

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

Letícia Antunes Barbosa

**ONTOGENIA DO FENÓTIPO MIASTÊNICO EM CAMUNDONGOS  
COM DÉFICIT COLINÉRGICO (VAC<sub>h</sub>T-KD)**

Belo Horizonte

2025

Letícia Antunes Barbosa

**ONTOGENIA DO FENÓTIPO MIASTÊNICO EM CAMUNDONGOS  
COM DÉFICIT COLINÉRGICO (VAcHt-KD)**

**Versão final**

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

Orientador(a): Profa. Dra. Cristina Guatimosim  
Fonseca

Belo Horizonte

2025

043

Barbosa, Letícia Antunes.

Ontogenia do fenótipo miastênico em camundongos com déficit colinérgico (VChT-KD) [manuscrito] / Letícia Antunes Barbosa. – 2025.

64 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: 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. Síndromes Miastênicas Congênitas. 3. Camundongos. 4. Acetilcolina. 5. Desempenho Motor. 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**

**LETICIA ANTUNES BARBOSA**

2025  
entrada  
2º/2023  
2023716777

Às nove horas do dia 06 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: "ONTOGENIA DO FENÓTIPO MIASTÊNICO EM CAMUNDONGOS COM DÉFICIT COLINÉRGICO (VACHT-KD)", 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 à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG	Aprovada
Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira	UFMG	Aprovada
Victor Rodrigues Santos	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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, 06 de agosto de 2025.**

Cristina Guatimosim Fonseca Cristina Guatimosim Fonseca

Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira Antônio Carlos P. de Oliveira

Victor Rodrigues Santos Victor Rodrigues Santos

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, pelo suporte, incentivo e apoio ao longo dessa trajetória, que me permitiram prosseguir e concluir este trabalho. A toda a minha família, também por me apoiar e me encorajar neste caminho.

Agradeço imensamente à Professora Cristina Guatimosim, minha orientadora, por me acolher em seu grupo de pesquisa, acreditar em mim e incentivar o meu trabalho, inicialmente como aluna de Iniciação Científica, e em seguida como aluna de Pós-graduação. Agradeço por compartilhar seus conhecimentos, pela orientação, dedicação e paciência, pela presença e pelas oportunidades que me apresenta, sempre me incentivando a abraçar novos desafios.

Também à Professora Aline de Miranda, pelas diversas contribuições, críticas e sugestões, essenciais à conclusão deste trabalho e ao meu crescimento. Agradeço pela disponibilidade em me acompanhar no Estágio de docência e pela dedicação em me auxiliar e compartilhar seus conhecimentos.

Agradeço à Doutoranda Kivia Santos, por todas as contribuições com as análises estatísticas e interpretação dos dados, por partilhar seus conhecimentos e por todos os ensinamentos.

À toda a equipe do LaBNeuro (em especial Gabriel Marques, Barbara Mota, Leonardo Rossi e Luísa Pereira), pelo suporte, companheirismo e amizade ao longo dessa trajetória, por todas as contribuições e por sempre tornarem o nosso ambiente de trabalho extremamente agradável e tranquilo.

Agradeço, por fim, a todas as instituições de fomento, especialmente CNPq e FAPEMIG, que permitiram a execução deste trabalho.

## RESUMO

Das diversas disfunções neurodegenerativas que afetam os componentes do circuito motor, as Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs) apresentam grande relevância médica, dado que os sintomas característicos em geral se manifestam na primeira infância, muitas vezes de forma grave com fraqueza muscular flutuante e dificuldade respiratória, podendo levar o paciente a óbito em casos mais severos, se não receber o tratamento apropriado. Com o objetivo de estudar com detalhes as consequências da expressão reduzida do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT), mutação genética que já foi identificada como uma das SMCs do tipo pré-sináptica, o modelo VACHT-KD foi desenvolvido em 2006, através da técnica de recombinação homóloga. Com relação ao desempenho motor desses animais, já foi observado, tanto pelo trabalho que descreveu o modelo quanto pelo nosso grupo de pesquisa e outros, que os camundongos VACHT-KD machos a partir de 3 meses de idade (adultos) apresentam o fenótipo miastênico, ou seja, déficits motores e cognitivos, resultado da redução da expressão do transportador e consequente prejuízo da transmissão colinérgica. O objetivo deste trabalho foi, portanto, realizar a ontogenia do fenótipo miastênico dos animais VACHT-KD, e verificar se animais adultos fêmeas apresentavam performance semelhante à dos machos com relação ao desempenho motor. Para isto, executamos uma série de testes de comportamento motor, baseada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa e outros, em animais neonatos (p05 - p12), juvenis (p30) e adultos (p60 - p120), sendo que os animais juvenis e adultos foram separados por sexo. Para os animais neonatos, verificamos diferenças de desempenho motor entre os animais VACHT-KD e WT, para alguns dos testes de comportamento, quando observados separadamente, e de uma forma geral, como indicado pela Análise de Componente Principal (PCA), indicando que animais VACHT-KD se comportam de maneira diferente dos animais WT. Com relação aos animais juvenis e adultos, não observamos diferenças expressivas entre os sexos, mas identificamos diferenças de desempenho motor pronunciadas entre os genótipos, já aos 30 dias de idade, sendo que os animais VACHT-KD já apresentam déficits motores quando juvenis, que são mantidos até a vida adulta. As semelhanças de desempenho entre os sexos e as diferenças entre genótipos foram novamente corroboradas pela PCA. Concluímos, portanto, que os animais VACHT-KD apresentam desempenho motor diferente dos animais WT a partir da idade neonatal, sem diferença pronunciada em relação ao sexo, reiterando a indispensabilidade da neurotransmissão colinérgica íntegra para o desenvolvimento e capacidade motora.

Palavras-chave: Disfunções Neurodegenerativas. Síndromes Miastênicas Congênitas. Modelo Murino. Neurotransmissão Colinérgica.

## ABSTRACT

The Congenital Myasthenic Syndromes (CMS), one of the many neurodegenerative disorders affecting the motor circuitry, is of much medical importance, once its specific symptoms usually manifest in first childhood, severely in many cases, presenting fluctuating fatigable muscle weakness and respiratory difficulties, leading the patient to sudden death in the worst cases, having not received the proper treatment. With the goal of studying in detail the reduced expression of the Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT), genetic mutation that has already been identified as one of the pre-synaptic CMS, the VACHT-KD mice model was created in 2006, using the homologous recombination technique. Regarding the motor performance, the paper describing the model, and others from our research group, have already reported the myasthenic phenotype, for the 3-month-old (adult) VACHT-KD male mice, as the motor and cognitive deficits, which are the result of the reduced expression of the transporter and the impaired cholinergic transmission. With this study, we aim for the ontogeny of the myasthenic phenotype of the VACHT-KD mice, as well as the possible differences in motor performance between adult male and female mice. With that in mind, we performed a series of motor behavior tests, based on previous works from our research group and others, in neonatal (p05 - p12), juvenile (p30) and adult (p60 - p120) mice, separating the juvenile and adult males and females. For the neonatal mice, we identified differences in motor performance between the VACHT-KD and the WT, for some behavioral tests, when analyzing them separately. The differences were confirmed by the Principal Component Analysis (PCA), which indicates that VACHT-KD mice perform differently than WT. As for juvenile and adults, we have not identified relevant differences in motor performance comparing male and female mice. However, the differences comparing genotypes were significant, the VACHT-KD mice already present motor deficits at p30, which are maintained till adulthood. Similarities between sexes and differences between genotypes were confirmed by the PCA results. Therefore, we conclude that VACHT-KD mice present motor performance different than WT since neonatal age, with no relevant significance between sexes, reassuring the indispensability of the integrated cholinergic transmission for development and motor capacity.

Keywords: Neurodegenerative Disorders. Congenital Myasthenic Syndromes. Murine Model. Cholinergic Transmission.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho esquemático da unidade motora. ....	12
Figura 2 – Desenho esquemático de Junção Neuromuscular de vertebrado adulto. ....	14
Figura 3 – Desenho esquemático representando algumas das diferenças entre sinapse elétrica e química. ....	15
Figura 4 – Esquema do experimento de Otto Loewi. ....	17
Figura 5 – Desenho esquemático do armazenamento e liberação da ACh. ....	19
Figura 6 – Desenho esquemático da terminação axonal colinérgica de camundongos com expressão reduzida do VACHT. ....	25
Figura 7 – Modelo VACHT-KD. ....	31
Figura 8 – Imagem representativa de eletroforese em gel de agarose, do processo de genotipagem dos animais VACHT-KD. ....	33
Figura 9 – Fotografias representativas dos testes de comportamento para os animais neonatos. ....	34
Figura 10 – Fotografias representativas dos testes de comportamento para os animais juvenis (p30) e adultos (p60 - p120). ....	36
Figura 11 – Análises de Variância dos testes de comportamento para os animais neonatos, comparações entre os animais VACHT-KD e WT. ....	40
Figura 12 – Análise do Componente Principal e Análise de Redundância dos testes de comportamento para os animais neonatos. ....	42
Figura 13 – Análises de Variância dos testes de comportamento para os animais adultos, comparações entre os genótipos. ....	44
Figura 14 – Análises de Variância dos testes de comportamento para os animais adultos, comparações entre os sexos. ....	46
Figura 15 – Análise do Componente Principal e Análise de Redundância dos testes de comportamento para os animais juvenis e adultos. ....	48
Figura 16 – Índice de Aprendizado Motor (MLI) do teste <i>Rota Rod</i> , para os animais juvenis e adultos. ....	49
Figura 17 – Análise de Variância (ANOVA de 2 fatores) do teste <i>Rota Rod</i> , para animais adultos nunca expostos ao aparelho. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
Ch	Colina
ChAT	Colina Acetiltransferase
CHT	Transportador de Colina
CHT1	Transportador de Colina de Alta Afinidade
EPP	Potencial de Placa Motora
JNM	Junção Neuromuscular
MG	Miastenia Gravis
MLI	<i>Motor Learning Index</i> , índice de aprendizado motor
nAChR	Receptor Nicotínico de Acetilcolina
PCA	Análise do Componente Principal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RDA	Análise de Redundância
SLC	Família de proteínas Carreadoras de Solutos
SMC	Síndromes Miastênicas Congênitas
SNARE	Complexo de proteínas, maquinaria essencial à exocitose de vesículas
VAcHT	Transportador Vesicular de Acetilcolina
VAcHT <sup>del/del</sup>	Animais modelo VAcHT <i>knock out</i>
VAcHT-KD	Animais modelo VAcHT <i>knock down</i>
WT	<i>Wild Type</i> , animais selvagens

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
1 - A VIA MOTORA.....	11
1.1 - A UNIDADE MOTORA .....	12
1.2 - A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR .....	13
2 - A NEUROTRANSMISSÃO.....	15
2.1 - A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA.....	17
3 - AS DISFUNÇÕES NEUROMUSCULARES.....	20
3.1 - AS SÍNDROMES MIASTÊNICAS CONGÊNITAS .....	22
4 - O MODELO MURINO VAcHt-KD.....	24
5 - OS TESTES DE COMPORTAMENTO MOTOR .....	27
6 - JUSTIFICATIVA .....	29
OBJETIVOS.....	30
1 - OBJETIVO GERAL.....	30
2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
1 - ANIMAIS .....	31
2 - GENOTIPAGEM.....	32
3 - TESTES DE COMPORTAMENTO MOTOR .....	33
3.1 - ANIMAIS NEONATOS .....	33
3.2 - ANIMAIS ADULTOS .....	36
4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## INTRODUÇÃO

### 1 - A VIA MOTORA

As vias neurais descendentes que se comunicam com a medula espinhal apresentam um papel extremamente importante no controle motor (Inoue; Ueno, 2025). Em mamíferos, a principal via descendente responsável pela movimentação voluntária distal é o trato corticospinal lateral (Welniarz; Dusart; Roze, 2017), que se origina da área cortical motora primária. Em humanos, cerca de 60% dos axônios do trato corticospinal têm origem no córtex cerebral na região do giro pré-central, apesar de esta ser uma característica variável, já que áreas motoras primárias podem estar localizadas em outras regiões corticais (Haseeb et al., 2007; Welniarz; Dusart; Roze, 2017).

Para que o movimento voluntário seja executado, é necessário que as vias descendentes sejam ativadas, a partir de um momento inicial de “tomada de decisão”, que se dá em regiões corticais de terceira ordem, mais especificamente o córtex pré-frontal em humanos, seguido do planejamento e controle do movimento, em região de córtex motor suplementar e outras estruturas (Svoboda; Li, 2018). A execução do movimento complexo é possível a partir da integração de tais vias e ativação seletiva dos músculos, via interneurônios e neurônios motores da medula espinhal (Inoue; Ueno, 2025).

Os neurônios motores podem ser divididos em superiores e inferiores. Os neurônios motores superiores são aqueles cujas somas se encontram nas áreas corticais motoras primárias (Strick; Dum; Rathelot, 2021). Seus axônios se projetam em direção à medula espinhal, em sua maioria cruzando o plano mediano na decussação das pirâmides do bulbo e se comunicando com os neurônios motores inferiores, cujas somas se encontram na coluna anterior da medula espinhal, especialmente no plano das intumescências cervical e lombar, e que enviarão sinais aos músculos dos membros superiores e inferiores (Welniarz; Dusart; Roze, 2017; Strick; Dum; Rathelot, 2021). Convém mencionar que axônios dos neurônios motores superiores também podem se projetar à coluna eferente dos núcleos dos nervos cranianos, somática e braquiomérica, de onde se projetam os neurônios motores inferiores responsáveis pela inervação da musculatura esquelética de cabeça e pescoço (Gilland; Baker, 2005).

## 1.1 - A UNIDADE MOTORA

Uma unidade motora é composta pelo neurônio motor inferior e todas as fibras musculares inervadas por ele (Fig. 1) (Sanes; Lichtman, 1999). Usualmente, cada fibra muscular será inervada por somente um único neurônio motor (Hall; Sanes, 1993), à exceção das fibras dos músculos extraoculares (Sanes; Lichtman, 1999; Vemula et al., 2024). Ao longo do desenvolvimento, em geral cada fibra muscular apresenta inicialmente mais de um neurônio motor e seus locais de contato correspondentes que, a partir de estímulos e de mecanismos ainda a serem elucidados, se retraem e permitem a atividade de somente um único ponto de contato dominante, processo conhecido como eliminação sináptica (Sanes; Lichtman, 1999; Lichtman; Colman, 2000; Lee, 2019; Vemula et al., 2024).

O tamanho da unidade motora, ou seja, quantas fibras musculares são inervadas pelo neurônio motor, está diretamente relacionado à especificidade e precisão da ativação das fibras, da força gerada pelo músculo e coordenação de movimento. Este conceito é conhecido como princípio do recrutamento ordenado, ou Princípio do Tamanho (“*Size Principle*”), descrito por Henneman e colaboradores na década de 1960 (Henneman; Somjen; Carpenter, 1965). Em geral, unidades motoras menores, cujos axônios dos neurônios motores apresentam menor calibre e limiar de ativação, inervam fibras de contração lenta e são recrutadas primeiro, seguidas pelas unidades motoras maiores, cujos axônios são de maior calibre e limiar de ativação, e inervam fibras de contração rápida, em resposta a estímulos mais intensos (Henneman; Somjen; Carpenter, 1965; Hodson-Tole; Wakeling, 2009).

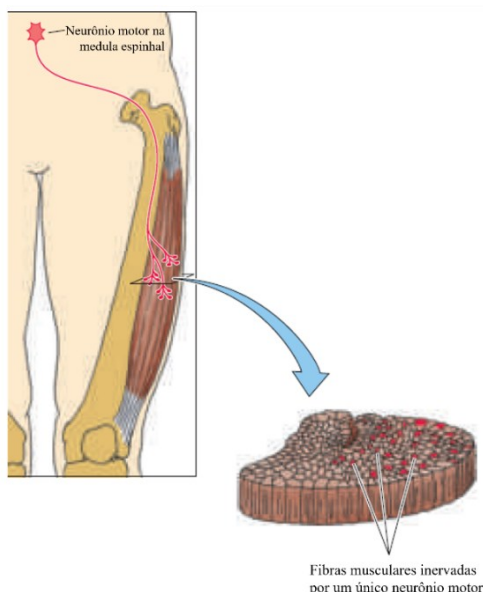


Figura 1: Desenho esquemático da unidade motora. Adaptado de Purves & Williams (2001).

## 1.2 - A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

A Junção Neuromuscular (JNM) é a região altamente especializada de comunicação entre o neurônio motor e a fibra muscular inervada por ele (Sleigh et al., 2014; Boehm et al., 2020; Rodríguez Cruz et al., 2020). Devido ao seu tamanho, acessibilidade e simplicidade, a JNM é uma das sinapses mais amplamente estudadas, sendo seus elementos e mecanismos muito bem compreendidos (Hall; Sanes, 1993; Sanes; Lichtman, 2001; Kummer; Misgeld; Sanes, 2006; Rodríguez Cruz et al., 2020). Em vertebrados, a JNM é um exemplo de sinapse colinérgica, que será descrita em detalhes adiante neste trabalho.

No que diz respeito à sua organização estrutural, a JNM é composta pela terminação pré-sináptica (terminação axonal do neurônio motor), pela terminação pós-sináptica (placa motora da fibra muscular) e pela fenda sináptica (espaço entre as membranas pré e pós-sinápticas) (Fig. 2) (Hall; Sanes, 1993; Rodríguez Cruz et al., 2020; Kandel et al., 2021). Ainda, outros elementos importantes também estão associados à organização e pleno funcionamento da JNM. Por exemplo, as diversas mitocôndrias na região da terminação axonal (Lupa; Hall, 1989), que liberam, a partir da conversão do piruvato, acetil-CoA no citoplasma, essencial à síntese do neurotransmissor Acetilcolina (ACh). Ainda, as bombas de prótons do tipo ATPase, localizadas na membrana das vesículas sinápticas, mantêm o gradiente eletroquímico da vesícula e seu caráter ácido, para que a troca dos íons  $H^+$  do interior da vesícula pela molécula de ACh seja eficiente (Prado et al., 2013). Na terminação pós-sináptica, as dobras juncionais da membrana da célula muscular, precisamente alinhadas às zonas ativas pré-sinápticas e que permitem o aumento da superfície de contato, também são uma característica essencial ao funcionamento adequado da JNM (Marques; Conchello; Lichtman, 2000; Sanes; Lichtman, 2001; Kummer; Misgeld; Sanes, 2006).

Outro elemento de grande importância à comunicação neuromuscular são as células de Schwann. Descritas em 1839 por Theodor Schwann, em uma publicação sobre histologia com grande ênfase na microestrutura de nervos e fibras musculares (Owecki, 2021), as células que posteriormente receberam seu nome são aquelas responsáveis pela mielinização dos axônios no sistema nervoso periférico. No entanto, as células de Schwann associadas à JNM, mais precisamente à terminação pré-sináptica, chamadas perisinápticas (ou células de Schwann terminais) não sintetizam bainha de mielina como as demais, uma vez que a região da JNM não apresenta mielinização. De certa forma, as células de Schwann perisinápticas “recobrem” a região da comunicação e participam mais ativamente das demais funções relacionadas à comunicação (Ko; Robitaille, 2015; Rodríguez Cruz et al., 2020).

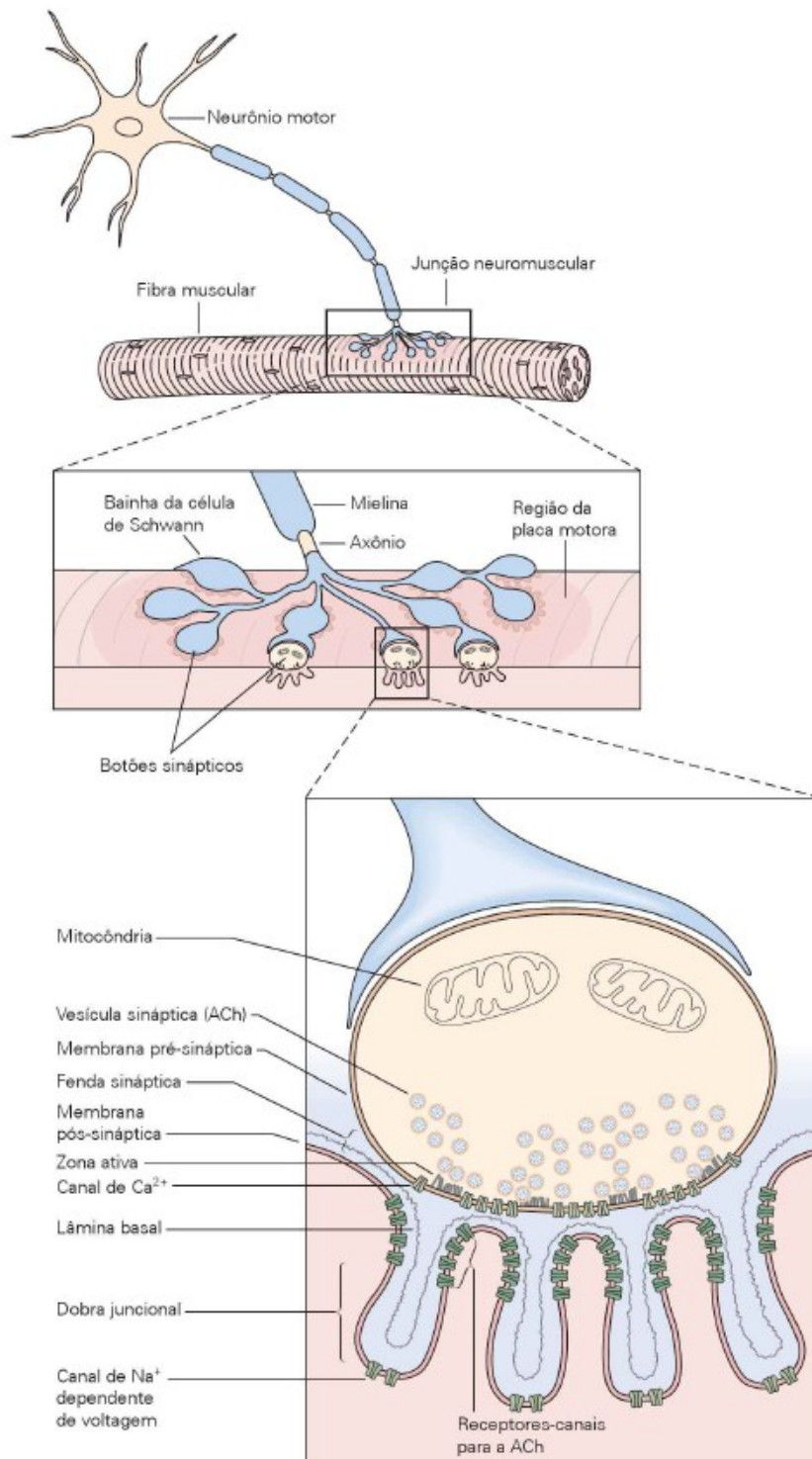


Figura 2. Desenho esquemático de Junção Neuromuscular de vertebrado adulto. No esquema, foi destacado o botão sináptico, contendo mitocôndrias, com as vesículas sinápticas organizadas nas zonas ativas e as dobras juncionais da membrana da célula muscular (Kandel et al., 2021).

## 2 - A NEUROTRANSMISSÃO

O conceito de sinapse, termo cunhado por Sir Charles Sherrington em 1897 (Shepherd; Erulkar, 1997), se refere ao local específico de interação entre o neurônio e sua célula-alvo, onde se dá o evento da transmissão sináptica (Jessell; Kandel, 1993). Mais tarde, Santiago Ramón y Cajal, chamado “pai da neurociência moderna”, constatou a existência de dois elementos conservados nas sinapses, a terminação pré-sináptica e o alvo pós-sináptico, bem como propôs a presença de um diminuto espaço entre estes, a fenda sináptica (Shepherd; Erulkar, 1997; Kandel et al., 2021). As sinapses são tradicionalmente classificadas como elétricas ou químicas (Fig. 3).

A sinapse elétrica, muito rápida, acontece por transmissão direta do impulso elétrico do neurônio à célula pós-sináptica, através das junções comunicantes (do tipo *gap*) (Gibson; Beierlein; Connors, 2005; Vaughn; Haas, 2022). As junções *gap* permitem comunicação elétrica direta entre os compartimentos citoplasmáticos conectados, tendo caráter bidirecional e sincronizado (Evans et al., 2011; Vaughn; Haas, 2022).

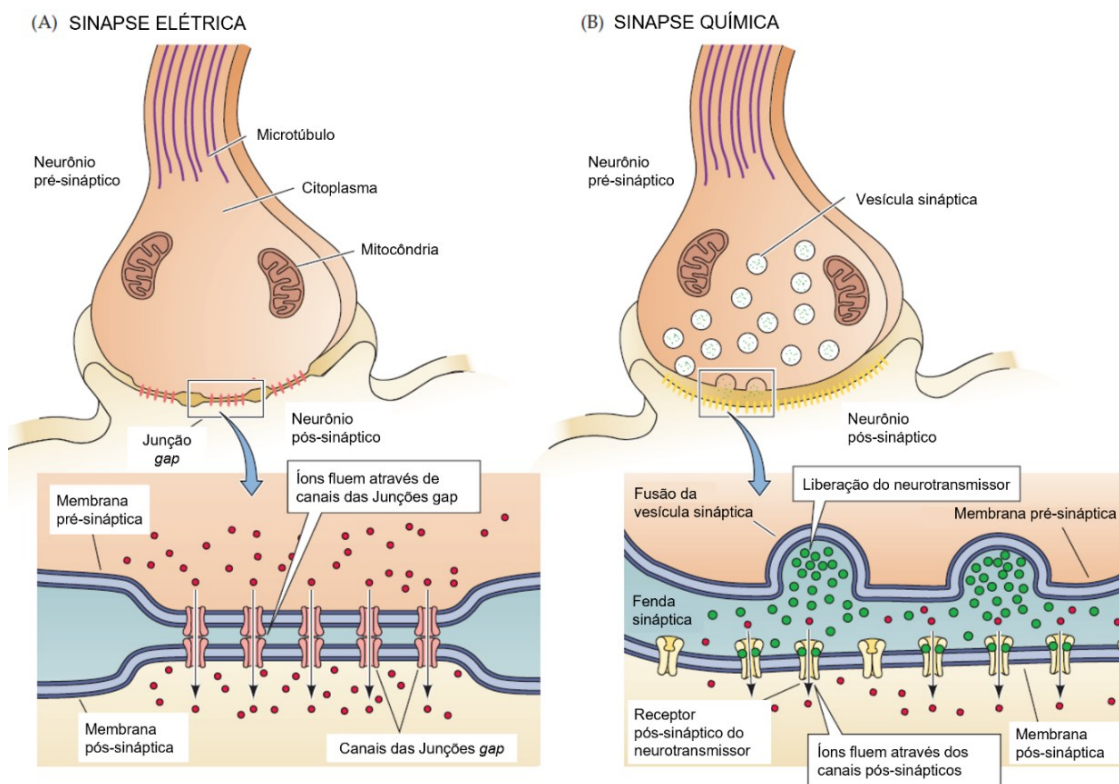


Figura 3: Desenho esquemático representando algumas das diferenças entre sinapse elétrica e química. Adaptado de Purves & Williams (2001).

A descrição de regiões do cérebro de mamíferos que contém sinapses elétricas tem

despertado o interesse para a busca da compreensão sobre suas funções (Evans et al., 2011). Apesar de menos frequentes que as sinapses químicas, no sistema nervoso do ser humano adulto estas são encontradas em regiões corticais, tálamo, hipocampo, cerebelo, oliva inferior e retina (Murphy; Rieke, 2011; Kandel et al., 2021; Vaughn; Haas, 2022), algumas dessas regiões, como o cerebelo e a oliva inferior, envolvidas nos processos de controle e aprendizagem motora.

Embora pouco tenha sido descrito sobre a relação direta entre as sinapses elétricas e o aprendizado motor, já foi demonstrado que os núcleos olivares inferiores apresentam áreas de sinapse elétrica que impactam diretamente e regulam a atividade cerebelar (Luque et al., 2022) e que a conexina-43, uma proteína de junção *gap*, em neurônios excitatórios de neonatos, é importante para a aprendizagem motora de curto prazo (Wang et al., 2019).

## 2.1 - A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA

Já a sinapse química, também rápida, utiliza da liberação de um neurotransmissor na fenda sináptica, que será reconhecido pela célula-alvo pós-sináptica (Gundelfinger; Tom Dieck, 2000; Kandel et al., 2021). Nas sinapses químicas, os neurotransmissores se encontram armazenados em vesículas, localizadas na terminação axonal, sendo que cada um destes neurotransmissores apresenta um transportador específico para sua internalização (Kelly, 1993; Kandel et al., 2021), que mantém as vesículas sinápticas suficientemente repletas e garante a eficiência da transmissão.

A acetilcolina (ACh) foi o primeiro neurotransmissor descrito. Em 1921, Otto Loewi desenvolveu um experimento com corações de rã isolados, acomodados em recipientes separadamente contendo solução ringer, estando um deles ainda conectado ao nervo vago. Após estímulo do nervo por alguns minutos e transferência da solução para o outro recipiente contendo o segundo coração, ele verificou que os efeitos sobre este último eram os mesmos que aqueles observados no órgão aderido ao nervo vago (Fig. 4). Ele concluiu, portanto, que alguma substância, chamada inicialmente de *vagusstoff* (“substância do vago”), era liberada pelo nervo após estímulo, sendo responsável pelos efeitos observados. Alguns anos mais tarde, Henry Dale identificou a substância como acetilcolina, dividindo o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina com Loewi em 1936 (Borges; García, 2021; Kandel et al., 2021).

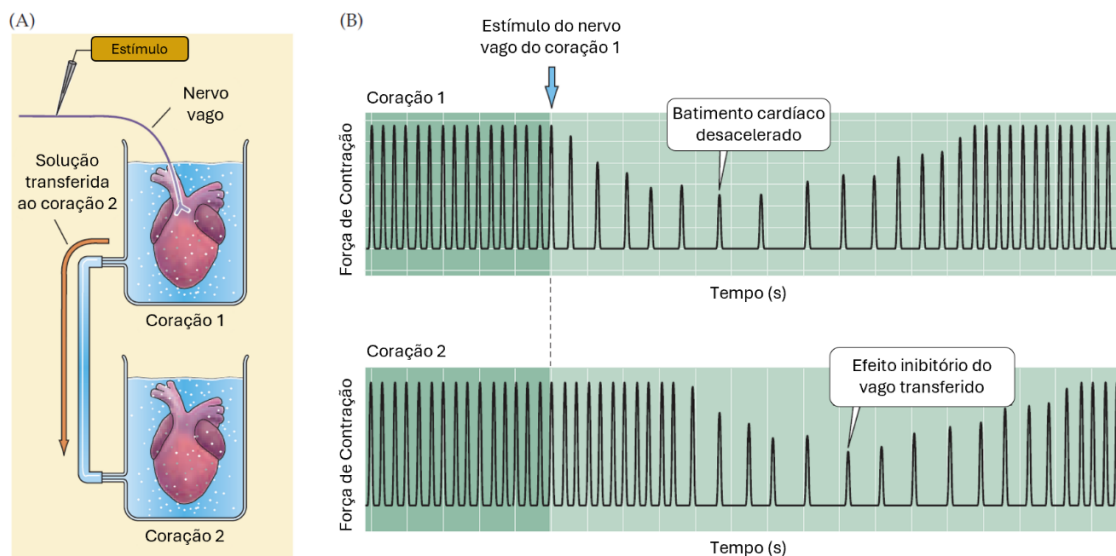


Figura 4: Esquema do experimento de Otto Loewi, que demonstrou a neurotransmissão química. Adaptado de Purves & Williams (2001).

A ACh é sintetizada no citoplasma da terminação axonal do neurônio (Fig. 5). A Colina (Ch), uma amina quaternária obtida da dieta e internalizada na terminação pelo transportador de colina (CHT) (Black; Rylett, 2012; Parikh et al., 2013), e o grupo acetil, da Acetil-CoA, proveniente da conversão do piruvato realizada pelas mitocôndrias da própria terminação, são reconhecidos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), que catalisa a transferência do grupo acetil para a colina, sintetizando assim a ACh (Oda, 1999; Black; Rylett, 2012; Prado et al., 2013).

Em seguida, a ACh é transportada ao interior das vesículas sinápticas da terminação axonal. Dado o seu caráter catiônico, a ACh não é capaz de atravessar membranas celulares passivamente (Prado et al., 2013), portanto, seu transporte se dá pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). O VACHT é uma proteína transmembrana, de 12 domínios, da família de proteínas carreadoras de solutos (SLC), que através do transporte do tipo antiporte, retira dois íons  $H^+$  da vesícula e internaliza uma molécula de ACh (Nguyen; Cox; Parsons, 1998; Parsons, 2000; Prado et al., 2013). A expressão e atividade do VACHT é, portanto, essencial ao preenchimento das vesículas sinápticas, e influencia diretamente a liberação de ACh e a transmissão sináptica colinérgica (De Castro et al., 2009b; Parikh et al., 2013; Prado et al., 2013).

Após a chegada do potencial de ação na terminação axonal, ocorre a exocitose das vesículas na fenda sináptica e liberação do neurotransmissor, sendo que este último é reconhecido pelo receptor localizado na membrana pós-sináptica (Kandel et al., 2021). No caso da ACh, o receptor majoritariamente encontrado na membrana da célula muscular de músculo estriado esquelético, e que permite o desencadeamento do potencial de ação na fibra, é o receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) (Rudolf; Straka, 2019). O receptor nicotínico presente na fibra muscular é um canal iônico ligante-dependente, i. e., quando duas moléculas de ACh se ligam às suas subunidades  $\alpha$  e  $\delta$ , há alteração da sua conformação e abertura, permitindo a passagem de íons  $Na^+$  ao interior da célula-alvo (Cordero-Erausquin et al., 2000; Miyazawa; Fujiyoshi; Unwin, 2003; Changeux, 2010; Rudolf; Straka, 2019). No caso da fibra muscular, a entrada de íons leva à despolarização da membrana, e desencadeando o potencial de placa motora (EPP), que resulta na contração muscular (Rudolf; Straka, 2019; Rodríguez Cruz et al., 2020; Kandel et al., 2021).

Por fim, a ACh presente na fenda sináptica é degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), que a divide em colina e acetato (Ohno et al., 1998; Rodríguez Cruz et al., 2020), cessando sua atividade. A colina é novamente recaptada para o interior da terminação axonal, pelo CHT1, permitindo então o reinício do ciclo (Prado et al., 2013).

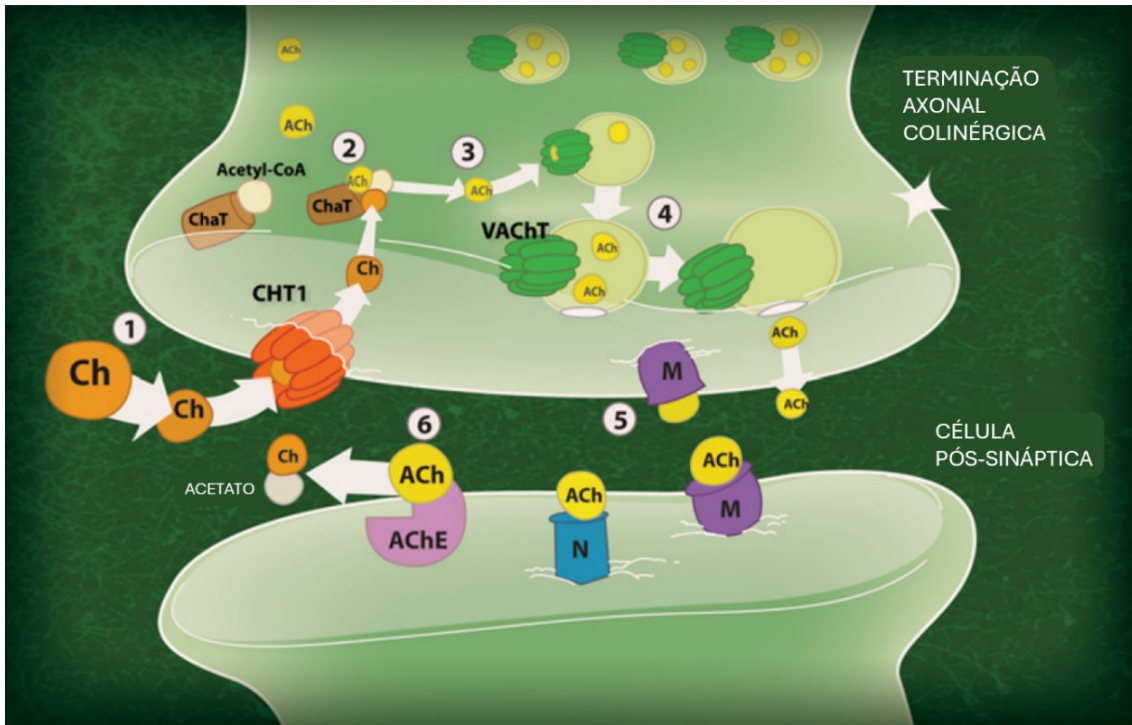


Figura 5: Desenho esquemático do armazenamento e liberação da ACh. (1) Captação da colina, precursora da ACh, pelo CHT1, que é normalmente expresso em neurônios colinérgicos. (2) No citoplasma da terminação, a ACh é sintetizada pela enzima ChAT, e então é transportada ao interior das vesículas sinápticas (3) pelo VChT. (4) Quando o impulso nervoso chega, as vesículas se fundem à membrana plasmática e liberam o neurotransmissor que pode então sinalizar aos receptores nicotínicos (N) ou muscarínicos (M) (5). ACh é rapidamente degradada em acetato e colina (6) pela enzima AChE (acetilcolinesterase). Ch, colina. Adaptado de Prado et al. (2013).

### 3 - AS DISFUNÇÕES NEUROMUSCULARES

A JNM é uma sinapse característica do tipo “tudo-ou-nada”, ou seja, se o potencial de placa motora (EPP) não é suficiente para atingir o limiar e desencadear o potencial de ação, a contração da célula muscular não acontece. Em um estado fisiológico saudável, o EPP é mais que suficiente para atingir o limiar, sendo esta uma das características do fator de segurança da Junção Neuromuscular (Wood; Slater, 2001; Odierna; Phillips, 2021), o que permite garantir o potencial de ação da célula muscular sempre que houver liberação evocada de ACh na fenda. O fator de segurança da JNM é caracterizado pela quantidade de neurotransmissores liberados na fenda sináptica que são reconhecidos pelos receptores da membrana pós-sináptica, em situação fisiológica, ambos em quantidade muito maior do que aquela necessária para desencadear o potencial de ação (Wood; Slater, 2001; Odierna; Phillips, 2021). No entanto, algumas disfunções podem reduzir o fator de segurança da JNM, e levar à redução da frequência de contração e à fraqueza muscular (Wood; Slater, 2001; Juel, 2012; Serra; Ruff; Leigh, 2012).

Disfunções da JNM relacionadas a infecções ou envenenamento são de grande importância médica. O botulismo, por exemplo, infecção pela bactéria *Clostridium botulinum*, causa disfunção de estruturas da terminação pré-sináptica envolvidas com a liberação da ACh na fenda sináptica (Schiavo; Matteoli; Montecucco, 2000; Rodríguez Cruz et al., 2020), mais especificamente as proteínas do complexo SNARE (Südhof; Rizo, 2011; Karalewitz; Barbieri, 2012), interferindo portanto na contração da célula muscular e causando paralisia dos membros e até mesmo respiratória (Juel, 2012). Diferentemente, o veneno da serpente *Bungarus multicinctus* afeta diretamente os elementos pós-sinápticos, mais precisamente, os receptores nicotínicos de ACh (Saiani et al., 1984; Stiles, 1993), bloqueando-os e impedindo que a ACh se ligue a eles e desencadeie potencial de ação na fibra muscular.

Quanto às disfunções neurodegenerativas, a característica mais evidente é a morte neuronal, sendo precedida, muitas vezes, pela disfunção da sinapse (Valdez et al., 2012). No caso das disfunções neuromusculares especificamente, i. e., que envolvem os circuitos motores, estas afetam diretamente um ou mais dos componentes da unidade motora. A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), por exemplo, é caracterizada pela degeneração de ambos os neurônios motores superiores e inferiores, resultando principalmente nos sintomas motores, com degeneração em sequência da própria fibra muscular (Brown; Al-Chalabi, 2017; Shefner et al., 2023).

No caso da Doença de Huntington, outro exemplo de disfunção neuromuscular, esta é caracterizada pela degeneração dos neurônios envolvidos na circuitaria dos núcleos da base

(Novak et al., 2015; Nair et al., 2022). A mutação no gene *HTT*, que codifica a proteína Huntingtina, já foi descrita como a principal causa da fisiopatologia da doença (MacDonald et al., 1993), que leva à morte dos neurônios por mecanismos ainda não muito bem elucidados, resultando nos sintomas motores caracterizados por coreia, incoordenação dos movimentos e sintomas cognitivos (Roos, 2010; Valadão et al., 2020). A manifestação de sintomas na primeira infância, em pacientes que apresentam mutação do gene da Huntingtina e outras, é mais rara, e há certa semelhança com os sintomas que se desenvolvem no paciente adulto (Darras et al., 2015).

A Miastenia Gravis (MG), diferentemente, é uma disfunção neuromuscular adquirida, uma das doenças da JNM mais comuns (Rodríguez Cruz et al., 2020). De natureza autoimune, é caracterizada pela produção de anticorpos que se ligam e bloqueiam, ou combatem os receptores nicotínicos de acetilcolina (Serra; Ruff; Leigh, 2012; Gilhus, 2016; Arroyo, 2019), ou outros elementos relacionados à transmissão colinérgica, em geral, pós-sinápticos (Gilhus, 2016), o que resulta em fraqueza muscular. A fraqueza é normalmente generalizada, mais proximal que distal, e quase sempre inclui os músculos extraoculares, com diplopia e ptose palpebral (Serra; Ruff; Leigh, 2012; Gilhus, 2016). A Miastenia Gravis é uma doença neuromuscular que pode se manifestar na infância, com características clínicas semelhantes às dos pacientes adultos, no entanto com desafios para os aspectos terapêuticos (Darras et al., 2015; Arroyo, 2019).

### 3.1 - AS SÍNDROMES MIASTÊNICAS CONGÊNITAS

As Síndromes Míastênicas Congênitas, ou miastenias congênitas, também são disfunções neuromusculares, e podem apresentar alteração de um ou mais componentes da JNM (Engel et al., 2015; Rodríguez Cruz; Palace; Beeson, 2018; Ramdas; Beeson, 2021; Pugliese et al., 2023), caracterizando a redução prejudicial do fator de segurança da junção (Engel et al., 2015; Ramdas; Beeson, 2021). Diferentemente da Miastenia Gravis, as SMCs não são de natureza autoimune e não apresentam anticorpos ou resposta a imuno modulação (Palace; Beeson, 2008).

As miastenias congênitas são disfunções raras, de natureza genética, caracterizadas por alterações nos componentes envolvidos diretamente nos processos da transmissão sináptica ou da organização, manutenção e função da placa motora (Palace; Beeson, 2008; Finsterer, 2019). Todos os subtipos de SMC são caracterizados por fraqueza anormal, transitória ou permanente dos músculos extraoculares, respiratórios e/ou dos membros (Kinali et al., 2008; Palace; Beeson, 2008; Rodríguez Cruz; Palace; Beeson, 2018; Finsterer, 2019; Ramdas; Beeson, 2021; Pugliese et al., 2023), sendo que os sintomas, especialmente fadigabilidade flutuante, dificuldade respiratória e bulbar, ptose e atrasos no desenvolvimento motor, podem se manifestar na primeira infância (Kinali et al., 2008; Palace; Beeson, 2008; Finsterer, 2019; Ramdas; Beeson, 2021; Pugliese et al., 2023).

As SMCs podem ser classificadas de acordo com o componente da JNM afetado, podendo ser do tipo pré-sináptica, sináptica e pós-sináptica (Maselli et al., 2012; Rodríguez Cruz; Palace; Beeson, 2018; Ramdas; Beeson, 2021; Pugliese et al., 2023). As SMCs do tipo pré-sinápticas incluem alterações nos componentes envolvidos na síntese, armazenamento e liberação da ACh (Ramdas; Beeson, 2021; Pugliese et al., 2023). O tipo pré-sináptico é o menos comum, mas já foram descritas mutações para algumas das proteínas envolvidas nestas etapas, como os genes *CHAT* (que codifica a ChAT) (Arredondo et al., 2015), *SLC18A3* (que codifica o VAChT) (O'Grady et al., 2016; Aran et al., 2017; Lamond et al., 2021), *SLC5A7* (que codifica o transportador de colina de alta afinidade – CHT1) (Rodríguez Cruz et al., 2021) e genes que codificam proteínas do complexo SNARE (Shen et al., 2014; Salpietro et al., 2017).

As SMCs sinápticas apresentam alterações de proteínas da fenda sináptica ou da lâmina basal associada (Maselli et al., 2012), sendo as mais comuns as relacionadas à localização e ancoramento da AChE (Ramdas; Beeson, 2021), enzima responsável pela quebra da molécula de ACh e consequente interrupção do estímulo. Algumas mutações descritas se referem aos genes *COLQ* (que codifica o colágeno associado à AChE e auxilia no seu ancoramento da

lâmina basal) (Ohno et al., 1998), *LAMB2* e *LAMA5* (que codificam lamininas, componentes da lâmina basal) (Matejas et al., 2010; Maselli et al., 2017), *COL13A1* (que codifica a cadeia não fibrilar de colágeno tipo XIII, essencial à maturação dos terminais pré e pós-sinápticos) (Rodríguez Cruz et al., 2019).

Já as SMCs do tipo pós-sinápticas são as mais comuns, e estão relacionadas normalmente aos receptores pós-sinápticos de ACh (Engel et al., 2015; Finsterer, 2019; Ramdas; Beeson, 2021). Em geral, há alteração dos receptores pós-sinápticos de ACh, normalmente relacionadas mutações nos genes responsáveis pela codificação de alguma das subunidades do receptor (Finsterer, 2019; Ramdas; Beeson, 2021). Também já foram descritas alterações nos canais para sódio dependentes de voltagem da célula muscular (Arnold et al., 2015), sendo que podem resultar em lenta abertura do canal, com conseqüente não geração de potencial de ação no músculo de forma eficiente, ou lentidão no fechamento, resultando em miopatia secundária de placa motora, com bloqueio de despolarização e dessensibilização dos receptores (Arnold et al., 2015; Ramdas; Beeson, 2021).

Estudos epidemiológicos apontam que a prevalência das SMCs varia consideravelmente entre regiões. Como mencionado por Finsterer (2020), estudos baseados em diferentes localidades reportam a ocorrência da doença com variação de 1,8 a 125 casos a cada 1 milhão de pessoas. A manifestação dos sintomas na primeira infância em pacientes com miastenia congênita é muito frequente (Kinali et al., 2008; Darras et al., 2015; Engel et al., 2015; Estephan et al., 2022) e o diagnóstico é desafiador, uma vez que os sintomas podem ser inespecíficos e/ou se sobrepor a outras disfunções neuromusculares. Normalmente, os sintomas se dão em conjunto, como fraqueza muscular flutuante, especialmente de músculos extraoculares e da cabeça, dificuldade respiratória, associada ou não a hipotonia ou apneia, e devem ser acompanhados de resultados negativos para anticorpos da Miastenia Gravis e resultados de eletromiografia que indiquem a redução da resposta muscular sob estimulação (Darras et al., 2015; Engel et al., 2015; Estephan et al., 2022). Infelizmente, dada a dificuldade do diagnóstico e possível tratamento não adequado, o óbito precoce de pacientes na infância ou adolescência é ainda presente (Kinali et al., 2008). Este é um fator que pode também influenciar a precisão dos dados epidemiológicos, uma vez que o diagnóstico incorreto pode significar a ocorrência das disfunções sem o devido registro.

#### 4 - O MODELO MURINO VACHT-KD

Dentre as diferentes ferramentas a serem utilizadas para o estudo aprofundado das doenças neurodegenerativas, bem como do desenvolvimento de terapias, destaca-se o uso de modelos animais geneticamente modificados. Esses modelos podem recapitular as características fenotípicas das disfunções, assim como os mecanismos celulares e moleculares que levam à degeneração (Dawson; Golde; Lagier-Tourenne, 2018). Diversas doenças neuromusculares têm tido seus mecanismos mais bem compreendidos a partir do uso dos modelos animais geneticamente modificados, como a Esclerose Lateral Amiotrófica, a Miastenia Gravis, a Doença de Huntington, as Síndromes Miastênicas Congênitas, entre tantas outras (Valadão et al., 2017; Dawson; Golde; Lagier-Tourenne, 2018; Yan et al., 2022).

Com o objetivo de investigar as consequências da expressão reduzida do VACHT para a neurotransmissão colinérgica, foi desenvolvido o modelo murino denominado VACHT-KD, *knock down* para o gene codificador desse transportador (Prado et al., 2006). A redução da expressão do gene *SLC18A3*, bem como a conseqüente redução da proteína VACHT, levam diretamente à diminuição no conteúdo de ACh nas vesículas exocitadas na transmissão sináptica. Essa alteração genética específica já foi descrita para pacientes humanos (O'Grady et al., 2016; Aran et al., 2017; Lamond et al., 2021; Pugliese et al., 2023), como uma das SMCs do tipo pré-sinápticas. O resultado da mutação é o surgimento de fraqueza muscular, que os animais modelo também apresentam, mimetizando as alterações dos pacientes. Vale ressaltar que, para humanos, os sintomas das SMCs se manifestam com frequência já na primeira infância, muitas vezes de forma grave, com sintomas que incluem hipotonia, ptose palpebral, apneia e falência respiratória (O'Grady et al., 2016; Aran et al., 2017; Lamond et al., 2021).

O modelo VACHT-KD foi gerado pela equipe dos nossos colaboradores, Professores Marco e Vânia Prado (Prado et al., 2006). No trabalho que descreveu o modelo, os autores demonstraram a expressão reduzida em cerca de 65% da proteína VACHT, nos animais VACHT-KD<sup>HOM</sup>, e de cerca de 45% nos animais VACHT-KD<sup>HET</sup>, o que resulta na disfunção da transmissão sináptica colinérgica (Fig. 6). Neste mesmo trabalho, através de testes de comportamento, foi observado que os animais VACHT-KD<sup>HOM</sup> apresentam alterações na função motora e que ambos VACHT-KD<sup>HET</sup> e VACHT-KD<sup>HOM</sup> apresentam alterações na função cognitiva, com disfunção de memória e de reconhecimento social e de objetos. Algumas disfunções cognitivas dos animais VACHT-KD<sup>HET</sup>, em especial para reconhecimento de objetos e aprendizagem motora, também foram demonstrados por De Castro e colaboradores (2009a), confirmando a importância da ACh também no sistema nervoso central para a cognição. O

modelo VAcHT-KD foi, portanto, considerado um excelente modelo para o estudo das SMC pré-sinápticas, especialmente por seus déficits motores que mimetizam o fenótipo miastênico (Magalhães-Gomes et al., 2018; Leite Schetino et al., 2019). A partir desse ponto, o termo VAcHT-KD se refere necessariamente aos animais homozigotos (VAcHT-KD<sup>HOM</sup>) do modelo *knock down* para o VAcHT, a não ser quando especificado.

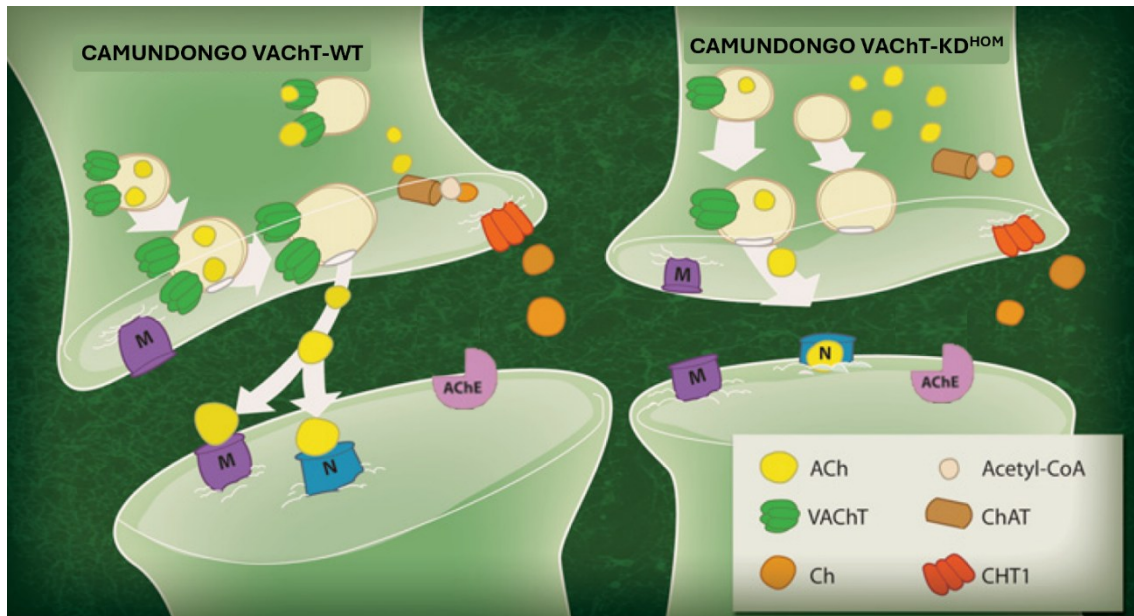


Figura 6. Desenho esquemático da terminação axonal colinérgica de camundongos com expressão reduzida do VAcHT. A representação à esquerda mostra a terminação de um camundongo selvagem (WT). A representação à direita mostra a terminação de um camundongo VAcHT-KD<sup>HOM</sup>. Algumas vesículas sinápticas não têm nenhum transportador e não são capazes de armazenar níveis significativos de ACh. Estas vesículas vão competir pelos sítios de liberação e reduzir a fusão de vesículas completamente repletas de ACh. Ch, colina; M, receptor muscarínico; N, receptor nicotínico. Adaptado de Prado et. al. (2013).

Além das características relacionadas à função e morfologia da JNM propriamente dita, como a redução do conteúdo quântico (Lima et al., 2010) e alteração da distribuição espacial e formato das vesículas sinápticas na terminação (Rodrigues et al., 2013), o modelo animal VAcHT-KD apresenta expressiva alteração dos padrões de comportamento motor. O trabalho que descreve o modelo demonstrou a redução da força total, da resistência e da capacidade de manutenção de atividade dos animais adultos (Prado et al., 2006). A baixa resistência e capacidade de manutenção de atividade também foram identificadas por nosso grupo de pesquisa, no trabalho de Magalhães-Gomes (2018), que também mostrou como o tratamento com medicamento anticolinesterásico levou à melhora parcial do desempenho motor dos animais nestes aspectos. Com relação aos animais VAcHT-KD de meia-idade, outro trabalho

do nosso grupo (Leite Schetino et al., 2019) apontou novamente os mesmos déficits motores, a partir de testes de comportamento realizados com os animais em idade entre 12 e 14 meses, demonstrando a continuidade das características resultantes da neurodegeneração para o modelo.

Interessantemente, um modelo animal *knock out* para o VAcHT (VAcHT<sup>del/del</sup>) foi também desenvolvido (De Castro et al., 2009b), com o objetivo de verificar se a liberação de ACh independente do transportador apresentava relevância fisiológica. Demonstrando novamente o papel crucial da ACh liberada pela exocitose das vesículas sinápticas nos diversos processos fisiológicos, inclusive para o desenvolvimento, o modelo, além de apresentar graves alterações anatômicas, não sobrevive após o nascimento, chegando à fatalidade por hipóxia em cerca de 2-5 minutos. Este modelo, portanto, não se mostrou adequado para os estudos longitudinais da deficiência do VAcHT, sendo o modelo VAcHT-KD ideal para este tipo de estudo, dada a sobrevivência dos animais até a idade adulta e além (Leite Schetino et al., 2019).

Outro modelo animal também foi desenvolvido por nosso grupo, em parceria com os Professores Vânia e Marco Prado, apresentando deleção completa do VAcHT somente em neurônios motores inferiores (Joviano-Santos et al., 2021). Utilizando a tecnologia Cre-LoxP, foi possível desenvolver junções neuromusculares *knock out* para o VAcHT em um animal que atingisse a idade adulta, permitindo assim a sua caracterização fenotípica, dentre outros. O animal denominado mnVAcHT-KD também apresenta déficits motores muito pronunciados, e é muito interessante para o estudo das JNM com ausência completa do VAcHT em animais adultos (Rossi et al., 2024).

## 5 - OS TESTES DE COMPORTAMENTO MOTOR

Testes de comportamento motor são amplamente utilizados na pesquisa pré-clínica, buscando avaliar funções motoras e cognitivas, compreender de maneira adequada a fisiopatologia e testar eficácia de novos tratamentos e/ou novos alvos terapêuticos (Rustay; Wahlsten; Crabbe, 2003; Takeshita et al., 2017; Prasad; Hung, 2020; Kamal et al., 2025). Uma vez que diferentes modelos animais mimetizam diferentes características específicas da disfunção, os testes de comportamento e os protocolos a serem utilizados devem ser adequados, permitindo a avaliação mais fidedigna com relação ao objetivo específico (Rustay; Wahlsten; Crabbe, 2003; Takeshita et al., 2017; Kamal et al., 2025). Levando isto em consideração, alguns testes de comportamento motor, citados adiante, se mostraram robustos e muito utilizados em diversas publicações, também para modelos animais de doenças neurodegenerativas e propósitos semelhantes, sendo considerados mais adequados aos objetivos deste trabalho.

Com relação aos animais em idade neonatal, diferentemente dos testes de comportamento para animais adultos, existem poucos trabalhos na literatura considerados consolidados e robustos (Spear; Penson; Linville, 1986; Romano et al., 2013) e há pouca ênfase para os testes de comportamento direcionados às habilidades motoras. É importante considerar que diversos trabalhos realizam os testes de comportamento, para os animais que foram submetidos a algum tipo de alteração na vida neonatal, somente a partir da idade juvenil ou adulta (Peng et al., 2015; Ranger et al., 2018; Laureano-Melo et al., 2022; Dutra-Tavares et al., 2023), não necessariamente executando os testes nos animais neonatos diretamente.

A bateria de testes descrita por Feather-Schussler e Ferguson (2016), desenvolvida inicialmente para um modelo de paralisia cerebral, é portanto muito interessante para se aferir os diferentes parâmetros relacionados ao comportamento motor dos camundongos em idade neonatal, bem como as características do desenvolvimento dos animais ao longo deste período.

Com relação aos animais em idade juvenil e adulta, enfatizamos os testes *Wire Hang*, *Grip Force* e *Rota Rod*, detalhados a seguir, muito robustos e direcionados à avaliação da força geral, resistência física e coordenação motora dos animais. O teste *Wire Hang*, mais especificamente sua variação que utiliza uma grade invertida, tem por principais objetivos aferir força muscular, coordenação e fadiga, medindo o tempo que o animal consegue se manter suspenso pelas quatro patas até a primeira queda. Descrito na década de 1960 (Kondziella, 1964; Kamal et al., 2025), e apresentando algumas variações em seguida, foi muito utilizado para aferir a força muscular global dos animais, sendo ainda comumente utilizado para diversos modelos animais, inclusive de doenças neurodegenerativas (Kangussu et al., 2022; Younger et

al., 2022; Lee et al., 2024).

O teste *Grip Force*, que também apresenta modificações a depender do objetivo e necessidade de redução de variabilidades (Takeshita et al., 2017), é muito utilizado para aferir a força de agarre dos animais (Maurissen et al., 2003; Takeshita et al., 2017; Kamal et al., 2025), tanto somente das patas dianteiras quanto de todas as patas simultaneamente. Já foi considerada a possibilidade de a massa corporal dos animais ser um fator que influencia o resultado do teste, pois representaria a composição de massa muscular dos animais. Atualmente, esta hipótese foi refutada em estudo que mostrou que a massa corporal não necessariamente está diretamente relacionada à composição da massa muscular dos animais, o que não influencia necessariamente o resultado do teste de força (Maurissen et al., 2003; Takeshita et al., 2017).

O teste da esteira giratória, *Rota Rod*, descrito na década de 1950 (Dunham; Miya, 1957), consiste em um aparelho com esteira capaz de rotacionar no próprio eixo, com variação de velocidade e separação das baias, de forma a abrigar o animal em uma região limitada do aparelho. Em geral, as características aferidas neste teste são a coordenação motora, equilíbrio e habilidade de manutenção da postura (Rustay; Wahlsten; Crabbe, 2003; Shiotsuki et al., 2010; Kamal et al., 2025), no entanto o uso deste teste já apresentou em diversas situações o objetivo de aferir a aprendizagem motora (Shiotsuki et al., 2010), buscando compreender se os animais apresentavam melhora do desempenho no teste dado o fator aprendizagem muito envolvido.

## 6 - JUSTIFICATIVA

Apesar da ampla caracterização do modelo VACHT-KD, como apresentado anteriormente, foram considerados para as análises da grande maioria dos trabalhos até o momento somente animais machos adultos. Os diversos trabalhos que contribuíram grandemente para a caracterização do fenótipo miastênico do modelo estudaram animais VACHT-KD em idade adulta, a partir de 3 meses, idade para qual o fenótipo e as disfunções fisiológicas já estão estabelecidos. Considerando que em humanos, as síndromes miastênicas congênitas podem apresentar sintomas a partir da primeira infância, se faz necessária a identificação do momento de início da manifestação do fenótipo miastênico neste modelo que tem se mostrado tão útil para o estudo das miastenias congênitas. Nossa hipótese foi de que os animais VACHT-KD neonatos já apresentem déficits motores, em comparação com os animais selvagens, como um reflexo dos déficits colinérgicos pela redução da expressão do VACHT.

Com relação às diferenças entre os sexos, apesar de não terem sido identificadas para SMCs em humanos, estas já foram descritas para outras disfunções neuromusculares (Doença de Huntington, Esclerose Múltipla e Esclerose Lateral Amiotrófica), bem como para outros modelos animais (Martineau et al., 2020) e doenças neurodegenerativas (Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer) (Gillies et al., 2014; Ullah et al., 2019). Portanto, fica clara a necessidade de se avaliar as características do modelo VACHT-KD tanto para animais machos quanto fêmeas, buscando identificar possíveis diferenças entre os sexos que estes animais podem vir a apresentar. Nossa hipótese é a de que os animais VACHT-KD machos e fêmeas se comportem de forma semelhante, com relação ao desempenho nos testes motores, uma vez que a redução da expressão do transportador mimetiza uma das miastenias congênitas do tipo pré-sináptica, para a qual ainda não foram identificadas diferença entre sexos para humanos.

A busca por janelas de tratamento mais favoráveis, no que diz respeito às disfunções neuromusculares determinadas geneticamente, especialmente antes do início do desenvolvimento dos sintomas, já é uma característica dos estudos clínicos e pré-clínicos, procurando pela alternativa terapêutica que possibilite um melhor prognóstico para o paciente (Darras et al., 2015). Logo, os dados obtidos deste trabalho podem apresentar novas informações relevantes que resultem em possíveis novas estratégias para terapias farmacológicas, fornecendo subsídios para um possível tratamento anteriormente ou no momento de início da manifestação dos déficits motores característicos.

## OBJETIVOS

### 1 - OBJETIVO GERAL

Investigar a ontogenia do fenótipo miastênico no modelo murino VAcHT-KD, com déficit colinérgico, do período pós-natal até a idade adulta.

### 2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de comportamento motor em camundongos VAcHT-KD e WT neonatos (p5 a p12) e identificar as possíveis diferenças de desempenho entre os genótipos.
- Realizar testes de comportamento motor em camundongos VAcHT-KD e WT juvenis (p30) e adultos (p60 a p120) e identificar as possíveis diferenças de desempenho entre os genótipos.
- Identificar possíveis diferenças de desempenho motor entre animais machos e fêmeas VAcHT-KD juvenis e adultos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1 - ANIMAIS

Os camundongos geneticamente modificados VACHT-KD, utilizados neste trabalho, foram originados como descrito no trabalho de Prado e colaboradores (2006), que criaram o modelo murino com expressão reduzida do VACHT. Através da técnica de recombinação homóloga, foi inserido um marcador *cassette* na região 5' não traduzida do gene para o VACHT. Utilizando um clone de bacteriófago isolado, contendo o ORF completo para o VACHT, bem como as sequências *upstream* e *downstream*, foi criado um vetor de direcionamento, contendo 9kb de DNA homólogo a jusante do *cassette* TK-Neo e 1.4kb a montante do *cassette* (Fig. 7A). O vetor foi eletroporado em células J1 ES, derivadas de camundongos 129/terSv. As células apresentando a mutação foram selecionados e injetados em blastocistos de camundongos C57BL/6, para produção do animal quimérico. A partir daí, permitindo cruzamentos com animais C57BL/6 selvagens, foram gerados os animais VACHT-KD Heterozigotos. A partir de cruzamentos em sequência dos animais Heterozigotos, foi possível obter os animais Homozigotos e WT. Esta técnica permitiu a interferência da transcrição do gene para o VACHT sem suprimi-la completamente, garantindo a sobrevivência dos animais. O modelo *knock-down* foi então denominado VACHT-KD (Fig. 7B), sendo VACHT-KD<sup>HET</sup> os animais Heterozigotos e VACHT-KD<sup>HOM</sup> os animais Homozigotos.

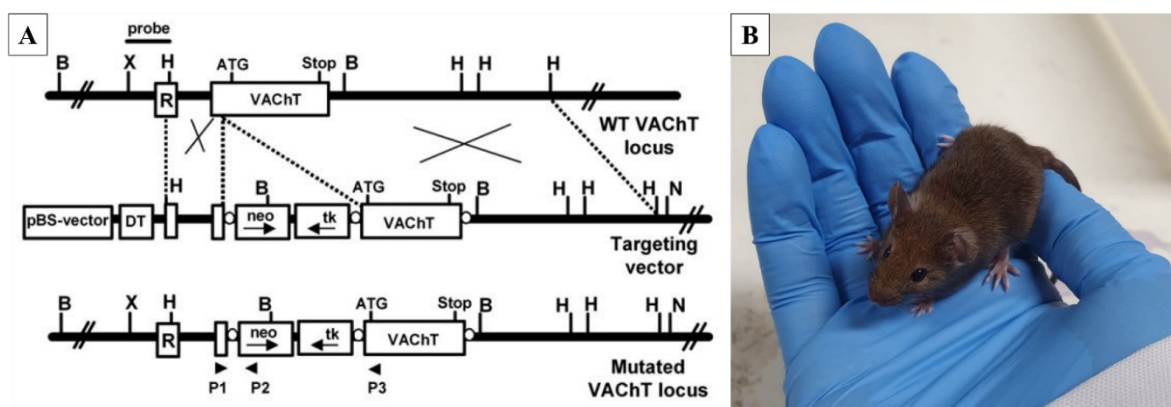


Figura 7. Modelo VACHT-KD. A: Representação esquemática da geração do modelo VACHT-KD. Acima, representação do *locus* gênico do VACHT; no centro, o vetor contendo a sequência TK-Neo na região próxima ao códon de iniciação ATG; abaixo o *locus* gênico do VACHT mutado. Adaptado de Prado et. al. (2006). B: Camundongo modelo VACHT-KD, dia pós-natal (p)30. Autoria própria.

Estes animais são atualmente mantidos no biotério do Departamento de Morfologia –

ICB/UFMG e todos os experimentos foram conduzidos com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 81/2021; 40/2025). O ambiente do biotério apresenta temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de 12 horas luz / 12 horas escuridão. Os animais foram mantidos em rack ventilada, com comida e água *ad libitum*, e a troca da cama de maravalha e a higienização do biotério realizadas, no mínimo, 1 vez por semana. Os animais neonatos foram mantidos na gaiola dos progenitores, enquanto os testes eram realizados. Aos 21 dias pós-natal, foi feito o desmame, juntamente com a coleta do fragmento de tecido para a genotipagem em seguida, separando-se os machos das fêmeas, sempre mantendo a organização de 2 a 5 animais por gaiola. Os animais adultos utilizados já haviam sido separados por sexo no desmame e a genotipagem já havia sido realizada.

## 2 - GENOTIPAGEM

Um fragmento de orelha de aproximadamente 3mm foi coletado para a genotipagem dos animais. O protocolo é constituído essencialmente de duas etapas: i) extração do DNA gênômico; ii) reação em cadeia da polimerase (PCR). Seguindo o protocolo descrito por De Castro e colaboradores (De Castro et al., 2009b), com alterações.

Para a extração de DNA, foi adicionada ao tecido a solução básica de lise (NaOH 1,25 M; EDTA 10mM), e as amostras incubadas a  $95^{\circ}\text{C}$ , por 45 minutos. Em seguida, foi adicionada à amostra a solução ácida de neutralização (Tris-HCl 2M), a amostra foi levada ao vórtex por 10 segundos, e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  por, no máximo, 7 dias.

As reações de PCR foram feitas em volume final de  $12\mu\text{L}$  por tubo, sendo  $0,75\mu\text{L}$  de cada um dos três Primers,  $2,75\mu\text{L}$  GoTaq® Green Master Mix e  $5\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Foram realizados 35 ciclos, sendo cada ciclo composto pelas etapas de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos, anelamento dos Primers a  $55^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, extensão do DNA a  $68^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto. Ao final, foi feita extensão a  $68^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, e os produtos foram levados imediatamente à eletroforese ou armazenados a  $4^{\circ}\text{C}$ , por até 48h. Em seguida, na eletroforese, as amostras foram corridas em gel de agarose 0,7%, que foi analisado em seguida, como demonstrado a seguir (Fig. 8).

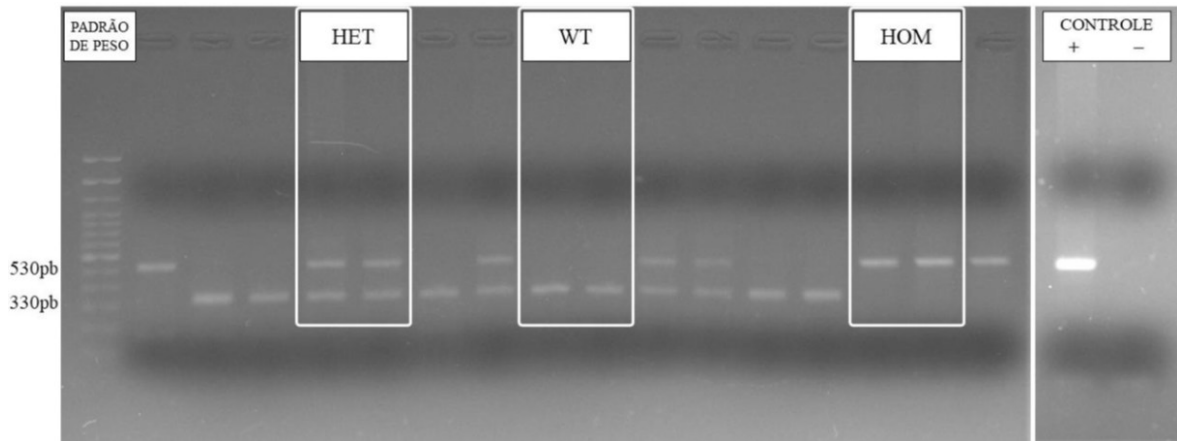


Figura 8: Imagem representativa de eletroforese em gel de agarose, do processo de genotipagem dos animais VACHT-KD. Destaques para a identificação das amostras VACHT-KD<sup>HET</sup>, WT e VACHT-KD<sup>HOM</sup>. Autoria própria.

### 3 - TESTES DE COMPORTAMENTO MOTOR

#### 3.1 - ANIMAIS NEONATOS

Com o objetivo de avaliar as habilidades motoras dos animais VACHT-KD neonatos, realizamos uma série de testes de comportamento motor, baseada no trabalho de Feather-Schussler e Ferguson (2016), que descreve uma bateria de testes para modelo murino de paralisia cerebral. Uma vez que o interesse era a capacidade motora dos animais, executamos os testes que mais apresentavam este propósito em específico. Adicionalmente, considerando que o trabalho afirma que os testes não apresentam possibilidade de interferência de aprendizagem e poderiam ser repetidos em sequência, executamos os testes em pontos de tempo sequenciais, dias pós-natal (p)05, 08, 10, 12, a fim de avaliar o desenvolvimento dos animais e suas habilidades motoras ao longo do tempo. Ainda, avaliamos a massa corporal dos animais em todos os dias de teste. O conjunto de testes de comportamento que realizamos está descrito a seguir e representado pelas fotografias (Fig. 9). Para os grupos experimentais, foi utilizado um N de 7 animais VACHT-KD e N de 9 animais WT.

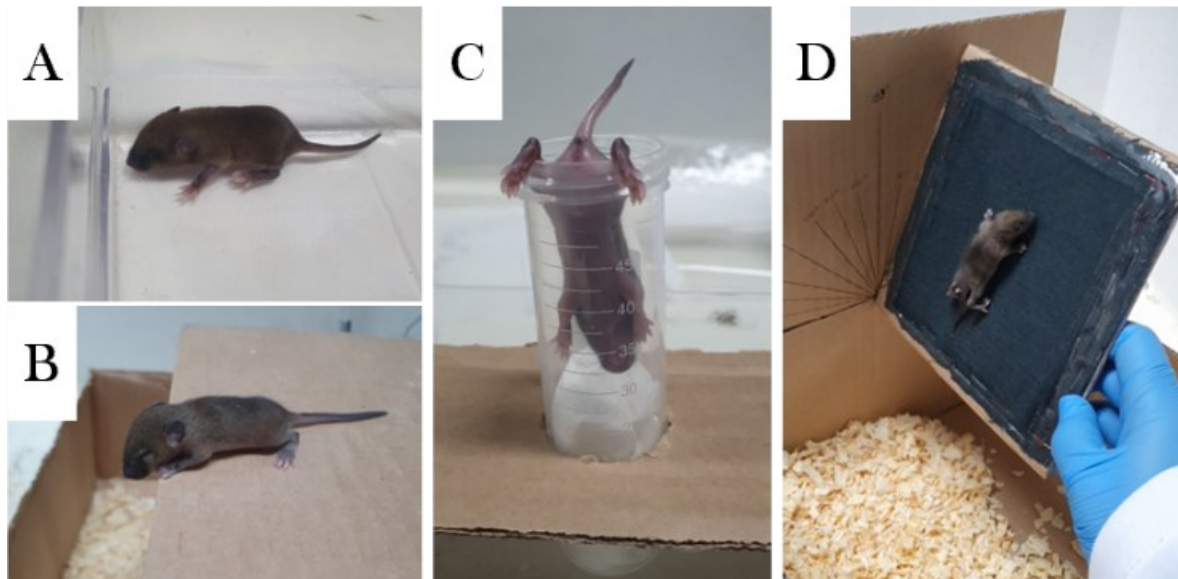


Figura 9. Fotografias representativas dos testes de comportamento para os animais neonatos. A: *Ambulation*; B: *Cliff Aversion*; C: *Hindlimb Suspension*; D: *Grip Strength*. Autoria própria.

### *Ambulation*

Para camundongos, sabe-se que a transição do movimento rastejando para caminhada se dá normalmente entre os dias p05 e p10. Os animais foram posicionados em caixa transparente, visível de cima, e um vídeo foi feito, registrando a movimentação, por 120 segundos. Quando o camundongo não se movia nos primeiros 30 segundos de teste, tocamos gentilmente a cauda para motivar a caminhada. Foi feita a classificação da caminhada, de acordo com o padrão determinado (consideramos movimento simétrico dos membros quando as patas traseiras encontravam as patas dianteiras em cada passo).

0	Nenhum movimento
1	Rastejando, com movimento assimétrico dos membros.
2	Rastejando, com movimento simétrico dos membros.
3	Rastejando rapidamente / caminhada

### *Hindlimb Foot Angle*

Utilizando os mesmos vídeos de registro da caminhada do teste *Ambulation*, capturamos as imagens de quando o animal se movia, ou tentava se mover, para a frente. Utilizando o Software FIJI ImageJ, medimos a angulação descrita entre as patas traseiras, considerando que este ângulo normalmente é maior quando o camundongo tem dificuldades no movimento, ou ainda não passou pela transição entre rastejamento e caminhada. Utilizamos na análise o valor da média dos ângulos de 3 imagens capturadas para cada animal.

### *Hindlimb Suspension*

Este teste foi desenvolvido para avaliar se a força das patas traseiras dos animais se encontra alterada. Utilizando um tubo de fundo cônico tipo Falcon de 50mL, posicionamos gentilmente o camundongo com a cabeça direcionada para o interior do tubo, apoiado nas bordas pelas patas traseiras, e medimos a latência para a queda. Utilizamos na análise o valor da média das 3 tentativas para cada animal. Também foi feita a variação do teste, o *Hindlimb Suspension Scored*, no qual classificamos a postura das patas traseiras e da cauda, usando o padrão descrito a seguir.

0	Patras traseiras se tocando constantemente, com a cauda baixa, ou incapacidade de se segurar no tubo
1	Patras traseiras se tocando constantemente, com a cauda erguida.
2	Patras traseiras próximas, se tocando com frequência, com a cauda erguida.
3	Patras traseiras próximas, se tocando com pouca frequência, com a cauda erguida.
4	Patras traseiras separadas, com a cauda erguida.
5	O camundongo foi capaz de se erguer sozinho para fora do tubo.

Observação: A nota 4 indica separação normal entre as patas traseiras; nota 3 indica alguma fraqueza aparente; nota 2 indica fraqueza; nota 1 indica evidente fraqueza; nota 0 indica evidente fraqueza, com falha ao tentar se segurar no tubo.

### *Grip Strength*

Este teste avalia força das quatro patas juntas. Posicionamos gentilmente o animal no centro de uma placa, coberta com tela fina, que permitia que o animal se agarrasse a ela e se segurasse. Em seguida, rotacionamos a placa lentamente, elevando-a da posição horizontal para a vertical (com máximo de 180°) e medimos o ângulo até o qual o animal se mantinha suspenso na tela. Uma cama de maravalha foi posicionada logo abaixo, para evitar que o animal sofresse ferimentos ao se soltar. Utilizamos na análise o valor da média das 3 tentativas para cada animal.

### *Grasping Reflex*

Aferindo o reflexo para cada pata individualmente, este teste pode ser usado para identificar problemas no reflexo de agarre, tanto das patas dianteiras quanto das patas traseiras. Gentilmente fizemos a contenção do animal e aferimos o reflexo das patas, utilizando a parte arredondada de uma lâmina, posicionando-a na região plantar (se o animal executou o

movimento de fechamento da pata, o reflexo foi considerado positivo). Registramos se houve a presença do reflexo, separadamente para as patas dianteiras e para as patas traseiras.

### *Cliff Aversion*

Este teste permite verificar força e coordenação do animal, bem como os reflexos vestibulares. Utilizando uma caixa ampla, coberta com maravalha, com uma plataforma elevada no centro, posicionamos lentamente o animal no limite da plataforma, com as patas dianteiras e o focinho direcionados para baixo. Registramos o tempo que o animal levou para conseguir se posicionar inteiramente longe da borda, com tempo limite de 30 segundos. Se o camundongo caísse da borda na cama de maravalha abaixo, repetíamos o teste uma vez. Utilizamos na análise o valor da média das 3 tentativas para cada animal.

## 3.2 - ANIMAIS ADULTOS

Estes testes foram realizados para os animais juvenis (p30) e adultos (p60, p90 e p120). Os testes foram sempre realizados no mesmo horário do dia, dentro do intervalo de duas horas iniciando ao meio-dia, sendo que o experimentador não tinha ciência do genótipo dos indivíduos ao executar os testes. Nosso grupo de pesquisa e outros colaboradores já descreveram estes testes de comportamento motor para adultos, como no trabalho de Prado et. al. (2006) e Magalhães-Gomes et. al. (2018). Nós realizamos os testes *Wire Hang*, *Grip Force* e *Rota Rod*, detalhados a seguir e representados pelas fotografias (Fig. 10). Para todos os grupos experimentais, animais VChT-KD machos e fêmeas, e animais WT machos e fêmeas, o N foi de 7 animais, com exceção do teste *Rota Rod* para animais adultos nunca expostos ao aparelho, para o qual o N está especificado nos resultados.

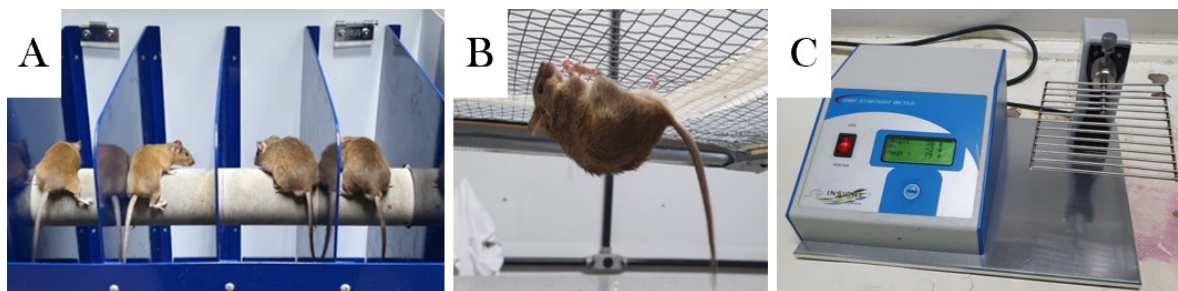


Figura 10. Fotografias representativas dos testes de comportamento para os animais juvenis (p30) e adultos (p60 - p120). A: *Rota Rod*; B: *Wire Hang*; C: *Grip Force* (equipamento). Autoria própria.

### *Wire Hang*

Para o teste *Wire Hang* – grade invertida – os animais foram gentilmente posicionados no centro de uma grade de metal (de tamanho 220mm x 220mm, com o espaçamento de 10mm entre as grades) que foi imediatamente invertida e elevada a 700mm da superfície (uma cama de maravalha foi posicionada logo abaixo, para evitar que o animal sofresse ferimentos pela queda). O animal foi permitido se segurar na grade por tempo máximo de 120 s. Registramos a latência do animal para a queda, e utilizamos na análise o valor da média de 3 tentativas para cada animal.

### *Grip Force*

Para o teste *Grip Force* – força de agarre – foi registrada a força das patas do animal. O camundongo, gentilmente seguro pela base da cauda, era permitido se agarrar ao equipamento e em seguida puxado para trás rapidamente. O equipamento, um transdutor de força, registrava em gramas (g) a força exercida pelo camundongo. O teste foi dividido em dois, sendo que no *Grip Force* o animal segurava o equipamento somente com as duas patas dianteiras, e no *All Limb Grip Force*, ele o segurava com todas as patas. Ambos os testes foram feitos em tríades. O valor da média das três tentativas foi convertido para Newtons (N) utilizando a equação  $g * 0,0098 = N$ , e foi este valor utilizado para as análises.

### *Rota Rod*

Para o teste *Rota Rod* – esteira giratória – permitimos que o animal passasse por um processo de ambientação ao aparelho no primeiro dia, à velocidade constante de 5rpm, por 120s, 5 vezes, com um intervalo de 600s entre cada tentativa. No segundo dia, o teste foi realizado somente uma vez, com velocidade aumentando gradativamente de 5rpm a 20rpm, por tempo máximo de 300s. Se o animal sofresse queda da esteira, era recolocado para continuar o teste, dentro do tempo estabelecido, com número máximo de 10 quedas (limite estabelecido para evitar o sofrimento dos animais). Para este teste aferimos tanto o tempo de latência do animal para sua primeira queda quanto o número de quedas que apresentava dentro do tempo de teste.

## 4 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram inicialmente armazenados em planilhas, utilizando *Microsoft Office Excel*, e organizados já da forma mais adequada exigida pelo software *GraphPad Prism8*, que foi utilizado em seguida para as análises. O primeiro teste realizado com cada um dos

grupos experimentais foi a identificação de dados *outliers*, através do método ROUT – *robust regression and outlier removal* – recomendado pelo próprio software, que não identificou nenhum dado deste tipo em nenhum dos grupos experimentais. Em seguida, foi feito o teste de normalidade Shapiro-Wilk (recomendado para grupos com menos de 50 observações), com a finalidade de verificar se os dados dos grupos apresentavam distribuição normal, o que foi positivo para todos os grupos experimentais.

O teste realizado em seguida foi a análise de variância (ANOVA). Dada a organização das nossas variáveis independentes, optamos por executar o ANOVA de 2 fatores, para os testes cujos resultados foram quantitativos. Para o teste, selecionamos a opção “mixed-effects model” e o teste de Tukey para as comparações múltiplas. Com relação aos testes cujos resultados eram variáveis qualitativas, realizamos o teste Qui-quadrado, da forma padrão sugerida pelo software.

Em seguida, realizamos a análise do componente principal (PCA), considerando todos os resultados como um sistema único, inicialmente para os dados de animais neonatos e em seguida para os animais adultos. Ainda, nos atentamos para a análise de redundância (RDA), derivada da PCA, como uma observação para a contribuição das variáveis explicativas sobre as variáveis resposta. Novamente, utilizamos *Microsoft Office Excel* para organizar os dados, e estes últimos testes foram realizados utilizando os programas *R* e *R studio*.

Com o objetivo de verificar o possível desenvolvimento de aprendizagem motora dos animais, ao realizar o teste *Rota Rod* repetidamente, fizemos o cálculo para o índice de aprendizado motor *Motor Learning Index* (MLI), utilizando o resultado do tempo de latência que os animais apresentaram ao executar o teste. O cálculo foi feito de acordo com o trabalho de Kao e colaboradores (2015), utilizando a equação  $MLI_n = (T_n - T_{n-1}) / T_{n-1} \times 100 \%$  que compara o desempenho no teste do grupo com o seu próprio desempenho no *time-point* anterior.

## RESULTADOS

### **Animais VChT-KD neonatos apresentam diferenças de desempenho em testes de comportamento, em comparação com os animais WT.**

Inicialmente, verificamos a massa corporal dos animais, aferida em todos os *time-points*. Uma vez que nosso interesse era avaliar principalmente a performance motora dos animais nos testes de comportamento, era necessário verificar se o peso era um fator de interferência nos resultados. Observamos que a massa corporal dos animais não diferia entre os genótipos, além de que nenhum dos animais submetidos aos testes apresentou peso fora dos valores esperados para a média dos grupos. Concluímos, portanto, que não houve influência da massa corporal dos animais sobre o seu desempenho motor nos testes.

Em seguida, analisamos os resultados de cada teste, considerando ambos os genótipos e todos os *time-points* para cada um deles. Utilizamos a análise de variância (ANOVA) de 2 fatores, considerando as duas variáveis explicativas neste caso, para aqueles testes cujas variáveis resposta foram quantitativas, e o teste Qui-Quadrado, para aqueles testes cujas variáveis respostas foram categóricas (Fig. 11).

Os testes *Hindlimb Foot Angle* (Fig. 11B), *Hindlimb Suspension* (Fig. 11C), *Grip Strength* (Fig. 11E) e *Cliff Aversion* (Fig. 11G) não indicaram diferenças quanto ao desempenho dos animais entre os genótipos. No entanto, com relação aos testes *Ambulation* (Fig. 11A), *Hindlimb Suspension Scored* (Fig. 11D) e *Grasping Reflex* (Fig. 11F), os animais VChT-KD obtiveram performance diferente dos animais WT. Foi possível verificar nos resultados, para o teste *Ambulation*, que um maior número dos animais VChT-KD apresentou score mais baixo que os animais WT nos últimos dias de teste. Este é um indicativo de que os animais parecem apresentar um certo atraso no desenvolvimento dos padrões de caminhada, por não apresentarem a classificação semelhante aos animais selvagens da mesma idade.

No teste *Hindlimb Suspension Scored*, os animais VChT-KD apresentaram características compatíveis com fraqueza muscular, no posicionamento do corpo e da cauda, como descrito pelo trabalho de Feather-Schussler e Ferguson (2016), não se apresentando capazes de se sustentar no aparato como os animais WT. Para o teste *Grasping Reflex*, os animais VChT-KD também se mostraram diferentes dos selvagens para o reflexo de fechamento da pata positivo. No entanto, não está muito evidente onde se encontra a diferença na distribuição dos dados, uma vez que ambos os genótipos variam a frequência de reflexos positivos nas patas traseiras ao longo dos *time-points*.

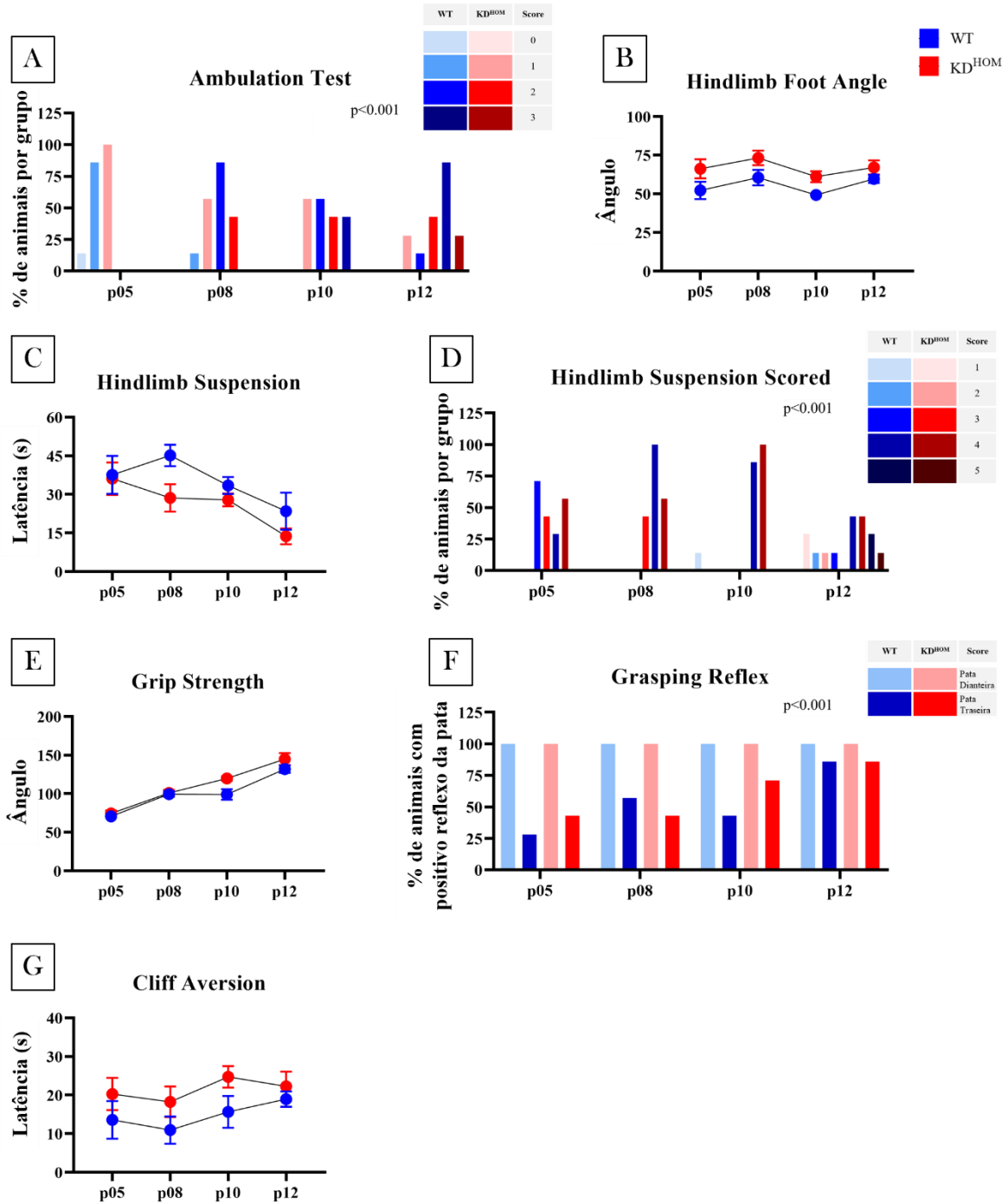


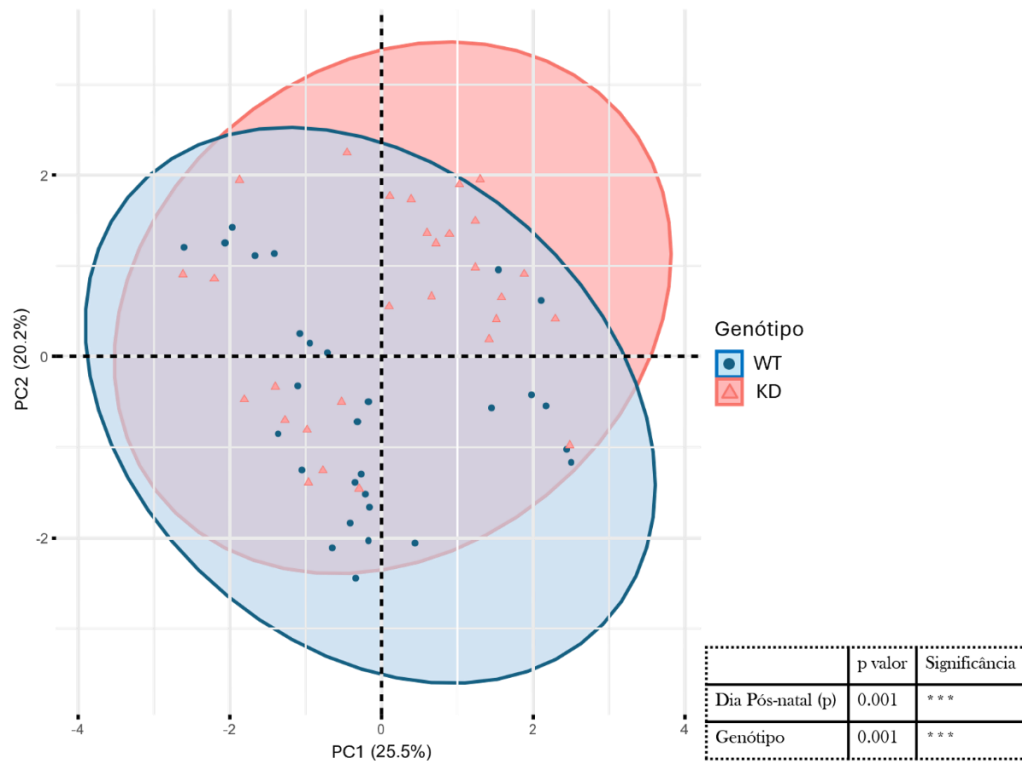
Figura 11: Análises de Variância dos testes de comportamento para os animais neonatos, comparações entre os animais VAcHt-KD e WT. Qui-quadrado (A, D e F) e ANOVA (B, C, E e G). A: *Ambulation Test*; B: *Hindlimb Foot Angle*; C: *Hindlimb Suspension*; D: *Hindlimb Suspension Scored*; E: *Grip Strength*; F: *Grasping Reflex*; G: *Cliff Aversion*. WT, N = 9; VAcHt-KD, N = 7. Média ± EPM.

**A Análise de Componente Principal (PCA) indica que genótipo e idade são as variáveis independentes que melhor explicam a distribuição dos dados para os animais neonatos.**

Prosseguindo as análises de desempenho nos testes de comportamento, executamos a análise do componente principal (PCA), que considera todas as variáveis, explicativas e resposta, assim como suas interações, como um sistema único. Os resultados da PCA indicam que, para os animais neonatos, genótipo ( $p < 0,001$ ) e idade ( $p < 0,001$ ) são as variáveis independentes que melhor explicam a distribuição dos dados. Para estas análises, os componentes principais PC1 e PC2 explicam cerca de 50% da distribuição dos dados. Apesar de esta ser uma limitação desta análise, que reduz de certa forma a dimensionalidade dos dados, quando consideramos a representação gráfica (Fig. 12A), é possível observar que as elipses representando os genótipos apresentam uma área de não sobreposição, indicando certa distância entre os grupos VChT-KD e WT, o que significa que há certa diferença na distribuição dos dados de cada grupo.

Ainda, executamos a análise de Redundância (RDA), um teste derivado da PCA, buscando compreender melhor o quanto das variáveis resposta poderiam ser explicados pelas variáveis explicativas. Observamos, por comprimento e proximidade dos vetores (setas azuis) com os eixos na representação gráfica (Fig. 12B), que o genótipo e o dia pós-natal são variáveis explicativas muito influentes na distribuição dos dados das variáveis resposta, i.e., o desempenho nos testes de comportamento, em concordância com os resultados da PCA.

### A Análise do Componente Principal (PCA)



### B Análise de Redundância (RDA)

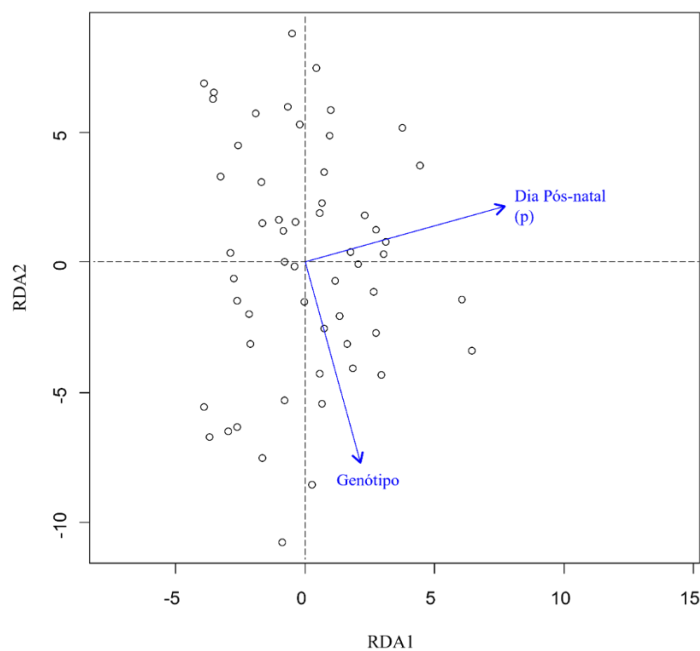


Figura 12: Análise do Componente Principal e Análise de Redundância dos testes de comportamento para os animais neonatos, indicando que genótipo e idade são as variáveis mais influentes na distribuição dos dados. A: PCA, contendo as elipses representativas dos dados entre genótipos; B: RDA, contendo vetores representativos da influência das variáveis explicativas nas variáveis resposta. WT, N = 9; VACHT-KD, N = 7.

### **Animais VChT-KD apresentam déficits motores a partir de um mês de idade, em comparação com os animais WT.**

Novamente, verificamos se a massa corporal dos animais não foi um fator influente para o desempenho motor nos testes. Este parâmetro foi aferido em todos os *time-points*, e os animais de ambos os genótipos, bem como de ambos os sexos, apresentaram massa corporal semelhante ao longo dos dias de teste, sendo que nenhum deles apresentou peso fora da margem esperada para a idade. Concluimos, portanto, que, novamente, a massa corporal não influenciou o desempenho dos animais nos testes realizados.

Analizamos, a seguir, a performance dos animais adultos nos testes de comportamento separadamente. Utilizamos a análise de variância (ANOVA) de dois fatores, dadas as variáveis explicativas, e comparamos a performance dos animais entre os genótipos, considerando os grupos dentro do mesmo sexo.

Para o teste *Wire Hang*, que exige grande força e resistência física dos animais para que se mantenham suspensos na grade invertida, os animais VChT-KD apresentaram performance muito reduzida em comparação com os animais WT, tanto para os machos quanto para as fêmeas, em todos os *time-points* (Fig. 13A). A fraqueza muscular dos animais mutados é muito evidente, já que estes só são capazes de se manter suspensos por um período muito curto, em comparação com os animais selvagens.

Com relação ao teste *Grip Force*, as diferenças entre genótipos, evidenciando desempenho reduzido dos animais VChT-KD, foram identificadas em p90 e p120, e para o *All Limb Grip Force* em p120, ambos somente para os animais machos (Fig. 13B).

Quanto ao teste *Rota Rod*, as fêmeas VChT-KD apresentaram menor tempo de latência e maior número de quedas desde p30 até p90, e os machos apresentaram estas características em p60 (Fig. 13C). Em p120, de forma surpreendente, os animais VChT-KD não apresentaram diferenças de desempenho no teste, em comparação com os animais WT.

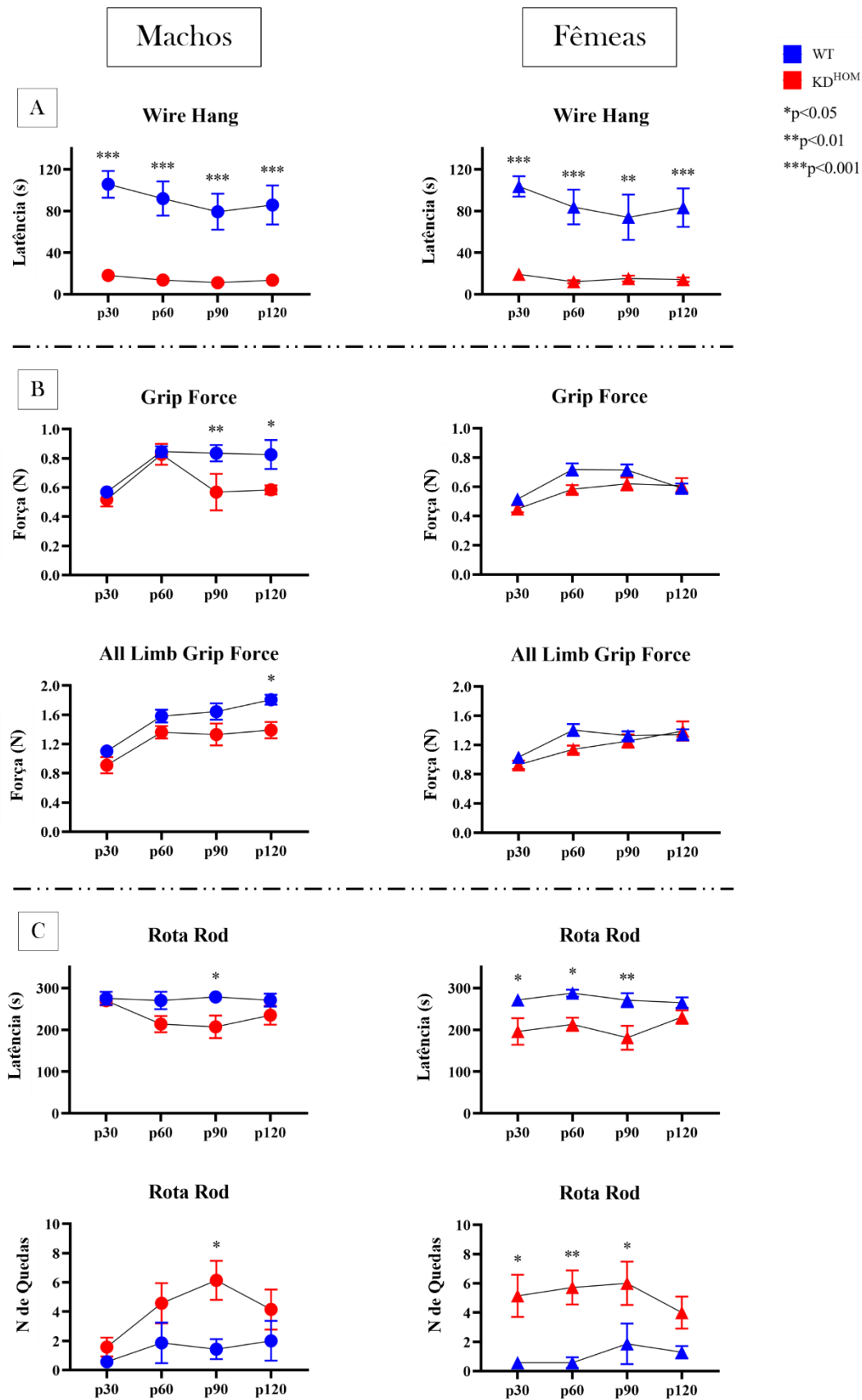


Figura 13: Análises de Variância dos testes de comportamento para os animais adultos, comparações entre os genótipos, sendo machos à esquerda e fêmeas à direita. A: *Wire Hang*; B: *Grip Force*; C: *Rota Rod*. WT machos, N = 7; WT fêmeas, N = 7; VACHT-KD machos, N = 7; VACHT-KD fêmeas, N = 7. Média ± EPM.

### **Animais machos e fêmeas juvenis e adultos apresentam performance semelhante nos testes de comportamento.**

Uma vez que identificamos diferenças de desempenho motor entre os genótipos para os animais neonatos, prosseguimos com a caracterização do fenótipo motor comparando inicialmente os animais machos e fêmeas, dentro de cada genótipo. Vale ressaltar que não foi feita a diferenciação por sexo nos experimentos anteriores pela impossibilidade de distinção dos animais por sexo na idade neonatal.

Quando realizamos as comparações de performance no comportamento motor entre os sexos, observamos que os animais machos e fêmeas, comparados dentro do grupo de seu próprio genótipo, apresentaram resultados muito semelhantes entre si, especialmente para o teste *Wire Hang* (Fig. 14A), com apenas algumas diferenças pontuais observadas no *Grip Force* e no *Rota Rod*. Uma diferença entre os sexos foi observada no teste *Grip Force* (Fig. 14B) em p120 para os animais WT e em p60 para os animais VChT-KD, sendo que os machos apresentaram mais força que as fêmeas em ambas as situações. Outra diferença foi observada no teste *Rota Rod* (Fig. 14C) em p30, sendo que os machos apresentaram maior tempo de latência no aparelho e menor número de quedas, em comparação com as fêmeas.

As diferenças encontradas aparentam ser um reflexo do desenvolvimento da força e resistência física dos machos jovens, ligeiramente mais pronunciada do que nas fêmeas, e que não se mantém ao longo de todos os *time-points*. Uma vez que tais diferenças não se repetiram, e não foram evidentes para todos os testes, não parecem ser significativas o suficiente para considerar comportamento motor diferente entre os sexos neste caso.

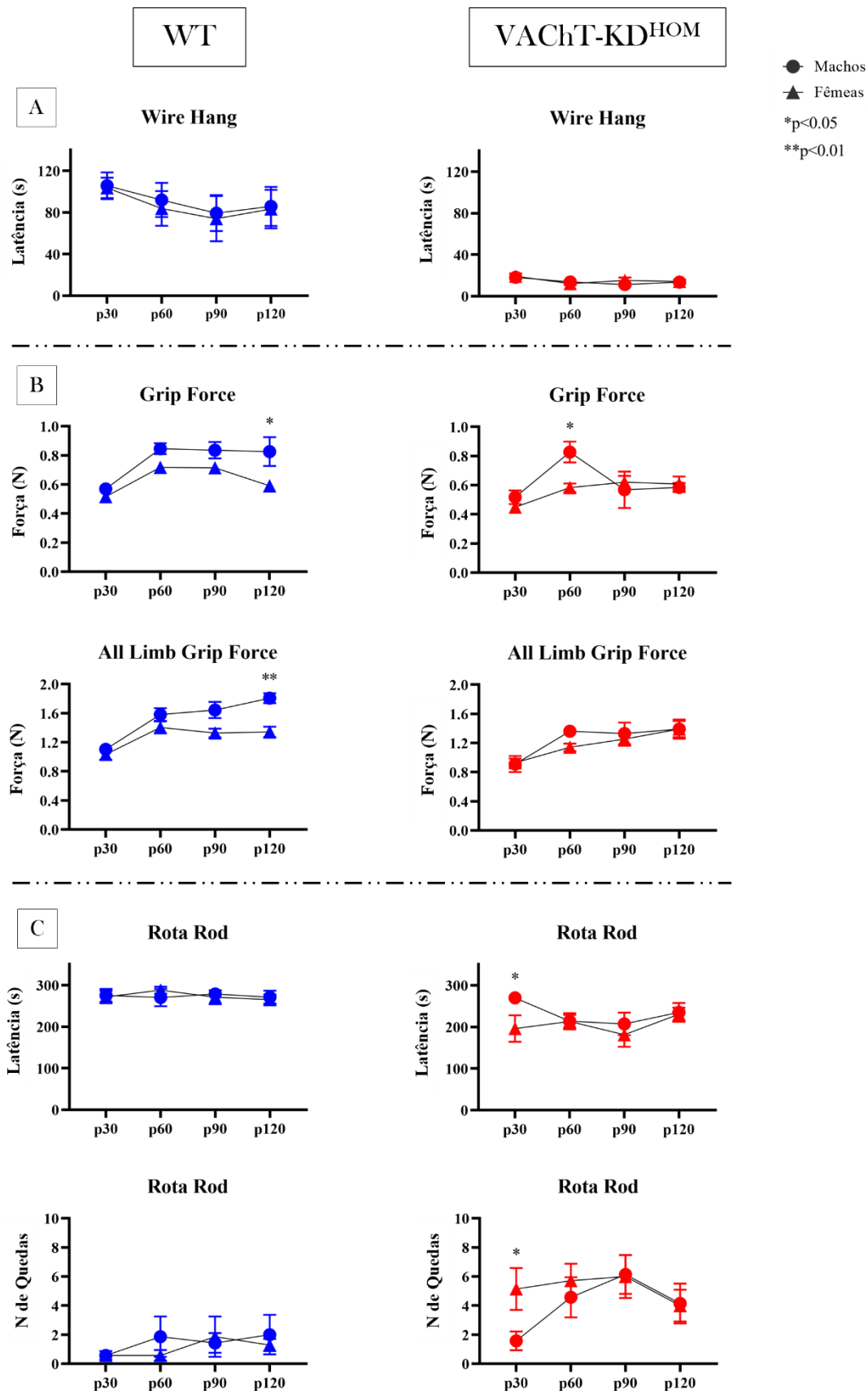


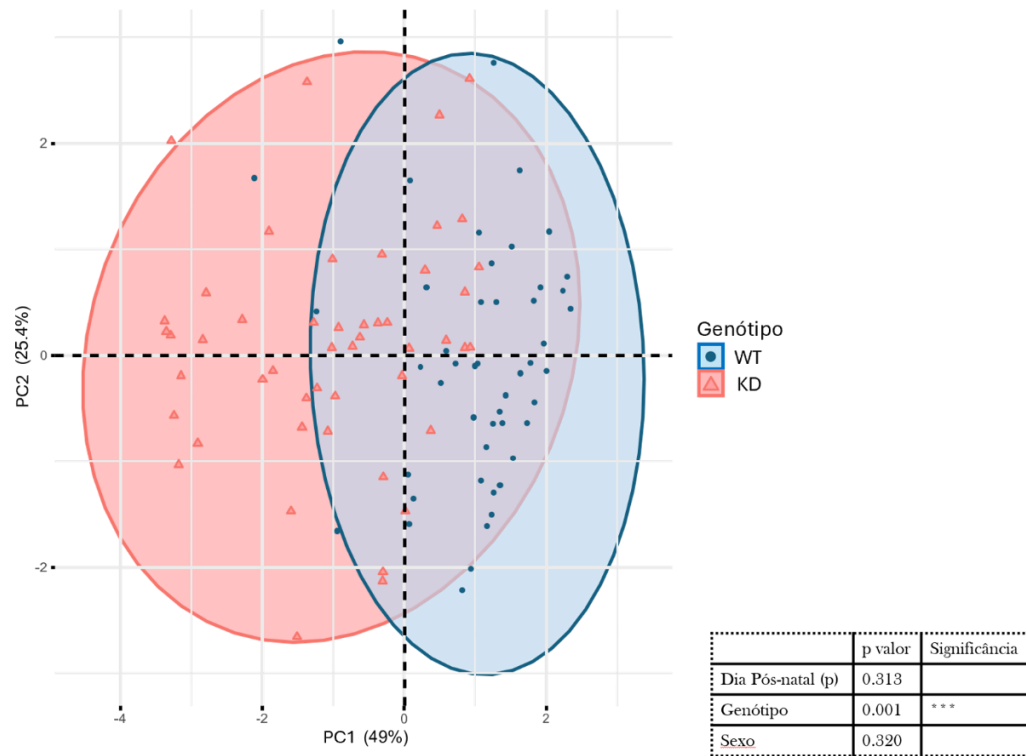
Figura 14: Análises de Variância dos testes de comportamento para os animais adultos, comparações entre os sexos, sendo animais WT à esquerda e VACHT-KD à direita. A: *Wire Hang*; B: *Grip Force*; C: *Rota Rod*. WT machos, N = 7; WT fêmeas, N = 7; VACHT-KD machos, N = 7; VACHT-KD fêmeas, N = 7. Média ± EPM

**A Análise de Componente Principal (PCA) indica que genótipo é a variável independente que melhor explica a distribuição dos dados para os animais juvenis e adultos.**

Novamente, consideramos todas as variáveis e suas interações dentro de um sistema único e executamos a PCA. Os resultados indicam que o genótipo ( $p < 0,001$ ) foi a variável independente que melhor explica a distribuição dos dados no sistema, como podemos observar nas grandes regiões de não sobreposição das elipses no gráfico (Fig. 15A). Para esta análise, os componentes principais PC1 e PC2 foram capazes de representar cerca de 74% da distribuição dos dados.

Considerando também a Análise de Redundância (RDA), observando o comprimento e proximidade dos vetores com os eixos, o genótipo influenciou de forma significativa na distribuição dos dados (Fig. 15B). O vetor que indica o sexo no gráfico também apresenta uma certa influência desta variável explicativa na distribuição dos dados, no entanto esta diferença não parece ser suficiente para ser identificada na PCA, tampouco nas análises de variância. O vetor que representa o dia pós-natal é um vetor curto, o que indica que não é uma variável muito influente para a distribuição dos dados neste sistema, confirmando novamente os resultados da PCA.

### A Análise do Componente Principal (PCA)



### B Análise de Redundância (RDA)

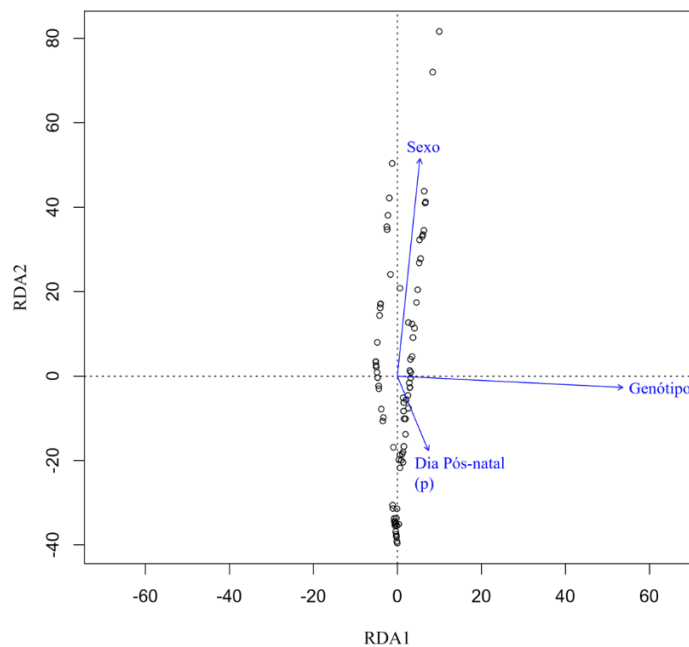


Figura 15: Análise do Componente Principal e Análise de Redundância dos testes de comportamento para os animais juvenis e adultos, indicando que genótipo é a variável mais influente na distribuição dos dados. A: PCA, contendo elipses representativas dos dados entre genótipos; B: RDA, contendo vetores representativos da influência das variáveis explicativas nas variáveis resposta. WT machos, N = 7; WT fêmeas, N = 7; VACHT-KD machos, N = 7; VACHT-KD fêmeas, N = 7.

### Índice de Aprendizado Motor mostra que os animais VACHT-KD apresentam melhora do desempenho no teste *Rota Rod*.

A ausência de diferenças significativas nos parâmetros do teste *Rota Rod* em p120 foram de fato surpreendentes, uma vez que diversos outros trabalhos (tanto do nosso grupo de pesquisa quanto de colaboradores) apresentam tais diferenças entre os genótipos para os animais a partir de 3 meses de idade. Em vista desses resultados, levantamos a hipótese de que estes animais poderiam estar apresentando um nível de aprendizagem que os permitia ter a capacidade de executar o teste com performance mais semelhante à dos animais selvagens. Dessa forma, é possível que a ausência da diferença entre os genótipos em p120 tenha se dado devido a essa característica.

Executamos, portanto, o teste para verificar o índice de aprendizado motor (MLI – *Motor Learning Index*), utilizando os resultados do tempo de latência no *Rota Rod*. O resultado do teste indica, como observado pelos valores positivos no gráfico (Fig. 16), que os animais VACHT-KD, machos e fêmeas, apresentam melhora do desempenho motor no *Rota Rod* quando chegam à idade p120, em comparação com o próprio desempenho no *time-point* anterior (p90), apesar de não terem sido identificadas diferenças estatísticas entre os genótipos.

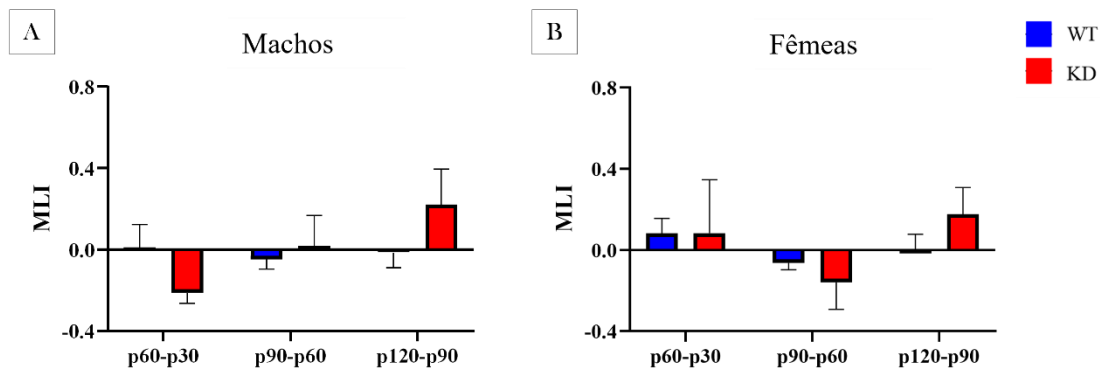


Figura 16: Índice de Aprendizado Motor (MLI) do teste *Rota Rod*, para os animais juvenis e adultos. Barras de valor positivo indicam que os animais apresentaram maior tempo de latência no aparelho em comparação com o *time-point* anterior. A: MLI para os animais Machos; B: MLI para os animais Fêmeas. WT machos, N = 7; WT fêmeas, N = 7; VACHT-KD machos, N = 7; VACHT-KD fêmeas, N = 7. Média ± EPM.

**Animais VChT-KD em p120, nunca expostos ao teste *Rota Rod*, apresentam déficits motores evidentes, em comparação com os animais WT.**

Ainda buscando testar a hipótese da aprendizagem motora para os animais VChT-KD, utilizamos novos grupos de animais mutados e selvagens, nunca expostos ao teste *Rota Rod*, e refizemos o teste em p120, ou seja, na idade adulta, na qual são esperados os déficits motores para o modelo.

Para este novo grupo, animais VChT-KD, tanto machos quanto fêmeas, apresentaram performance pior, em comparação com os animais WT (Fig. 17). Os déficits motores do modelo foram evidenciados, sendo que o tempo de latência foi consideravelmente reduzido (Fig. 17A) e o número de quedas aumentado (Fig. 17B), em comparação com os selvagens, confirmando, portanto, a hipótese de que os animais apresentam um fator aprendizagem se o teste for realizado com frequência mensal.

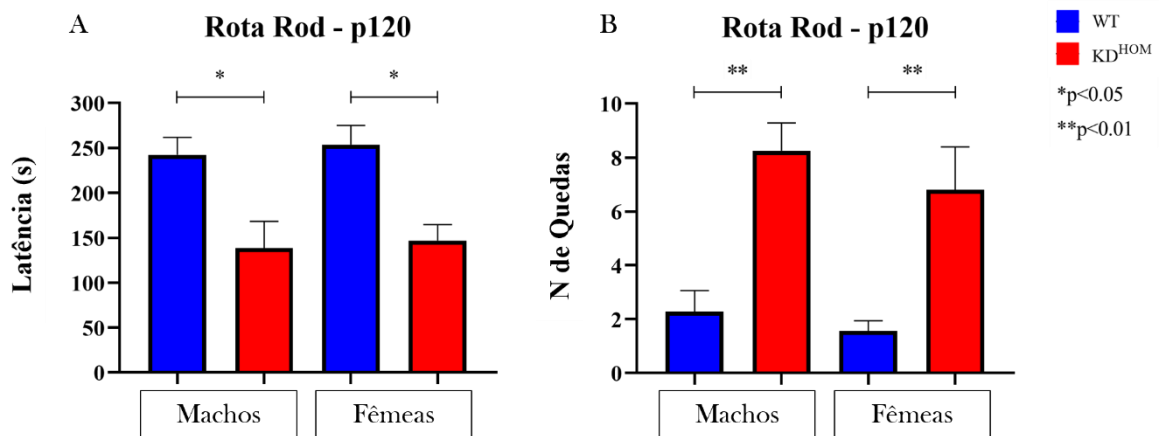


Figura 17: Análise de Variância (ANOVA de 2 fatores) do teste *Rota Rod*, para animais adultos nunca expostos ao aparelho. A: Tempo de Latência; B: Número de Quedas. WT Machos, N = 7; VChT-KD<sup>HOM</sup> Machos, N = 5; WT Fêmeas, N = 7, VChT-KD<sup>HOM</sup> Fêmeas, N = 6. Média ± EPM.

## DISCUSSÃO

A partir do desenvolvimento de estudos em genética foi possível utilizar da tecnologia de alteração gênica para a criação de diversos modelos animais para doenças neurodegenerativas. Os modelos são caracterizados por mimetizar, em diversas características e até certo ponto, os aspectos fisiopatológicos das disfunções humanas, permitindo a avaliação do desenvolvimento dos sintomas, de sua progressão e respostas a diferentes terapias (Dawson; Golde; Lagier-Tourenne, 2018). Apesar dos modelos animais ainda apresentarem divergências com relação aos aspectos observados nas disfunções em seres humanos, ainda assim são de extrema importância para a melhor compreensão principalmente dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos com a degeneração.

Algumas das disfunções neurodegenerativas mimetizadas por modelos animais apresentam sintomas motores muito característicos, como a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), a Doença de Huntington (DH) e a Miastenia Gravis (MG) (Valadão et al., 2017; Dawson; Golde; Lagier-Tourenne, 2018; Yan et al., 2022). Assim como estes e outros modelos murinos, o modelo VChT-KD (Prado et al., 2006) tem se mostrado excelente para o estudo das Síndromes Miastênicas Congênitas. Este modelo é muito interessante pois sua alteração genética é pré-sináptica, já foi descrita para humanos (O'Grady et al., 2016; Aran et al., 2017; Lamond et al., 2021; Pugliese et al., 2023) e mimetiza a fraqueza muscular tão características das SMCs. Ainda, o modelo VChT-KD apresenta longevidade, diferente de outros modelos como o VChT<sup>del/del</sup> (*knock-out* para o VChT) e o ChAT<sup>-/-</sup> (com deleção da enzima colinaacetiltransferase), que apresentam alterações de desenvolvimento pré-natal e morte logo após o nascimento (De Castro et al., 2009b; Misgeld et al., 2002).

Como já citado anteriormente, a mutação no gene para o VChT é uma alteração do tipo pré-sináptica da sinapse colinérgica, e já foi descrita para humanos. Em geral, o sintoma característico é a fraqueza muscular, que se manifesta com frequência ainda na primeira infância e envolve fraqueza dos membros, tronco, músculos faciais e disfunção respiratória (Ramdas; Beeson, 2021). O objetivo principal deste trabalho foi, portanto, identificar qual seria o momento de início do aparecimento dos sintomas motores nos animais VChT-KD. Embora diferenças epidemiológicas entre homens e mulheres ainda não tenham sido identificadas para as miastenias congênitas, foi objetivo também neste estudo compreender se haveria diferenças entre sexos para o modelo murino, portanto nós realizamos os testes em animais juvenis e adultos (p30 - p120) machos e fêmeas. Tal identificação é de extrema importância, uma vez que o diagnóstico e estratégias terapêuticas para pacientes na primeira infância são desafiadores, e

a caracterização do modelo animal pode apresentar um embasamento capaz de propor novas estratégias terapêuticas para os sintomas e a melhora do prognóstico do paciente (Darras et al., 2015).

Inicialmente, identificamos uma bateria de testes comportamentais para camundongos neonatos (Feather-Schussler; Ferguson, 2016), que nos permitiria verificar os possíveis sintomas motores, caso estivessem presentes. O trabalho sugere diversos testes, que visam identificar tais sintomas motores e reflexos, portanto, uma vez que buscamos neste momento avaliar a capacidade motora dos animais de forma objetiva, realizamos os testes de acordo com o trabalho, com poucas adaptações, nos dias pós-natal (p05, p08, p10, p12). Quanto aos animais juvenis (p30) e adultos (p60-p120), executamos testes motores robustos, bem descritos na literatura e frequentemente utilizados com objetivos muito semelhantes ao deste trabalho (Kamal et al., 2025), que nos permitiriam identificar as possíveis diferenças entre os grupos para o desempenho motor dos animais nos testes. No caso destes animais, foram separados por sexo e consideramos machos e fêmeas como grupos individuais, para cada genótipo.

Tanto para os testes com animais neonatos quanto para aqueles com animais adultos, as análises estatísticas foram feitas inicialmente utilizando os testes tradicionalmente utilizados para os dados da maneira como foram distribuídos, sendo eles o ANOVA de 2 fatores, para os testes cujos resultados foram quantitativos, e o Qui-quadrado para os testes cujos resultados se deram em forma de variável categórica, já que este é o teste estatístico base utilizado para a análise de variância neste caso. Uma vez que, para a execução adequada do teste ANOVA é necessário que os grupos sigam uma distribuição normal, esta foi verificada e confirmada para todos os grupos experimentais antes do início das análises.

Com relação aos resultados dos testes para os animais em idade neonatal, inicialmente, as análises de variância não identificaram diferenças entre os genótipos (Fig. 11B, C, E e G). No entanto, os testes que buscavam classificar em score ou de forma categórica as características dos animais durante sua execução, ou seja, aqueles de resultados qualitativos, mostraram desempenho diferente entre genótipos (Fig. 11A, D e F). Para o teste *Ambulation*, foi visto de forma mais evidente que os animais VACHT-KD apresentam classificação pior (níveis mais baixos de classificação do movimento), especialmente nos últimos dias de teste, em comparação com os animais selvagens, sugerindo que há um possível atraso no desenvolvimento dos padrões de caminhada esperados para os camundongos. A representação gráfica para os testes *Hindlimb Suspension* e *Grasping Reflex*, apesar de não evidenciar exatamente onde estaria a diferença de desempenho, ainda assim apresenta a diferença estatística observada na análise de Qui-quadrado (Fig. 11D e 11F), indicando que os animais

VChT-KD se comportam de maneira diferente dos selvagens.

Uma vez que a bateria de testes utilizada neste trabalho foi desenvolvida para um modelo murino de paralisia cerebral, que apresenta deficiência motora muito pronunciada, é possível que as diferenças entre os grupos não tenham sido observadas em todos os testes de comportamento pois estes testes, ou seu protocolo, podem não ser os mais adequados à identificação dos déficits motores do modelo VChT-KD. Isto significa que não necessariamente são os animais mutados que não apresentam diferenças com relação aos selvagens, e sim que o teste pode não ser suficientemente sensível para identificá-las. Ainda, o uso de diferentes tipos de análise estatística, ANOVA para as variáveis quantitativas e Qui-quadrado para as variáveis qualitativas, pode ter influenciado a observação das diferenças entre os genótipos, uma vez que estas só foram identificadas nos testes Qui-quadrado para variáveis categóricas, sendo este tipo de análise aparentemente mais eficiente em evidenciar as diferenças existentes entre os grupos.

Já que os testes para este estudo foram realizados em diferentes *time-points* para os mesmos animais, e dada a distribuição das variáveis explicativas e variáveis resposta, é muito adequado que tenhamos considerado todos os resultados como um sistema único, e, portanto, optamos por realizar a Análise do Componente Principal (PCA), procurando compreender melhor sobre as interações entre todas as variáveis do conjunto. A PCA tem a característica de reduzir a dimensionalidade dos dados, reduzindo a quantidade de variáveis em um sistema multivariado, como é o caso. Os componentes principais se tornam então as variáveis do sistema, e consideramos os dois primeiros componentes principais como os eixos 'x' e 'y' para as representações gráficas.

Os resultados desta análise indicaram que a distribuição dos dados entre os grupos se dá de forma diferente (Fig. 12A), apesar de os componentes principais representarem cerca de 50% da distribuição dos dados. Esta é uma limitação deste tipo de análise, pois alguns tipos de dados requerem mais que dois componentes principais para que uma porcentagem maior deles seja representada. Não obstante, os resultados expressam de forma clara que o genótipo ( $p < 0,001$ ) e a idade ( $p < 0,001$ ) são as duas variáveis que mais influenciam na distribuição dos dados, ou seja, animais VChT-KD apresentam performance diferente dos selvagens nos testes de comportamento, como representado pelas elipses do gráfico e suas regiões de não sobreposição, e ao longo do tempo, o que é esperado para o desenvolvimento dos animais no período pós-natal.

Como complemento da análise do componente principal, foi executada também a análise de redundância (RDA). A RDA, representando o componente de dependência (mais

especificamente como as variáveis explicativas influenciam as variáveis resposta), indica, através dos vetores na representação gráfica, se as variáveis independentes influenciam de forma evidente a distribuição dos dados no sistema, sendo que aqueles vetores de tamanho maior e maior proximidade de algum dos eixos são aqueles mais influentes. É possível verificar na representação gráfica que o genótipo e a idade são vetores longos e se posicionam próximos dos eixos do gráfico (Fig. 12B), indicando que são variáveis muito influentes para a distribuição dos dados, corroborando o resultado da PCA. Apesar de não serem evidenciadas pela PCA as informações sobre quais dos parâmetros exatamente estão alterados entre os grupos analisados, uma vez que executamos testes de comportamento que permitem avaliar principalmente a performance motora dos animais, os resultados indicam que os animais VChT-KD neonatos já apresentam certos déficits motores em comparação com os animais selvagens.

Para os animais adultos, novamente iniciamos as análises estatísticas com os testes (ANOVA), para cada um dos testes de comportamento realizados. Com o objetivo de identificar primeiro se os animais machos e fêmeas apresentavam desempenho motor diferente, realizamos o teste ANOVA de 2 fatores, comparando os sexos dentro do mesmo genótipo (Fig. 14). Os resultados apontaram algumas diferenças pontuais entre os sexos, para os testes *Grip Force* e *Rota Rod* (Fig. 14B e C). No entanto, como tais diferenças não foram reafirmadas nem nos diferentes *time-points* nem para o teste *Wire Hang* (Fig. 14A), concluímos que o sexo não aparenta ser um fator realmente relevante para o desempenho motor dos animais. Estes resultados estão de acordo com as características epidemiológicas das SMCs em humanos, que também não apresentam diferenças entre sexos para o número de casos registrados (Ramdas & Beeson, 2021; Pugliese et al., 2023).

Em seguida, fizemos a mesma análise de variância (ANOVA de 2 fatores), agora comparando entre os genótipos, dentro do mesmo sexo (Fig. 13). As diferenças entre os genótipos foram muito evidentes no teste *Wire Hang* (Fig. 13A). Este é um teste que exige muita força e resistência física, e que permite avaliar a força global dos animais de forma mais direta (Kamal et al., 2025) e é muito utilizado também para outros modelos de doenças neurodegenerativas (Kangussu et al., 2022; Younger et al., 2022; Lee et al., 2024). O desempenho dos animais VChT-KD é evidentemente muito reduzido em comparação com os animais selvagens, indicando claramente que o fenótipo miastênico já apresenta manifestação desde o primeiro mês de vida e que os animais mutados não apresentam as mesmas capacidades motoras que os WT.

Quanto ao teste do *Grip Force*, percebemos algumas diferenças entre os animais VChT-KD e os WT, sendo que os animais miastênicos machos apresentavam redução da força

em comparação com os selvagens em p90 e p120, ou seja, já na idade adulta, e em p120 também para o teste *All Limb Grip Force*, que mede a força das 4 patas (Fig. 13B). É possível que os animais VChT-KD machos, ao se desenvolverem nos dois primeiros meses de vida, adquiram um certo ganho de força que acompanha o dos selvagens até p60, e em seguida começam a apresentar os déficits, devidos à progressão da degeneração, esperada para o modelo. Quanto às fêmeas VChT-KD, estas não apresentaram diferenças significativas com relação às fêmeas selvagens em nenhum *time-point* para ambos os testes *Grip Force* e *All Limb Grip Force* (Fig. 13B).

O teste *Rota Rod* apresenta uma característica muito relevante que é a escolha do protocolo mais adequado, uma vez que o teste permite avaliar diferentes características além da capacidade motora, como aprendizado e cognição. O uso de protocolos com período de aprendizagem durante menor número de dias demonstrou que os animais WT são capazes de aprender mais rapidamente a como executar a tarefa, em comparação com os animais VChT-KD, que aprendem mais lentamente (Prado et al., 2006; De Castro et al., 2009a). O protocolo escolhido para este trabalho permite avaliar de uma forma mais direta a capacidade motora dos animais, uma vez que as etapas de ambientação e treinamento no aparelho foram mais curtas, sendo então que o fator aprendizagem deveria interferir pouco com os resultados dos testes. Foram identificadas diferenças entre os animais VChT-KD e os animais selvagens entre p30 e p90 para as fêmeas, tanto para o tempo de latência quanto para o número de quedas (Fig. 13C). Quanto aos machos, a diferença foi identificada somente em p90, para os dois parâmetros aferidos no teste (Fig. 13C). Para ambos os sexos, o desempenho motor dos animais VChT-KD no teste em p120 foi muito semelhante ao dos WT (Fig. 13C), de forma surpreendente, uma vez que já foram descritos em diversos trabalhos os déficits motores para estes animais na idade adulta, evidenciados por esse teste (Prado et al., 2006; De Castro et al., 2009a; Magalhães-Gomes et al., 2018). Nossa hipótese era a de que os animais VChT-KD estavam apresentando desenvolvimento de aprendizagem motora ao realizar o teste. Apesar do protocolo utilizado, que envolveria poucas características relacionadas à aprendizagem, os animais ainda assim a desenvolveram, possivelmente mais relacionada à repetição ao longo do tempo, com os intervalos de 30 dias, de forma que atingiram um desempenho semelhante ao dos animais selvagens no último dia de teste.

Para testar essa hipótese, inicialmente executamos o índice de aprendizado motor (MLI), que compara o desempenho dos animais no teste com o do *time-point* anterior. O resultado do índice mostrou que os animais VChT-KD apresentavam melhora da performance motora em p120, i. e., apresentavam maior tempo de latência no teste (Fig. 16), tanto machos quanto

fêmeas, apesar de não terem sido identificadas diferenças significativas entre os genótipos.

Em seguida, ainda buscando testar essa característica, realizamos novamente o teste *Rota Rod*, utilizando o mesmo protocolo, com outros animais em idade p120, que ainda não haviam sido expostos ao aparelho, de forma que este fator aprendizagem não seria influente para os resultados. Os resultados desse teste indicaram as diferenças estatísticas esperadas, sendo que os animais miastênicos apresentaram um desempenho muito inferior em comparação com os animais selvagens (Fig. 17). A hipótese foi então confirmada, sendo que os animais VChT-KD, apesar de apresentarem déficits cognitivos, apresentam certa capacidade de aprendizado motor, ainda que tardio, relacionado à repetição da execução do teste.

A deficiência da ACh na transmissão sináptica é um fator muito influente para aprendizagem (motora e cognitiva), como já demonstrado pelos diversos trabalhos já citados que avaliaram o desempenho dos animais VChT-KD em diferentes testes de comportamento. Apesar disso, a aprendizagem motora desses animais foi evidenciada neste trabalho, após o período de submissão aos testes repetidamente. Este fator aprendizagem provavelmente se dá devido também à ativação de vias relacionadas à aprendizagem motora, como os núcleos olivares inferiores e o cerebelo (trato córtico-olivocerebelar), que são vias também de processamento de movimentos. Interessantemente, há evidências de que estas áreas apresentam sinapses elétricas, independentes de neurotransmissores, além das sinapses químicas (Vaughn & Haas, 2022). A ativação de tais áreas pode ser um fator que contribui de forma evidente para tal aprendizagem motora verificada para estes animais, que é suficiente para superar as características da degeneração esperada para o modelo. Vale ressaltar que, os animais selvagens muito provavelmente também apresentam desenvolvimento da aprendizagem, com relação à execução do teste *Rota Rod*, no entanto, como já apresentavam capacidade de desempenho próxima do tempo limite máximo estabelecido no protocolo, em todos os *time-points*, não foi possível verificar tal aprendizado.

A aprendizagem motora dos animais miastênicos corrobora os dados encontrados por De Castro (2009a), que avaliou a aprendizagem motora dos animais VChT-KD<sup>HET</sup> e observou que, apesar dos animais apresentarem um pequeno atraso para iniciar a aprendizagem, uma vez que atingem desempenho máximo, se igualam ao WT, e depois de 10 dias, a performance se mantém, e eles conseguem executar bem a tarefa. Ademais, em geral, o processo de fortalecimento de sinapses já existentes é bem mais rápido que o estabelecimento de uma nova rede sináptica, a depender de estímulos, contexto etc. Os animais VChT-KD podem estar apresentando um certo atraso na formação de novas redes de memória, o que resulta no atraso também para a aprendizagem motora, mas que ao final atingem o mesmo resultado, semelhante

ao WT, naqueles testes que não exigem tanto do desempenho físico dos animais. Esta mesma lógica não se aplica ao teste *Wire Hang*, pois o desempenho físico exigido pelo teste é tão alto que os animais, mesmo desenvolvendo o aprendizado, ainda assim não são capazes de executá-lo, portanto não apresentam melhora do desempenho.

A análise do componente principal, para o caso dos adultos, indicou somente o genótipo como variável mais influente para a distribuição dos dados, como esperado após os resultados da análise de variância (Fig. 15A). Ainda, a análise de redundância também corrobora os resultados observados, apontando o genótipo como um vetor longo e que acompanha muito próximo o eixo da RDA1 (Fig. 15B). Observando tal distribuição dos vetores, podemos ver que o vetor que representa o sexo dos animais também é longo e acompanha o eixo da RDA2, indicando que o sexo também é uma possível variável explicativa que influencia a distribuição das variáveis resposta. Essa característica, no entanto, não foi identificada como significativa pelo resultado da PCA, o que pode significar que a contribuição desta variável não influencia suficientemente a distribuição dos dados para ser identificada na análise do componente principal nem nas análises de variância que foram executadas para os testes inicialmente.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos proporcionaram novas e mais detalhadas informações quanto à ontogenia do fenótipo motor do modelo animal VACHT-KD, que apresenta redução da expressão do transportador vesicular de acetilcolina. Buscando responder à pergunta acerca do início da manifestação do fenótipo miastênico nos animais VACHT-KD, executamos uma série de testes comportamentais, que nos permitiram avaliar principalmente a capacidade motora dos animais, tanto em animais neonatos quanto em animais adultos. Observamos que os animais VACHT-KD neonatos apresentam comportamento diferente dos animais selvagens e que a partir da sua fase juvenil (p30) já apresentam os déficits motores muito evidentes, que permanecem até a vida adulta (p120). Dessa forma, esse estudo reforça a qualidade e adequação do modelo VACHT-KD como plataforma experimental para as Síndromes Miastênicas Congênicas do tipo pré-sináptica.

A delimitação de tal característica para os camundongos VACHT-KD, animais modelo para as Síndromes Miastênicas Congênicas, é de extrema importância, uma vez que esta disfunção neuromuscular em humanos se manifesta na primeira infância, com sintomas muito graves, e as terapias farmacológicas existentes são ainda limitadas. A partir dessas características identificadas neste trabalho, é possível propor novas estratégias terapêuticas para serem realizadas o mais cedo possível, no início da manifestação dos sintomas ou até mesmo antes, e que podem vir a apresentar resultados que signifiquem um melhor prognóstico para os pacientes no futuro.

## REFERÊNCIAS

- ARAN, Adi *et al.* Vesicular acetylcholine transporter defect underlies devastating congenital myasthenia syndrome. **Neurology**, v. 88, n. 11, p. 1021–1028, 14 mar. 2017.
- ARNOLD, W. David *et al.* Defective fast inactivation recovery of Nav 1.4 in congenital myasthenic syndrome. **Annals of neurology**, v. 77, n. 5, p. 840–850, maio 2015.
- ARREDONDO, Juan *et al.* Choline Acetyltransferase Mutations Causing Congenital Myasthenic Syndrome: Molecular Findings and Genotype-Phenotype Correlations. **Human mutation**, v. 36, n. 9, p. 881–893, set. 2015.
- ARROYO, Hugo A. [Treatment of juvenile myasthenia gravis]. **Medicina**, v. 79 Suppl 3, p. 71–76, 2019.
- BLACK, Stefanie A. G.; RYLETT, R. Jane. Choline transporter CHT regulation and function in cholinergic neurons. **Central nervous system agents in medicinal chemistry**, v. 12, n. 2, p. 114–121, jun. 2012.
- BOEHM, Ines *et al.* Comparative anatomy of the mammalian neuromuscular junction. **Journal of anatomy**, v. 237, n. 5, p. 827–836, nov. 2020.
- BORGES, Ricardo; GARCÍA, Antonio G. One hundred years from Otto Loewi experiment, a dream that revolutionized our view of neurotransmission. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 473, n. 6, p. 977–981, 1 jun. 2021.
- BROWN, Robert H.; AL-CHALABI, Ammar. Amyotrophic Lateral Sclerosis. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 2, p. 162–172, 13 jul. 2017.
- CHANGEUX, Jean-Pierre. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 389–401, jun. 2010.
- CORDERO-ERAUSQUIN, M. *et al.* Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 6, p. 211–217, jun. 2000.
- DARRAS, Basil T. *et al.* **Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence**. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 2015.
- DAWSON, Ted M.; GOLDE, Todd E.; LAGIER-TOURENNE, Clotilde. Animal models of neurodegenerative diseases. **Nature neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1370–1379, out. 2018.
- DE CASTRO, B. M. *et al.* Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. **Genes, brain, and behavior**, v. 8, n. 1, p. 23–35, fev. 2009a.
- 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. 2009b.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–209, mar. 1957.
- DUTRA-TAVARES, Ana Carolina *et al.* Neonatal phencyclidine as a model of sex-biased schizophrenia symptomatology in adolescent mice. **Psychopharmacology**, v. 240, n. 10, p. 2111–2129, out. 2023.
- ENGEL, A. G. *et al.* Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **The Lancet. Neurology**, v. 14, n. 5, p. 461, maio 2015.
- ESTEPHAN, Eduardo P. *et al.* Congenital myasthenic syndrome: Correlation between clinical features and molecular diagnosis. **European journal of neurology**, v. 29, n. 3, p. 833–842, mar. 2022.
- EVANS, Colin G. *et al.* Effect of presynaptic membrane potential on electrical vs. chemical synaptic transmission. **Journal of neurophysiology**, v. 106, n. 2, p. 680–689, ago. 2011.
- FEATHER-SCHUSSLER, Danielle N.; FERGUSON, Tanya S. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. **JoVE**, n. 117, p. e53569, 3 nov. 2016.
- FINSTERER, Josef. Congenital myasthenic syndromes. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 14, n. 1, p. 57, 26 fev. 2019.
- FINSTERER, Josef. Prevalence in congenital myasthenic syndrome. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 26, p. 5–6, 1 maio 2020.
- GIBSON, Jay R.; BEIERLEIN, Michael; CONNORS, Barry W. Functional properties of electrical synapses

- between inhibitory interneurons of neocortical layer 4. **Journal of neurophysiology**, v. 93, n. 1, p. 467–480, jan. 2005.
- GILHUS, Nils E. Myasthenia Gravis. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 26, p. 2570–2581, 29 dez. 2016.
- GILLAND, Edwin; BAKER, Robert. Evolutionary patterns of cranial nerve efferent nuclei in vertebrates. **Brain, behavior and evolution**, v. 66, n. 4, p. 234–254, 2005.
- GILLIES, Glenda E. *et al.* Sex differences in Parkinson's disease. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 370–384, ago. 2014.
- GUNDELFINGER, E. D.; TOM DIECK, S. Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. **Die Naturwissenschaften**, v. 87, n. 12, p. 513–523, dez. 2000.
- HALL, Zach W.; SANES, Joshua R. Synaptic structure and development: The neuromuscular junction. **Cell**, v. 72, p. 99–121, 1 jan. 1993.
- HASEEB, Ateeq *et al.* Young patients with focal seizures may have the primary motor area for the hand in the postcentral gyrus. **Epilepsy research**, v. 76, n. 2–3, p. 131–139, set. 2007.
- HENNEMAN, E.; SOMJEN, G.; CARPENTER, D. O. FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF CELL SIZE IN SPINAL MOTONEURONS. **Journal of neurophysiology**, v. 28, p. 560–580, maio 1965.
- HODSON-TOLE, Emma F.; WAKELING, James M. Motor unit recruitment for dynamic tasks: current understanding and future directions. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 179, n. 1, p. 57–66, jan. 2009.
- INOUE, Takahiro; UENO, Masaki. The diversity and plasticity of descending motor pathways rewired after stroke and trauma in rodents. **Frontiers in Neural Circuits**, v. Volume 19-2025, 2025.
- JESSELL, T. M.; KANDEL, E. R. Synaptic transmission: A bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. **Cell**, v. 72, p. 1–30, 1 jan. 1993.
- JOVIANO-SANTOS, Julliane V. *et al.* Motoneuron-specific loss of VAcHT mimics neuromuscular defects seen in congenital myasthenic syndrome. **The FEBS journal**, v. 288, n. 18, p. 5331–5349, set. 2021.
- JUEL, Vern C. Evaluation of neuromuscular junction disorders in the electromyography laboratory. **Neurologic clinics**, v. 30, n. 2, p. 621–639, maio 2012.
- KAMAL, Ola Mohamed-Fathy *et al.* **Technical Assessment of Motor and Behavioral Tests in Rodent Models of Multiple Sclerosis.** **JIN**, 2025. Disponível em: <<https://www.imrpress.com/JIN/articles/10.31083/JIN26429>>
- KANDEL, Eric R. *et al.* **Principles of Neural Science**. 4. ed. [S.l.]: McGraw Hill, 2021.
- KANGUSSU, Lucas M. *et al.* Renin-Angiotensin System in Huntington's Disease: Evidence from Animal Models and Human Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, 2022.
- KAO, Fang-Chi *et al.* McCP2-mediated alterations of striatal features accompany psychomotor deficits in a mouse model of Rett syndrome. **Brain Structure and Function**, v. 220, n. 1, p. 419–434, 1 jan. 2015.
- KARALEWITZ, Andrew P. A.; BARBIERI, Joseph T. Vaccines against botulism. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 3, p. 317–324, jun. 2012.
- KELLY, R. B. Storage and release of neurotransmitters. **Cell**, v. 72 Suppl, p. 43–53, jan. 1993.
- KINALI, M. *et al.* Congenital myasthenic syndromes in childhood: diagnostic and management challenges. **Journal of neuroimmunology**, v. 201–202, p. 6–12, 15 set. 2008.
- 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.
- KONZIELLA, W. [A NEW METHOD FOR THE MEASUREMENT OF MUSCLE RELAXATION IN WHITE MICE]. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 152, p. 277–284, 1 dez. 1964.
- KUMMER, Terrance T.; MISGELD, Thomas; SANES, Joshua R. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. **Current opinion in neurobiology**, v. 16, n. 1, p. 74–82, fev. 2006.
- LAMOND, Allison *et al.* Variants of SLC18A3 leading to congenital myasthenic syndrome in two children with varying presentations. **BMJ case reports**, v. 14, n. 1, 18 jan. 2021.

- LAUREANO-MELO, Roberto *et al.* Neonatal D-fenfluramine treatment promotes long-term behavioral changes in adult mice. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 82, n. 6, p. 486–498, out. 2022.
- LEE, Sin Yi *et al.* Phenotypic Insights Into Anti-IgLON5 Disease in IgLON5-Deficient Mice. **Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation**, v. 11, n. 3, p. e200234, maio 2024.
- LEE, Sin Yi *et al.* Phenotypic Insights Into Anti-IgLON5 Disease in IgLON5-Deficient Mice. **Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 11, n. 3, p. e200234, [S.d.].
- LEE, Young Il. Differences in the constituent fiber types contribute to the intermuscular variation in the timing of the developmental synapse elimination. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 8694, 18 jun. 2019.
- LEITE SCHETINO, Luana Pereira *et al.* Evaluation of the neuromuscular junction in a middle-aged mouse model of congenital myasthenic syndrome. **Muscle & nerve**, v. 60, n. 6, p. 790–800, dez. 2019.
- LICHTMAN, J. W.; COLMAN, H. Synapse elimination and indelible memory. **Neuron**, v. 25, n. 2, p. 269–278, fev. 2000.
- LIMA, Ricardo de Freitas *et al.* Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. **Journal of neurochemistry**, v. 113, n. 4, p. 943–951, maio 2010.
- LUPA, M. T.; HALL, Z. W. Progressive restriction of synaptic vesicle protein to the nerve terminal during development of the neuromuscular junction. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 3937–3945, nov. 1989.
- LUQUE, Niceto R. *et al.* Electrical coupling regulated by GABAergic nucleo-olivary afferent fibres facilitates cerebellar sensory-motor adaptation. **Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society**, v. 155, p. 422–438, nov. 2022.
- MACDONALD, Marcy E. *et al.* A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 971–983, 26 mar. 1993.
- MAGALHÃES-GOMES, Matheus 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, 1 nov. 2018.
- 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.
- MARTINEAU, Éric *et al.* Sex-Specific Differences in Motor-Unit Remodeling in a Mouse Model of ALS. **eNeuro**, v. 7, n. 1, p. ENEURO.0388-19.2020, fev. 2020.
- MASELLI, Ricardo A. *et al.* Synaptic basal lamina-associated congenital myasthenic syndromes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1275, p. 36–48, dez. 2012.
- MASELLI, Ricardo A. *et al.* Presynaptic congenital myasthenic syndrome with a homozygous sequence variant in LAMA5 combines myopia, facial tics, and failure of neuromuscular transmission. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 173, n. 8, p. 2240–2245, ago. 2017.
- MATEJAS, Verena *et al.* Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. **Human mutation**, v. 31, n. 9, p. 992–1002, set. 2010.
- MAURISSEN, Jacques P. J. *et al.* Factors affecting grip strength testing. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, n. 5, p. 543–553, 1 set. 2003.
- MISGELD, Thomas *et al.* Roles of Neurotransmitter in Synapse Formation: Development of Neuromuscular Junctions Lacking Choline Acetyltransferase. **Neuron**, v. 36, n. 4, p. 635–648, 14 nov. 2002.
- MIYAZAWA, Atsuo; FUJIYOSHI, Yoshinori; UNWIN, Nigel. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. **Nature**, v. 423, n. 6943, p. 949–955, 1 jun. 2003.
- MURPHY, Gabe J.; RIEKE, Fred. Electrical synaptic input to ganglion cells underlies differences in the output and absolute sensitivity of parallel retinal circuits. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 34, p. 12218–12228, 24 ago. 2011.
- NAIR, Akshay *et al.* Imbalanced basal ganglia connectivity is associated with motor deficits and apathy in Huntington's disease. **Brain : a journal of neurology**, v. 145, n. 3, p. 991–1000, 29 abr. 2022.

- NGUYEN, M. L.; COX, G. D.; PARSONS, S. M. Kinetic parameters for the vesicular acetylcholine transporter: two protons are exchanged for one acetylcholine. **Biochemistry**, v. 37, n. 38, p. 13400–13410, 22 set. 1998.
- NOVAK, Marianne J. U. *et al.* Basal ganglia-cortical structural connectivity in Huntington's disease. **Human brain mapping**, v. 36, n. 5, p. 1728–1740, maio 2015.
- ODA, Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathology international**, v. 49, n. 11, p. 921–937, nov. 1999.
- ODIERNA, Gianmaria Lorenzo; PHILLIPS, William Donald. The Safety Factor for Neuromuscular Transmission: Effects of Dimethylsulphoxide, Cannabinoids and Synaptic Homeostasis. **Journal of neuromuscular diseases**, v. 8, n. 5, p. 831–844, 2021.
- O'GRADY, Gina L. *et al.* Variants in SLC18A3, vesicular acetylcholine transporter, cause congenital myasthenic syndrome. **Neurology**, v. 87, n. 14, p. 1442–1448, 4 out. 2016.
- OHNO, K. *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 of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9654–9659, 4 ago. 1998.
- OWECKI, Michał K. Theodor Schwann (1810-1882). **Journal of neurology**, v. 268, n. 12, p. 4921–4922, dez. 2021.
- PALACE, Jackie; BEESON, David. The congenital myasthenic syndromes. **Special Issue in Memory of John Newsom-Davis**, v. 201–202, p. 2–5, 15 set. 2008.
- PARIKH, Vinay *et al.* The presynaptic choline transporter imposes limits on sustained cortical acetylcholine release and attention. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 2326–2337, 6 fev. 2013.
- PARSONS, S. M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 15, p. 2423–2434, dez. 2000.
- PENG, Jessie *et al.* Effects of neonatal hypoxic-ischemic episodes on late seizure outcomes in C57 black mice. **Epilepsy research**, v. 111, p. 142–149, mar. 2015.
- 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, 7 set. 2006.
- PRADO, Vania F. *et al.* Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 2, p. 265–274, 15 fev. 2013.
- PRASAD, E. Maruthi; HUNG, Shih-Ya. Behavioral Tests in Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson's Disease. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, 16 out. 2020.
- 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.
- PURVES, Dale; WILLIAMS, Stephen Mark. **Neuroscience. 2nd edition.** [S.l.]: Sinauer Associates 2001, 2001.
- RAMDAS, Sithara; BEESON, David. Congenital myasthenic syndromes: where do we go from here? **Neuromuscular Disorders**, v. 31, n. 10, p. 943–954, 1 out. 2021.
- RANGER, Manon *et al.* Adverse Behavioral Changes in Adult Mice Following Neonatal Repeated Exposure to Pain and Sucrose. **Frontiers in psychology**, v. 9, p. 2394, 2018.
- 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, Pedro M. *et al.* The clinical spectrum of the congenital myasthenic syndrome resulting from COL13A1 mutations. **Brain**, v. 142, n. 6, p. 1547–1560, 1 jun. 2019.
- RODRÍGUEZ CRUZ, Pedro M. *et al.* The Neuromuscular Junction in Health and Disease: Molecular Mechanisms Governing Synaptic Formation and Homeostasis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. Volume 13-2020, 2020.
- RODRÍGUEZ CRUZ, Pedro M. *et al.* Presynaptic congenital myasthenic syndrome due to three novel mutations in SLC5A7 encoding the sodium-dependant high-affinity choline transporter. **Neuromuscular Disorders**, v. 31,

n. 1, p. 21–28, 1 jan. 2021.

RODRÍGUEZ CRUZ, Pedro M.; PALACE, Jacqueline; BEESON, David. The Neuromuscular Junction and Wide Heterogeneity of Congenital Myasthenic Syndromes. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, 5 jun. 2018.

ROMANO, Emilia *et al.* Characterization of Neonatal Vocal and Motor Repertoire of Reelin Mutant Mice. **PLOS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64407, 21 maio 2013.

ROOS, Raymund A. C. Huntington's disease: a clinical review. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 5, p. 40, 20 dez. 2010.

ROSSI, Leonardo *et al.* Influence of  $\beta(2)$ -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.

RUDOLF, Rüdiger; STRAKA, Tatjana. Nicotinic acetylcholine receptor at vertebrate motor endplates: Endocytosis, recycling, and degradation. **Neuroscience letters**, v. 711, p. 134434, 15 out. 2019.

RUSTAY, Nathan R.; WAHLSTEN, Douglas; CRABBE, John C. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. **Behavioural brain research**, v. 141, n. 2, p. 237–249, 15 maio 2003.

SAIANI, L. *et al.* Purification and characterization of a bungarotoxin polypeptide which blocks nicotinic receptor function in primary culture of adrenal chromaffin cells. **Molecular Pharmacology**, v. 25, n. 2, p. 327–334, 1 mar. 1984.

SALPIETRO, Vincenzo *et al.* Homozygous mutations in VAMP1 cause a presynaptic congenital myasthenic syndrome. **Annals of neurology**, v. 81, n. 4, p. 597–603, abr. 2017.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annual review of neuroscience**, v. 22, p. 389–442, 1999.

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

SCHIAVO, G.; MATTEOLI, M.; MONTECUCCO, C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. **Physiological reviews**, v. 80, n. 2, p. 717–766, abr. 2000.

SERRA, Alessandro; RUFF, Robert L.; LEIGH, Richard John. Neuromuscular transmission failure in myasthenia gravis: decrement of safety factor and susceptibility of extraocular muscles. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1275, n. 1, p. 129–135, dez. 2012.

SHEFNER, Jeremy M. *et al.* Skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis. **Brain : a journal of neurology**, v. 146, n. 11, p. 4425–4436, 2 nov. 2023.

SHEN, X. M. *et al.* Mutant SNAP25B causes myasthenia, cortical hyperexcitability, ataxia, and intellectual disability. **Neurology**, v. 83, n. 24, p. 2247–2255, 2014.

SHEPHERD, G. M.; ERULKAR, S. D. Centenary of the synapse: from Sherrington to the molecular biology of the synapse and beyond. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 9, p. 385–392, 1 set. 1997.

SHIOTSUKI, Hiromi *et al.* A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, n. 2, p. 180–185, 15 jun. 2010.

SLEIGH, James N. *et al.* Morphological analysis of neuromuscular junction development and degeneration in rodent lumbrical muscles. **Journal of neuroscience methods**, v. 227, p. 159–165, 30 abr. 2014.

SPEAR, Linda Patia; PENSON, Jennifer; LINVILLE, Donald G. GABA and behavioral inhibition in the neonatal rat pup. **Psychopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 106–111, 1 ago. 1986.

STILES, Bradley G. Acetylcholine receptor binding characteristics of snake and cone snail venom postsynaptic neurotoxins: Further studies with a non-radioactive assay. **Toxicon**, v. 31, n. 7, p. 825–834, 1 jul. 1993.

STRICK, Peter L.; DUM, Richard P.; RATHELOT, Jean-Alban. The Cortical Motor Areas and the Emergence of Motor Skills: A Neuroanatomical Perspective. **Annual review of neuroscience**, v. 44, p. 425–447, 8 jul. 2021.

SÜDHOF, Thomas C.; RIZO, Josep. Synaptic vesicle exocytosis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 12, 1 dez. 2011.

SVOBODA, Karel; LI, Nuo. Neural mechanisms of movement planning: motor cortex and beyond. **Current**

**opinion in neurobiology**, v. 49, p. 33–41, abr. 2018.

TAKESHITA, Hikari *et al.* Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 42323, 8 fev. 2017.

ULLAH, Mohammad Fahad *et al.* Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 102, p. 95–105, jul. 2019.

VALADÃO, Priscila Aparecida Costa *et al.* Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington’s disease. **The European journal of neuroscience**, v. 45, n. 6, p. 785–796, mar. 2017.

VALADÃO, Priscila Aparecida Costa *et al.* Inflammation in Huntington’s disease: A few new twists on an old tale. **Journal of Neuroimmunology**, v. 348, p. 577380, 15 nov. 2020.

VALDEZ, Gregorio *et al.* Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34640, 2012.

VAUGHN, Mitchell J.; HAAS, Julie S. On the Diverse Functions of Electrical Synapses. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. Volume 16-2022, 2022.

VEMULA, Sampath *et al.* Neuromuscular Junction Development Differs Between Extraocular and Skeletal Muscles and Between Different Extraocular Muscles. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 65, n. 5, p. 28, 1 maio 2024.

WANG, Min *et al.* Connexin43 in neonatal excitatory neurons is important for short-term motor learning. **Brain research**, v. 1720, p. 146287, 1 out. 2019.

WELNIARZ, Quentin; DUSART, Isabelle; ROZE, Emmanuel. The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. **Developmental neurobiology**, v. 77, n. 7, p. 810–829, jul. 2017.

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

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

YOUNGER, Skyler *et al.* Behavioral Phenotypes of Foxg1 Heterozygous Mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 927296, 2022.