, the murine coronavirus 3. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 19, 15823. <https://doi.org/10.3390/ijerph192315823>.
- Gransse, H.M., Mantilla, C.B., Sieck, G.C., 2015. Respiratory muscle plasticity. In: *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1441–1462. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110050>.
- Gurumurthy, C.B., Quadros, R.M., Richardson, G.P., Poluektova, L.Y., Mansour, S.L., Ohtsuka, M., 2020. Genetically modified mouse models to help fight COVID-19. *Nat. Protoc.* 15, 3777–3787. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00403-2>.
- Kolinsky, B., Guzman, M.S., Raulic, S., Fan, J., Magalhães, A.C., Feng, G., Gros, R., Prado, V.F., Prado, M.A.M., 2013. ChAT-ChR2-EYFP Mice Have Enhanced Motor Endurance But Show Deficits in Attention and Several Additional Cognitive Domains. *J. Neurosci.* 33, 10427–10438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0395-13.2013>.
- Körner, R., Majjouti, M., Alcazar, M., Mahabir, E., 2020. Of mice and men: the coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand SARS-CoV-2. *Viruses* 12, 880. <https://doi.org/10.3390/v12080880>.
- Lahiri, D., Mondal, R., Deb, S., Bandyopadhyay, D., Shome, G., Sarkar, S., Biswas, S.C., 2020. Neuroinvasive potential of a primary respiratory pathogen SARS-CoV2: summarizing the evidences. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* 14, 1053–1060. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.06.062>.
- Liang, A.P., Drzik, A.T., Gao, H., Li, Y., 2018. Skeletal muscle secretion of IL-6 is muscle type specific: ex vivo evidence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 505, 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.042>.
- Liu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W.J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E.C., Gao, G.F., Wu, G., Chen, W., Shi, W., Tan, W., 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 395, 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- Mao, L., Jin, H., Wang, M., Hu, Y., Chen, S., He, Q., Chang, J., Hong, C., Zhou, Y., Wang, D., Miao, X., Li, Y., Hu, B., 2020. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan. *JAMA Neurol.* 77, 683. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>.
- McCray, P.B., Pewe, L., Wohlford-Lenane, C., Hickey, M., Manz, L., Shi, L., Netland, J., Jia, H.P., Halabi, C., Signund, C.D., Meyerholz, D.K., Kirby, P., Look, D.C., Perlman, S., 2007. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 81, 813–821. <https://doi.org/10.1128/JVI.02012-06>.
- Molotsky, E., Liu, Y., Lieberman, A.P., Merry, D.E., 2022. Neuromuscular junction pathology is correlated with differential motor unit vulnerability in spinal and bulbar muscular atrophy. *Acta Neuropathol Commun* 10, 97. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01402-y>.
- Motta-Santos, D., dos Santos, R.A.S., Oliveira, M., Qadri, F., Foglitsch, M., Mosenko, V., Kappes Becker, L., Campagnole-Santos, M.J., M Penninger, J., Alenina, N., Bader, M., 2016. Effects of ACE2 deficiency on physical performance and physiological adaptations of cardiac and skeletal muscle to exercise. *Hypertens. Res.* 39, 506–512. <https://doi.org/10.1038/hr.2016.28>.
- Netland, J., Meyerholz, D.K., Moore, S., Cassell, M., Perlman, S., 2008. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J. Virol.* 82, 7264–7275. <https://doi.org/10.1128/JVI.00737-08>.
- Paneroni, M., Simonelli, C., Saleri, M., Bertacchini, L., Venturini, L., Troosters, T., Ambrosio, N., Vitacca, M., 2021. Muscle strength and physical performance in patients without previous disabilities recovering from COVID-19 pneumonia. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 100, 105–109. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001641>.
- Pawelec, P., Zienka-Nalecz, M., Sypecka, J., Zalewska, T., 2020. The impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in neurological disorders. *Cells* 9, 2277. <https://doi.org/10.3390/cells9102277>.
- Poniatowski, L.A., Wojdasiewicz, P., Krawczyk, M., Szukiewicz, D., Gasik, R., Kuśbaszewski, L., Kurkowska-Jastrzębska, L., 2017. Analysis of the role of CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1 in traumatic brain and spinal cord injury: insight into recent advances in actions of neurochemokine agents. *Mol. Neurobiol.* 54, 2167–2188. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9787-4>.
- Pottorf, T.S., Rotterman, T.M., McCallum, W.M., Haley-Johnson, Z.A., Alvarez, F.J., 2022. The role of microglia in neuroinflammation of the spinal cord after peripheral nerve injury. *Cells* 11, 2083. <https://doi.org/10.3390/cells11132083>.
- Rockx, B., Kuiken, T., Herfst, S., Bestebroer, T., Lamers, M.M., Oude Munnink, B.B., de Meulder, D., van Amerongen, G., van den Brand, J., Okba, N.M.A., Schipper, D., van Run, P., Leijten, L., Sikkema, R., Verschoor, E., Verstrepen, B., Bogers, W., Langermans, J., Drosten, C., Fentener van Vlissingen, M., Fouchier, R. de Swart, R.,

- Koopmans, M., Haagmans, B.L., 2020. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science* (80-) 368, 1012–1015. <https://doi.org/10.1126/science.abb7314>.
- Rodrigues, H.A., Fonseca, M.D.C., Camargo, W.L., Lima, P.M.A., Martinelli, P.M., Naves, L.A., Prado, V.F., Prado, M.A.M., Guatimosim, C., 2013. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One* 8, e78342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078342>.
- Sheridan, G.K., Murphy, K.J., 2013. Neuron–glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol* 3, 130181. <https://doi.org/10.1098/rsob.130181>.
- Sia, S.F., Yan, L.-M., Chin, A.W.H., Fung, K., Choy, K.-T., Wong, A.Y.L., Kaewpreedee, P., Perera, R.A.P.M., Poon, L.L.M., Nicholls, J.M., Peiris, M., Yen, H.-L., 2020. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature* 583, 834–838. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>.
- Song, E., Zhang, C., Israelow, B., Lu Culligan, A., Prado, A.V., Skriabine, S., Lu, P., Weizman, O.-E., Liu, F., Dai, Y., Szigeti-Buck, K., Yasumoto, Y., Wang, G., Castaldi, C., Heltke, J., Ng, E., Wheeler, J., Alfajaro, M.M., Levavasseur, E., Fontes, B., Ravindra, N.G., Van Dijk, D., Mane, S., Gunel, M., Ring, A., Kazmi, S.A.J., Zhang, K., Wilen, C.B., Horvath, T.L., Plu, I., Haik, S., Thomas, J.-L., Louvi, A., Farhadian, S.F., Huttner, A., Seilhean, D., Renier, N., Bilguvar, K., Iwasaki, A., 2021. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J. Exp. Med.* 218, 2013–2015. <https://doi.org/10.1084/jem.20202135>.
- Subbarayan, M.S., Joly-Anado, A., Bickford, P.C., Nash, K.R., 2022. CX3CL1/CX3CR1 signaling targets for the treatment of neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Ther.* 231, 107989. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107989>.
- Suh, J., Mukerji, S.S., Collens, S.L., Padera, R.F., Pinkus, G.S., Amato, A.A., Solomon, I.H., 2021. Skeletal muscle and peripheral nerve histopathology in COVID-19. *Neurology* 97, e849–e858. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000012344>.
- Sun, P., Lu, X., Xu, C., Sun, W., Pan, B., 2020. Understanding of COVID-19 based on current evidence. *J. Med. Virol.* 92, 548–551. <https://doi.org/10.1002/jmv.25722>.
- Takahashi, A., Kato, K., Makino, J., Shiroishi, T., Koide, T., 2006. Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. *Behav. Genet.* 36, 763–774. <https://doi.org/10.1007/s10519-005-9038-3>.
- Tanaka, H., Ma, J., Tanaka, K.F., Takao, K., Komada, M., Tanda, K., Suzuki, A., Ishibashi, T., Baba, H., Ito, T., Shigenoto, R., Ono, K., Miyakawa, T., Ikenaka, K., 2009. Mice with altered myelin proteolipid protein gene expression display cognitive deficits accompanied by abnormal neuron–glia interactions and decreased conduction velocities. *J. Neurosci.* 29, 8363–8371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3216-08.2009>.
- Tejeda, G.S., Esteban-Ortega, G.M., San Antonio, E., Vidaurre, Ó.G., Díaz-Guerra, M., 2019. Prevention of excitotoxicity-induced processing of BDNF receptor TrkB-FL leads to stroke neuroprotection. *EMBO Mol. Med.* 11, 1–20. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809950>.
- Valadao, P.A.C., de Aragão, B.C., Andrade, J.N., Magalhães-Gomes, M.P.S., Foureaux, G., Joviano-Santos, J.V., Nogueira, J.C., Ribeiro, F.M., Tapia, J.C., Guatimosim, C., 2017. Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 45, 785–796. <https://doi.org/10.1111/ejn.13510>.
- Weiss, S.R., Leibowitz, J.L., 2011. Coronavirus pathogenesis. In: *Advances in Virus Research*. Elsevier Inc., pp. 85–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>.
- Winkler, E.S., Bailey, A.L., Kafai, N.M., Nair, S., McCune, B.T., Yu, J., Fox, J.M., Chen, R. E., Earnest, J.T., Keeler, S.P., Ritter, J.H., Kang, L.-L., Dort, S., Robichaud, A., Head, R., Holtzman, M.J., Diamond, M.S., 2020. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat. Immunol.* 21, 1327–1335. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0778-2>.
- Wolfe, R.R., 2006. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 475–482. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.3.475>.
- Wu, J., Liu, J., Zhao, X., Liu, C., Wang, W., Wang, D., Xu, W., Zhang, C., Yu, J., Jiang, B., Cao, H., Li, L., 2020. Clinical characteristics of imported cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Jiangsu province: a multicenter descriptive study. *Clin. Infect. Dis.* 71, 706–712. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa199>.
- Yang, B., Yang, X., Sun, X., Shi, J., Shen, Y., Chen, R., 2022. IL-6 deficiency attenuates skeletal muscle atrophy by inhibiting mitochondrial ROS production through the upregulation of PGC-1 α in septic mice, 2022 *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2022/9148246>.
- Yang, Z., Du, J., Chen, G., Zhao, J., Yang, X., Su, L., Cheng, G., Tang, H., 2014. Coronavirus MHV-A59 infects the lung and causes severe pneumonia in C57BL/6 mice. *Viol. Sin.* 29, 393–402. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3530-y>.
- Zanders, L., Kuy, M., Hahn, A., Schmidt, S., Wundersitz, S., Todiras, M., Lahmann, L., Bandyopadhyay, A., Wollersheim, T., Kaderali, L., Luft, F.C., Birchmeier, C., Weber-Carstens, S., Fielitz, J., 2022. Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* 13, 713–727. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12867>.