

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Matheus Proença Simão Magalhães Gomes

**Alterações neuromusculares em modelos animais de disfunção colinérgica e sua
relação com as Síndromes Miastênicas Congênitas**

Belo Horizonte
Abril de 2018

Matheus Proença Simão Magalhães Gomes

**Alterações neuromusculares em modelos animais de disfunção colinérgica e sua
relação com as Síndromes Miastênicas Congênitas**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular do Departamento de Morfologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientação: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca

Belo Horizonte

Abril de 2018

043

Gomes, Matheus Proença Simão Magalhães.

Alterações neuromusculares em modelos animais de disfunção colinérgica e sua relação com as Síndromes Miastênicas Congênitas [manuscrito] / Matheus Proença Simão Magalhães Gomes. – 2018.

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

Orientação: Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca.

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

1. Biologia Celular. 2. Acetilcolina. 3. Síndromes miastênicas congênitas. 4. Proteínas Vesiculares de Transporte de Acetilcolina. I. Fonseca, Cristina Guatimosim. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
MATHEUS PROENÇA SIMÃO MAGALHÃES GOMES**

191/2018
entrada
1º/2014
2014714171

Às **nove horas** do dia **26 de abril de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ALTERAÇÕES NEUROMUSCULARES EM MODELOS ANIMAIS DE DISFUNÇÃO COLINÉRGICA E SUA RELAÇÃO COM AS SÍNDROMES MIASTÊNICAS CONGÊNITAS**", requisito final para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Cristina Guatimosim Fonseca**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG/ICB	<i>Aprovado</i>
Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes	FMUSP-Ribeirão Preto	<i>Aprovado</i>
Dr. Hermann Alecsandro Rodrigues	UFJF	<i>Aprovado</i>
Dr. Elmano Henrique	Rede SARAÍ	<i>Aprovado</i>
Dr. Walter Cavalcante	UFMG	<i>Aprovado</i>

Pelas indicações, o candidato foi considerado: *Aprovado*

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 26 de abril de 2018.**

Dr^a. Cristina Guatimosim Fonseca (Orientadora) *Cristina Guatimosim Fonseca*

Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes *Luiz Carlos Carvalho Navegantes*

Dr. Hermann Alecsandro Rodrigues *Hermann Alecsandro Rodrigues*

Dr. Elmano Henrique *Elmano Henrique*

Dr. Walter Cavalcante *Walter Cavalcante*

Luciana de Oliveira Andrade
Profa. Luciana de Oliveira Andrade
COORDENADORA DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR, ICB/UFMG

APOIO INSTITUCIONAL

Essa tese foi realizada com apoio dos seguintes laboratórios: Laboratório de Biologia da Neurotransmissão (LaBNeuro- Profa. Dra. Cristina Guatimosim), Laboratório Eletrocel (Profa. Dra. Sílvia Guatimosim), Laboratório de Neurobiologia, Profa. Conceição Machado (Profa. Dra. Patrícia Martinelli), Laboratório de Endocrinologia (Prof. Dr. Cândido C. Coimbra), Laboratório de Hipertensão (Dra. Daisy Motta-Santos), Núcleo de Neurociências (NNC), Laboratório de Farmacologia (Profa. Dra. Luciene B. Vieira) e Laboratório da farmacologia da junção neuromuscular e toxinologia (Prof. Dr. Walter L. G. Cavalcante). Os laboratórios aqui citados encontram-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos ainda com o apoio experimental do Laboratório de farmacologia da junção neuromuscular (Profa. Dra. Márcia Gallacci) do Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu e do Valdez Lab (Prof. Dr. Gregorio Valdez) da Virginia Tech Carilion Research Institute, Roanoke, VA, USA.

Os experimentos envolvendo Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG; e Microscopia Confocal e Criotécnicas, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), do ICB, UFMG.

Essa tese foi realizada sob orientação da Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca (Departamento de Morfologia), e contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, é justo e necessário que se agradeça a Deus! Muito Obrigado, Senhor, pela minha vida, por constantemente se fazer real nos meus dias! Obrigado, porque nesses quase dez anos de caminhada, o Senhor nunca me abandonou estando comigo em todos os momentos, desde os de grande felicidade e principalmente, naqueles em que do seu colo eu tanto precisei. Obrigado, meu Pai, essa conquista eu dedico ao Senhor!

Agradeço a Profa. Cristina Guatimosim, que há dez anos me abriu as portas do LaBNeuro e tantas oportunidades me proporcionou. Obrigado por ser uma orientadora que não mede esforços para que nós tenhamos as melhores condições de fazer as pesquisas! Obrigado pela disponibilidade e por nunca aceitar de nós menos que o melhor! A sua postura exigente, que preza pela qualidade, com certeza fez de mim alguém mais exigente e atento com o que posso oferecer! Foram anos memoráveis e que venham os novos projetos! Muito obrigado!

Agradeço às agências de financiamento de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG que nos deram os recursos necessários para realização deste trabalho, em especial a CAPES, pelo provimento da minha bolsa de doutorado.

Agradeço aos meus queridos amigos do LaBNeuro, essa grande equipe, que trabalha junto, que se ajuda a todo o momento! Agradeço à Prica, pela sua alegria e disposição em ajudar nesses bons anos de laboratório! À Ju + Artur, Babi, Jéssica, Hermann, Rubens, Isadora, Marina, Lucas, Kívia, Thatiane, Luana e Matheus Fonseca. Vocês são especiais!

Aos amigos Diogo Guimarães, Itamar e Vanessa, por toda ajuda com os animais.

Ao Prof. Walter Cavalcante e sua aluna Emylle, pela dedicação e empenho nos experimentos funcionais musculares. À Daisy, pela paciência e dedicação nos experimentos de biologia molecular!

Fora do laboratório, é na família que Deus nos deu, que se encontra a nossa base que nos sustenta e nos auxilia nessa caminhada! Aos meus amados pais, Vanessa e Marcelo, eu deixo aqui o meu muito obrigado por terem me concedido tanto amor e o bem mais precioso, a Educação! Eu amo vocês! Essa conquista também pertence a vocês! Agradeço também a minha irmã, Letícia, pelo carinho da nossa grande artista! Aproveito também para agradecer aos meus avós, tios, tias, primos e primas! Quanta alegria poder fazer parte dessa grande família!

E durante a caminhada da vida, Deus me concedeu talvez o seu maior presente, a sua filha, Jéssica, meu amor, minha companheira de vida, de carreira! Aquela que sonha comigo, que chora, que ora, que me consola que aconselha! Obrigado, amor por ser quem é, por ter me mostrado o amor de Deus e por me conceder o privilégio de te fazer feliz! Amo-te de todo o meu coração! Deus, eu não tenho palavras para agradecer tudo o que o Senhor tem feito em nossas vidas! Não posso deixar de agradecer também a minha segunda família, em nome dos meus sogros José Roberto e Nízia, que me acolheram em seu lar com tanto carinho e que viveram comigo cada momento dessa caminhada! Muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos, principalmente os amigos em Cristo, que lutam conosco, rezam, alegram-se em nossas vitórias, e não nos deixam esquecer o amor de Deus, estando sempre com as palavras certas quando precisamos! Em nome deles, agradeço ao Léo, grande amigo, por tanto se dedicar ao trabalho de Deus, por nos levar a palavra do Senhor, por orar, por sempre se encontrar disponível quando precisamos! Muito obrigado a toda a comunidade de ALVO BH!

Agradeço ao nosso querido e amigo Prof. Robson Rossoni, meu grande mentor e um dos responsáveis por eu estar aqui hoje!

Ao nosso querido Prof. Emérito José Carlos Nogueira, grande amigo e companheiro, e sua esposa, Verinha, pelos conselhos de vida de um casal admirável!

À Profa. Patrícia Massara pelo carinho, pela sua alegria e por todos os ensinamentos!

Aos meus professores e amigos do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e do Departamento de Morfologia.

Aos professores sempre presentes: Silvia Guatimosim, Janice, Luciene, Aline, Lígia Naves e seu aluno Wallace Camargo colaborando sempre com os experimentos de eletrofisiologia. Ao Prof. Enrico Bloise, pelas sugestões e comentários na construção da parte molecular dessa tese!

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

Ao corpo diretor do Centro de Microscopia da UFMG e do CAPI-ICB-UFMG.

A todos do Centro de Microscopia da UFMG, especialmente Denílson, Marilene, Altair e Daisy. E aos funcionários do CAPI.

Às secretárias da Pós-graduação pela dedicação e competência.

Aos funcionários do Biotério da Fisiologia do ICB, Sílvio, Samyr e Alessa, pelo cuidado com os animais. Aos funcionários técnicos de laboratório, de manutenção e limpeza do ICB, que tanto trabalham em prol de um ambiente agradável de trabalho! Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. A Unidade Motora.....	17
1.1.1. Os motoneurônios inferiores	19
1.1.2. A Junção Neuromuscular (JNM).....	26
1.1.3. O Músculo Estriado Esquelético (MEE).....	37
1.2. As Síndromes Miastênicas Congênicas (SMCs).....	50
2. OBJETIVOS.....	53
2.1. Objetivo Geral	53
2.2. Objetivos Específicos	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1 População e amostra.....	54
3.2. Experimentos realizados	55
3.3. Avaliação dos neurônios do segmento lombar da medula espinal (L1 a L5) dos animais ChAT-ChR2-EYFP	55
3.3.1. Histologia de rotina	55
3.4. Imunofluorescência para ChAT e Osteopontina (OPN) dos animais ChAT-ChR2-EYFP.....	57
3.5. Avaliação por imunofluorescência das JNM do músculo EDL dos animais ChAT-ChR2-EYFP	58
3.6. Avaliação da endocitose e exocitose de vesículas sinápticas no músculo Diafragma dos animais ChAT-ChR2-EYFP.....	59
3.7. Avaliação específica da endocitose pela marcação com FM1-43 fx e α -bungarotoxina no músculo Diafragma dos animais ChAT-ChR2-EYFP	60
3.8. Avaliação ultraestrutural das JNMs do músculo Diafragma dos animais ChAT-ChR2-EYFP.....	61
3.9. Estudo Miográfico <i>in vitro</i>	62

3.10. Avaliação histológica da musculatura estriada esquelética dos animais ChAT-ChR2-EYFP e VChT KD ^{HOM}	63
3.11. Avaliação por imunofluorescência dos tipos de fibras musculares no Sóleo e EDL dos animais ChAT-ChR2-EYFP e VChT KD ^{HOM}	63
3.12. Teste de Fadiga Muscular	65
3.13. Microscopia Eletrônica de Transmissão dos músculos EDL e Sóleo dos animais VChT KD ^{HOM}	66
3.14. Análise molecular por qPCR de genes musculares e mitocondriais dos músculos EDL e Sóleo dos animais VChT KD ^{HOM}	66
3.15. Avaliação da capacidade aeróbica máxima (Teste de Incremento Máximo- TIM) dos animais VChT KD ^{HOM} ChAT-ChR2-EYFP	67
3.16. Avaliação do comportamento motor e força muscular dos animais ChAT-ChR2-EYFP	68
3.17. Análise estatística	70
4. RESULTADOS	71
4.1. A exocitose de vesículas sinápticas não está alterada nos animais ChAT-ChR2-EYFP de 3 e 18 meses	71
4.2. O músculo diafragma dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam JNMs com alterações morfológicas e comprometimento na endocitose vesicular.	73
4.3. A análise qualitativa das micrografias eletrônicas das JNMs do músculo diafragma dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP	76
4.4. A análise da contração muscular indireta evidencia alterações na neurotransmissão dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP	78
4.5. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações no tamanho dos seus motoneurônios	80
4.6. As JNM do músculo EDL dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações morfológicas	84
4.7. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP exibem alterações morfológicas nas fibras musculares do EDL e Sóleo	86
4.8. O músculo Sóleo dos animais ChAT-ChR2-EYFP são menos resistentes à fadiga	90
4.9. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações no comportamento motor e na capacidade física	91

4.10. Os camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam alterações morfológicas no músculo gastrocnêmio.	95
4.11. Os camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam alterações morfológicas no músculo EDL associadas a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica.	97
4.12. Os camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam alterações morfológicas no músculo Sóleo associadas a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica.	102
4.13. O músculo EDL dos camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam sinais degenerativos associados à atrofia muscular.	107
4.14. Os camundongos VACHT KD ^{HOM} apresentam redução da capacidade física	109
5. DISCUSSÃO	112
5.1. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações degenerativas em componentes das U.M.	112
5.2. Os camundongos VACHT KD ^{HOM} , modelo de estudo para uma SMC exibem alterações em músculos de contração rápida e lenta	116
6. CONCLUSÃO	121
7. REFERÊNCIAS	122
8. ANEXOS	140
8.1. Artigo 1: Fast and slow-twitching muscles are differentially affected by reduced cholinergic transmission in mice deficient for VACHT: A mouse model for congenital myasthenia.....	140
8.2. Artigo 2: VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions.....	140
8.3. Artigo 3: Neuromuscular synapse degeneration without muscle function loss in the diaphragm of a murine model for Huntington's Disease.....	140
8.4. Artigo 4: Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AME – Atrofia muscular espinal

CD34 - Cluster of Differentiation 34

ChAT- Colina acetiltransferase

CHT1- Transportador de colina de alta afinidade

COPD – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

CS – Células satélites

CSA – Área de Secção Transversal

EDL – Extensor Longo dos Dedos

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

FF – Motoneurônios rápidos fadigáveis

FFR – Motoneurônios rápidos resistentes à fadiga

FM1- 43 - N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium
Dibromide

JNM – Junção Neuromuscular

M.E.E – Músculo Estriado Esquelético

MEPPs – Potenciais de placa motora em miniatura

MRFs – Fatores de regulação da miogênese

MTND-1 - mitochondrial DNA (mtDNA) encoding complex I

MuRF-1 - muscle RING-finger protein-1

Myf – Fator miogênico

MyHC – Myosin Heavy Chain

MyOD - myogenic differentiation 1

MyoG – Miogenina

nAChR – Receptor nicotínico para acetilcolina

NSF- N-ethylmaleimide Sensitive Factor

Pax-7- paired box protein 7

PGC1- α - Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha

Rab - GTPase-activating protein catalytic subunit

RS – Retículo Sarcoplasmático

SFR – Motoneurônios lentos resistentes à fadiga

SM1 – Proteína 1 de sobrevivência do neurônio motor
SMCs – Síndromes Miastênicas Congênitas
SNAP-25 - Synaptosomal-associated protein 25
SNAREs - soluble NSF attachment receptor
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD1 - Superóxido Dismutase
TN – Terminal nervoso
TT- Túbulos transversos
U.M – Unidade motora
VAcHT – Transportador Vesicular de Acetilcolina
VAMP-1 - vesicle-associated membrane protein
VGCC – Canais de cálcio sensíveis à voltagem
vGlut1- Transportador vesicular de glutamato
VMAT – Transportador vesicular de monoaminas
VS – Vesícula Sináptica
 α -BTX – α -Bungarotoxina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático evidenciando as Unidades Motoras e seus componentes	18
Figura 2: Localização dos aglomerados de motoneurônios na medula espinal e características de inervação dos diferentes tipos de fibras musculares pelos motoneurônios	20
Figura 3: Comportamento de diferentes categorias de unidades musculares no teste de fadiga de Burke	22
Figura 4: Diferenças morfológicas e moleculares entre os α e γ -motoneurônios	25
Figura 5: Estrutura das Junções Neuromusculares.....	27
Figura 6: Arquitetura estrutural e molecular da JNM	29
Figura 7: Ciclo de exocitose/endocitose e principais proteínas	32
Figura 8: Visão geral da neurotransmissão colinérgica e mecanismo de preenchimento das VS via VACHT	36
Figura 9: Representação esquemática da regeneração muscular	39
Figura 10: Representação da ativação do sistema ubiquitina-proteassoma e o papel das ubiquitinas ligases E3, Atrogina-1 e MuRF1 na atrofia muscular	41
Figura 11: Características dos tipos de fibras musculares das unidades motoras	45
Figura 12: Estrutura dos sarcômeros	47
Figura 13: Imagem representativa do gel de agarose mostrando os genótipos utilizados neste trabalho.....	55
Figura 14: A exocitose de vesículas sinápticas medida pela redução na intensidade de fluorescência das terminações marcadas com FM1-43 não é modificada pela maior expressão do VACHT nos camundongos ChAT–ChR2–EYFP nas idades de 3 e 18 meses.	72
Figura 15. As JNMs dos camundongos ChAT–ChR2–EYFP apresentam alterações estruturais e possível comprometimento da endocitose de vesículas sinápticas.....	75
Figura 16. Imagens das JNM do diafragma proveniente dos animais WT (3 meses) e ChAT-Ch2-EYFP	77
Figura 17. Margem de segurança da transmissão neuromuscular.....	79
Figura 18: Análise histológica dos prováveis motoneurônios α e γ/β no corno anterior da medula espinal lombar dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP.....	81
Figura 19: Os motoneurônios α da lâmina IX do corno anterior da medula espinal lombar dos camundongos ChAT-ChR2-EFP estão atrofiados.....	83

Figura 20. O músculo EDL dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP, apresentam JNM com redução de tamanho.....	85
Figura 21. O músculo EDL apresenta alterações morfológicas e na expressão das isoformas da MyHC.....	88
Figura 22. O músculo Sóleo apresenta alterações morfológicas nas fibras musculares dos animais ChAT-ChR2-EYFP.....	89
Figura 23. Teste de Fadiga do músculo EDL e Sóleo.....	90
Figura 24. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam maior atividade locomotora aos 3 meses de idade e redução no aprendizado motor aos 18 meses.....	93
Figura 25. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações no teste de incremento máximo (M.I.T). A.....	94
Figura 26. O músculo gastrocnêmio dos camundongos VChT KD ^{HOM} apresentam fibras em atrofia.....	96
Figura 27. Imagens representativas da morfologia do músculo EDL e tipos de fibras musculares.....	98
Figura 28. O músculo EDL dos camundongos VChT KD ^{HOM} , apresenta atrofia muscular em fibras rápidas, associado a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica. A. Quantificação da área total do EDL, evidenciando redução significativa nos animais VChT KD ^{HOM}	101
Figura 29. Imagens representativas da morfologia do músculo Sóleo e tipos de fibras musculares.....	103
Figura 30. O músculo Sóleo dos camundongos VChT KD ^{HOM} , apresenta fibras lentas em hipertrofia, associado a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica.....	106
Figura 31. As miofibrilas do músculo EDL dos camundongos VChT KD ^{HOM} exibem sinais degenerativos enquanto que o Sóleo está preservado.....	108
Figura 32. Os camundongos VChT KD ^{HOM} exibem comprometimento na capacidade física no TIM e falha no controle do consumo de oxigênio.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de fibras musculares	43
Tabela 2: Alterações musculares e seus efeitos em tipos específicos de fibras	48
Tabela 3: Genes relacionados às principais SMC, função e comprometimento	52
Tabela 4: Lista e sequências iniciadoras (primers) utilizadas para amplificação dos genes avaliados.....	67
Tabela 5: Resultados da fotodesmarcação (PB) e exocitose induzida por KCl (60mM) dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP aos 3 e 18 meses	72
Tabela 6: Resultados da análise das JNM do diafragma dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP utilizando o FM1-43 fx e α -bungarotoxina	74
Tabela 7: Análise histológica da medula lombar dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP	80
Tabela 8: Imunofluorescência dos neurônios ChAT e OPN+ dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP	82
Tabela 9: Resultados da análise das JNM do EDL dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP	84
Tabela 10: Resultados das análises dos músculos EDL e Sóleo	87
Tabela 11: Resultados das análises do comportamento motor.....	92
Tabela 12: Resultados das análises do teste de incremento máximo	92
Tabela 13: Resultados das análises do músculo EDL dos animais VACHT KD ^{HOM}	100
Tabela 14: Resultados das análises do músculo Sóleo dos animais VACHT KD ^{HOM}	105
Tabela 15: Resultados das análises do teste de incremento máximo dos animais VACHT KD ^{HOM}	109

RESUMO

Em mamíferos, a atividade muscular estriada esquelética depende da liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) pelas junções neuromusculares (JNM). Mudanças na neurotransmissão colinérgica estão associadas a uma variedade de distúrbios neuromusculares, incluindo as Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs). O armazenamento e liberação de ACh depende da atividade do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT), no qual já foram identificadas mutações recentemente associadas a um tipo de miastenia congênita humana. Entretanto, as consequências a longo prazo da perda ou aumento na expressão do VACHT para a integridade das unidades motoras (U.M) e músculos esqueléticos associados (o músculo faz parte da UM) não são bem conhecidas. Nessa tese, nós avaliamos as U.M em uma linhagem de camundongos que apresentam um aumento da expressão do VACHT, (ChAT-ChR2-EYFP). Nós também avaliamos os músculos esqueléticos de um modelo animal utilizado para estudo das SMCs, os camundongos VACHT KD^{HOM} , que apresentam redução na expressão do VACHT, déficit na liberação de ACh. Nossos resultados mostram alterações no tamanho dos motoneurônios nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP, juntamente com mudanças na reciclagem de vesículas sinápticas, liberação de ACh e estrutura das JNMs. Verificamos ainda, alterações morfofuncionais da musculatura esquelética e função motora dos animais. Em relação aos camundongos VACHT KD^{HOM} , nossas análises revelaram que enquanto as fibras musculares atrofiam do EDL, elas também hipertrofiam no sóleo. Associado a essas alterações celulares, vimos mudanças na expressão de marcadores para miogênese, (Pax-7, Myogenin, e MyoD), metabolismo oxidativo, (PGC1- α e MTND1), e degradação proteica (Atrogina-1 e MuRF1). Esses achados mostram que a atividade colinérgica fisiológica é necessária para manter a estrutura das U.M e que o aumento ou redução do VACHT, impacta significativamente tanto a estrutura quanto parâmetros funcionais.

ABSTRACT

In mammals, muscle activity is dependent on acetylcholine (ACh) release from neuromuscular junctions (NMJs), and changes with the cholinergic neurotransmission are associated with a variety of neuromuscular disorders, including congenital myasthenic syndromes (CMS). The storage and release of ACh depends on the activity of the Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT), whose loss of function mutations was recently shown to cause human congenital myasthenia. However, long-term consequences of VACHT loss or gain of function for the integrity of motor units and skeletal muscles are unknown. In this study, we examined the motor units in a mouse line with increased VACHT expression, the ChAT-ChR2-EYFP, which show 3x more VACHT expression than control. We also evaluated the skeletal muscles of a mouse model used to study CMS, the VACHT KD^{HOM}, presenting 65% reduction in VACHT expression, reduced ACh release and pronounced muscle weakness. Using the ChAT-ChR2-EYFP mice, we evaluated the morphology of motoneurons, structural and functional parameters of the (NMJs), the morphology of muscle fibers, fiber type (myosin heavy chain isoforms). In addition, we analyzed mice motor function. With the VACHT KD^{HOM} mice, we assessed structural parameters of different skeletal muscles varying the expression of the MyHC, the gastrocnemius, Extensor Digitorum Longus (EDL) and soleus, We also evaluated the fiber type composition and expression of muscle-related genes in the (EDL) and soleus muscles. The performance of VACHT KD^{HOM} mice was also assessed in a physical capacity test. Our results showed changes with the size of motoneurons in the ChAT-ChR2-EYFP mice, together with alterations with synaptic vesicle recycling, ACh release and structure of NMJs. We also verified morphofunctional changes with skeletal muscles and mice motor function. In relation to the VACHT KD^{HOM} mice our analysis revealed that while muscle fibers atrophy in the EDL, they hypertrophy in the soleus muscle of KD^{HOM} mice. Along with this cellular changes, skeletal muscles exhibited altered levels of markers for myogenesis (Pax-7, Myogenin, and MyoD), oxidative metabolism (PGC1- α and MTND1), and protein degradation (Atrogin1 and MuRF1). These findings reveal that physiological cholinergic activity is important to maintain the structure of motor units and that increasing or reducing VACHT expression, and consequently ACh release, significantly impacts either the structure of the components of motor units as well as mice functional parameters.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Unidade Motora

O conceito de Unidade de Motora (U.M) surgiu no século XX com as descobertas de Lidell e Sir Charles Scott Sherrington (1925), no artigo intitulado “ Recruitment and some other features of reflex inhibition”. Esse trabalho definiu as U.M como a unidade básica da atividade motora, ou a via final comum ao movimento. (LIDDELL; SHERRINGTON, 1925). A contribuição de Sherrington para o avanço no conhecimento da comunicação nervosa levou a indicação e, finalmente a conquista do prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1932, o qual foi compartilhado com o neurofisiologista Edgar Douglas Adrian, pelas suas descobertas acerca do funcionamento dos neurônios (NOBEL *et al.*, 1932).

Cada U.M é formada por grandes células localizadas no corno anterior da medula espinal (os motoneurônios), os seus prolongamentos (axônios motores) e as fibras musculares inervadas por esses últimos (BUCHTHAL; SCHMALBRUCH, 1980). Cada axônio motor, ao aproximar-se das fibras musculares, perde a bainha de mielina e dessa forma, ramos não mielinizados dos axônios espalham-se ao longo da fibra muscular, formando estruturas denominadas de Junções Neuromusculares (JNM). Em mamíferos, a JNM consiste em uma sinapse química na qual a acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor responsável por desencadear o processo de contração das fibras musculares estriadas esqueléticas (BIRKS, BY R; HUXLEY; KATZ, 1960; SANES; LICHTMAN, 1999b). Em uma mesma U.M há grande homogeneidade, de modo que praticamente todas as fibras musculares dessa via final do movimento são inervadas pelos mesmos motoneurônios e apresentam a mesma composição da Cadeia Pesada de Miosina (MyHC), o que denota os tipos de fibras musculares que compõem essa U.M (MCPHEDRAN; WUERKER; HENNEMAN, 1965; EDSTROM; KUGELBERG, 1968; CHAKKALAKAL *et al.*, 2010; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011a) (FIGURA 1).

Nas próximas sessões dessa introdução discutiremos com mais detalhes cada componente dessa U.M.

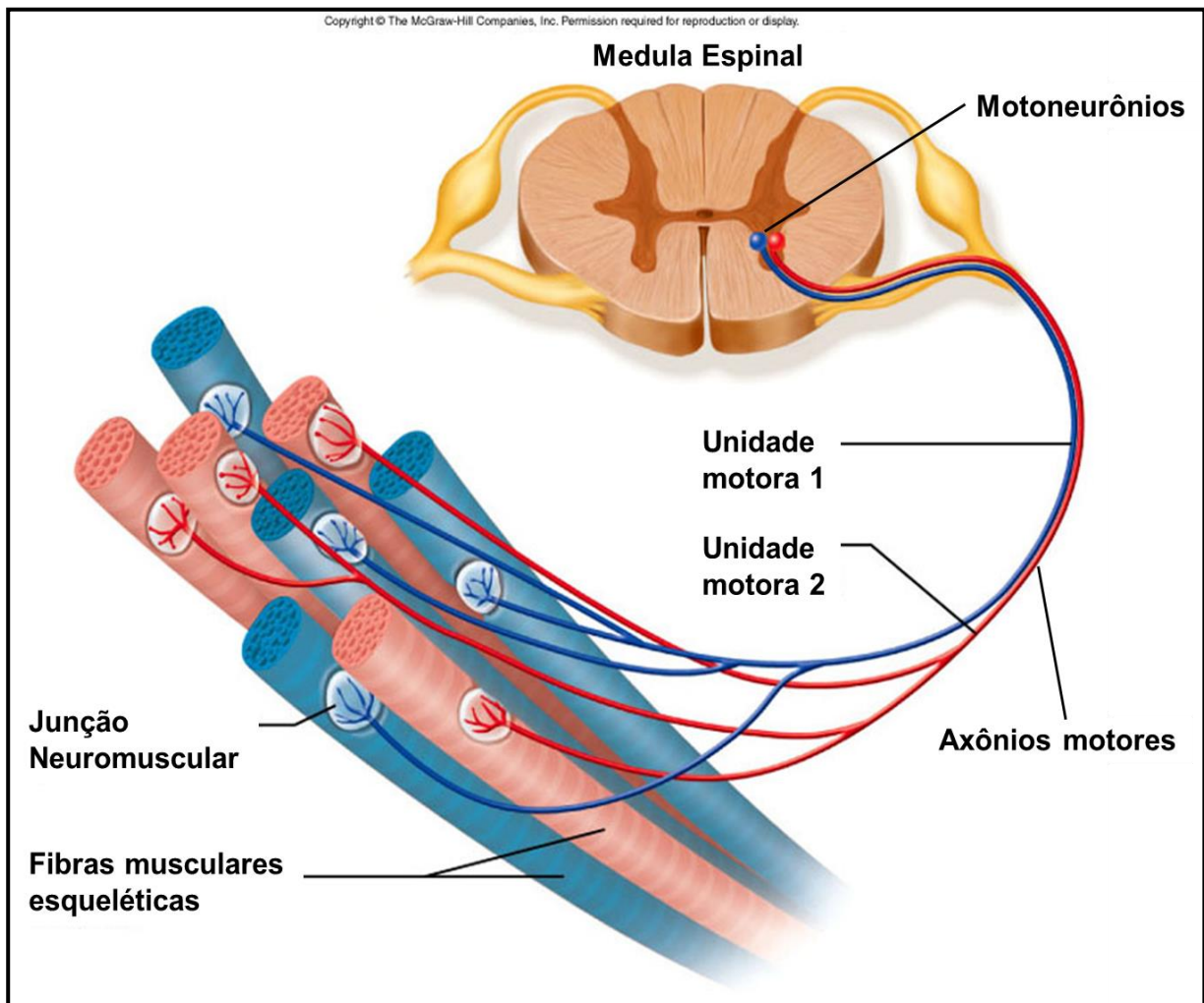


Figura 1: Desenho esquemático evidenciando as Unidades Motoras e seus componentes. No esquema é possível a identificação de duas unidades motoras distintas que foram artificialmente coloridas para fins didáticos. A U.M é composta pelos motoneurônios localizados no corno anterior da medula espinhal, pelos axônios motores e pelas fibras musculares esqueléticas inervadas por eles. O contato formado entre a porção final do axônio motor e as fibras musculares recebe o nome de Junção Neuromuscular. Adaptado de *Anatomy & physiology: the unity of form and function*. Dubuque: McGraw-Hill, 2010.

1.1.1. Os motoneurônios inferiores

No Sistema Nervoso Central (SNC) de mamíferos, os motoneurônios são células extensivamente estudadas de modo que as suas funções são precisamente conhecidas (MANUEL; ZYTNICKI, 2011). Muito importante para esse fato, foi a valiosa contribuição de grandes pesquisadores que conseguiram decifrar as várias vias sinápticas que incidem sobre os motoneurônios (extremamente importantes para o controle fino dessas células), bem como estudos que desvendaram as propriedades intrínsecas dos motoneurônios e como o padrão de disparo dessas células se adaptam as características mecânicas das fibras musculares (revisado por MANUEL; ZYTNICKI, 2011). Dentre esses grandes nomes, pode-se citar o de Sir John C. Eccles, aluno de Sherrington e que criou sofisticados métodos de registros eletrofisiológicos, sendo o primeiro a coletar registros intracelulares dessas células do SNC. Juntamente com Alan L. Hodgking e Andrew F. Huxley, Eccles compartilhou o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1963, devido às suas descobertas relacionadas aos mecanismos iônicos envolvidos na excitação e inibição de células nervosas do SNC e SNP (NOBELPRIZE.ORG, 2014).

Os motoneurônios constituem uma classe de células nervosas de grande heterogeneidade que se diferem de acordo com a função exercida (dependendo do tipo de fibra muscular que inervam), por apresentarem características elétricas distintas, por serem controlados por diferentes vias, propriedades moleculares e susceptibilidade a neurodegeneração (MANUEL; ZYTNICKI, 2011).

Essas células estão agrupadas na lâmina IX de Rexed (em homenagem ao neuroanatomista que primeiro os descreveram) (REXED, 1954) (FIGURA 2), sendo responsável pela contração das fibras musculares por eles inervadas. De acordo com as suas características morfológicas, eletrofisiológicas, e tipos de fibras que inervam, os motoneurônios são classificados em três tipos, a saber: α , β e γ (STIFANI, 2014) (FIGURA 2). Além disso, essas três classes de motoneurônios apresentam subclassificações que serão exploradas a seguir. Antes de prosseguirmos com as classificações, é importante que se faça uma pequena consideração acerca das fibras musculares inervadas por essas células. Na musculatura estriada esquelética, existem dois tipos de fibras, as extrafusais, diretamente inervadas pelos α -motoneurônios, mas também por alguns ramos colaterais de β -motoneurônios; e as fibras musculares intrafusais, que compõem os chamados fusos musculares envolvidos na propriocepção, funcionando como receptores de estiramento das fibras do músculo (participando do reflexo de estiramento). Essas fibras, diferentemente das

extrafusais que estão espalhadas pelo músculo, são pequenas fibras envolvidas por uma cápsula externa constituída por um tecido conjuntivo e a sua inervação provém de β e γ -motoneurônios (STIFANI, 2014). Além disso, as fibras extrafusais podem ser classificadas em quatro tipos de acordo com a expressão das isoformas da MyHC, o que também denota a velocidade de contração dessas fibras. Assim sendo, a musculatura esquelética humana, de modo geral, apresenta três tipos predominantes, a saber: tipo 1, 2A e 2X, sendo nessa ordem a classificação da velocidade de contração (SCHIAFFINO, 2010). Em roedores, além das três isoformas citadas, existem ainda as fibras do tipo 2B que apresentam velocidade de contração superior a 2X (SCHIAFFINO, 2010).

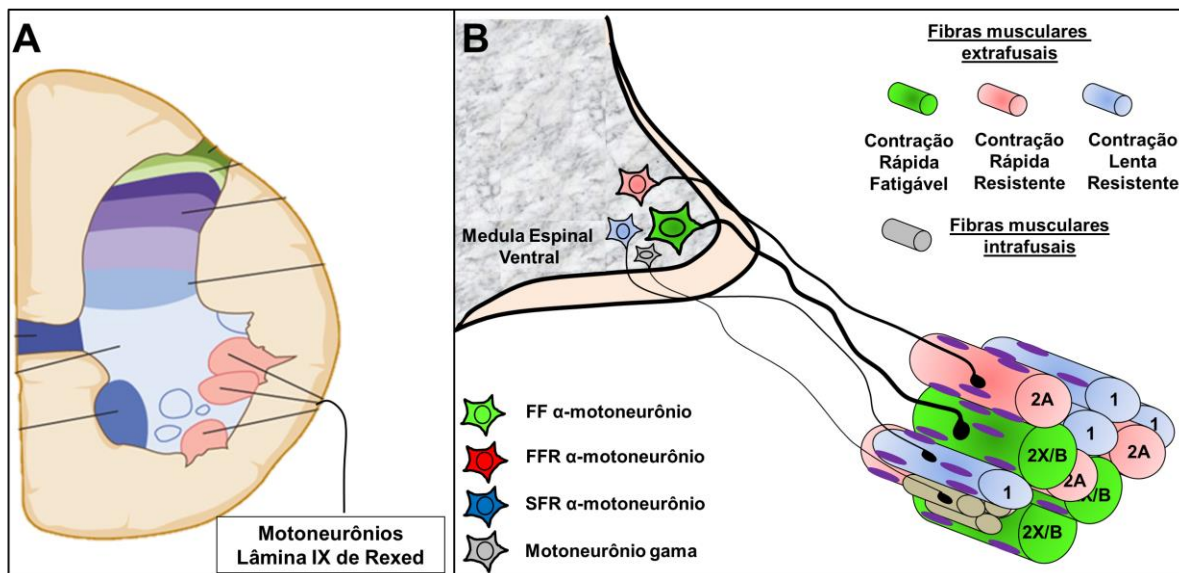


Figura 2: Localização dos aglomerados de motoneurônios na medula espinhal e características de inervação dos diferentes tipos de fibras musculares pelos motoneurônios. **A.** Localização dos *pools* de motoneurônios da lâmina IX de Rexed. Esquema modificado a partir de: Stephen G. Waxman. Clinical Neuroanatomy, Twenty-Eight Edition. McGraw-Hill Education. **B.** Representação das unidades motoras evidenciando as características dos motoneurônios e fibras musculares por eles inervadas. Os α -motoneurônios rápidos sensíveis à fadiga (FF) estão representados em verde e são responsáveis pela inervação de fibras rápidas do tipo 2X/B. Repare que tanto o neurônio quanto às fibras musculares são maiores em relação aos outros tipos, em especial aos α -motoneurônios lentos resistentes à fadiga (SFR) representados em azul e que inervam as fibras musculares lentas do tipo 1. Estão também representados os α -motoneurônios rápidos resistentes (FFR), representados de vermelho e que inervam as fibras rápidas do tipo 2A. No esquema, há também os γ -motoneurônios, representados em cinza e responsáveis pela inervação das fibras musculares intrafusais. Esquema modificado a partir de: Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. Frontiers in cellular neuroscience, 8.

De posse dessas informações, prosseguiremos agora com a classificação dos motoneurônios α , β - γ . Os neurônios motores do tipo α são os principais responsáveis pela inervação e contração das fibras musculares extrafusais (STAFI, 2014). São células que apresentam grande diâmetro (30 a 40 μ m) em comparação aos outros dois tipos de motoneurônios (15 a 35 μ m) (JOHNSON, 1985; KERNELL, 2006). Assim como as fibras musculares são descritas de acordo com a velocidade de contração da MyHC e por diferentes graus de resistência à fadiga, os α -motoneurônios também foram classificados em três tipos de acordo com o tipo de fibras extrafusais que inervam e graus de fadiga. Dessa forma, classificam-se os motoneurônios em: i) lentos resistentes à fadiga (inervam as fibras do tipo 1), (SFR – Slow Fatigable Resistant); ii) rápidos resistentes (inervação de fibras do tipo 2A), (FFR- Fast Fatigable Resistant) e iii) rápidos sensíveis à fadiga (inervação de fibras do tipo 2X e 2B), (FF – Fast Fatigable) (BURKE et al., 1973; STAFI, 2014) (FIGURA 2). A figura 3 evidencia as diferenças fisiológicas entre os três tipos de unidades musculares a partir de sofisticados experimentos realizados por Burke e colaboradores (1973), que possibilitaram essa classificação. Além disso, diferenças na velocidade de condução axonal do impulso nervoso variam de acordo com os três tipos de motoneurônios apresentados, de forma que os SFR apresentam velocidade de 85m/s e os FFR e FF conduzindo impulsos a 100m/s (BURKE et al., 1973).

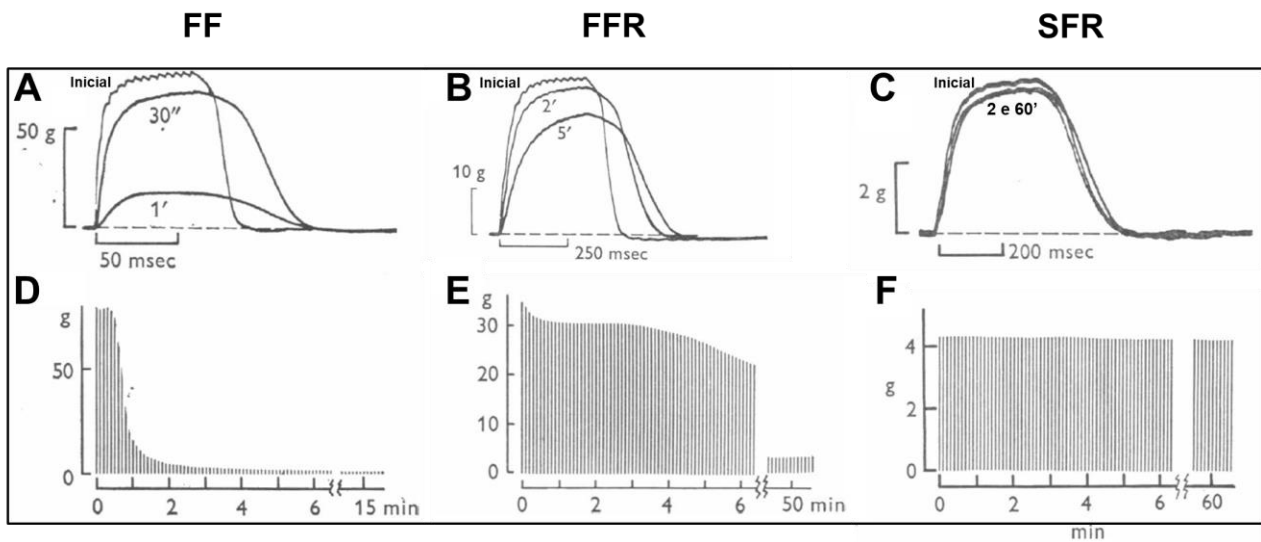


Figura 3: Comportamento de diferentes categorias de unidades musculares no teste de fadiga de Burke. Registros de força da contração isométrica a partir das unidades musculares tipos FF, FFR e SFR no gastrocnêmio de gato. Estímulos de 40Hz fornecidos por 0,33s e repetidos a cada segundo. **A-C.** Registro das forças de contração obtidas inicialmente e após vários minutos. Na unidade SFR repare que os minutos 2 e 60 apresentam sobreposição de curvas, o que indica a alta resistência à fadiga dessas unidades. **D-F.** Amplitudes máximas da contração plotadas em relação ao tempo durante o teste de fadiga. Analisando os gráficos é possível perceber que as unidades FF e FFR apesar de nos primeiros minutos apresentarem um grau de contração máxima muito superior às unidades SFR, as mesmas não conseguem manter o mesmo nível de contração muscular nos minutos subsequentes, entrando rapidamente em fadiga, diferentemente ao que ocorre com as unidades SFR que conseguem estabilizar do início ao fim o mesmo grau de contração muscular. Adaptado de Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P., & Zajac, F. 3. (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *The Journal of Physiology*, 234(3), 723-748.

Como será percebido, o neurônio motor do tipo β é pouco estudado e não existem na literatura muitas referências. É comum encontrar a descrição dessas células juntamente com os γ -motoneurônios, uma vez que ambos inervam as fibras musculares intrafusais.

É importante esclarecer para o leitor, que as fibras musculares dos fusos são constituídas por três tipos, a saber: bolsa nuclear (b1 e b2), e cadeia nuclear. As fibras do tipo bolsa nuclear apresentam terminações sensoriais aferentes denominadas Ia (terminações primárias) e que detectam a taxa de mudança no comprimento do músculo (mudanças dinâmicas) e as fibras em cadeia nuclear detectam mudanças estáticas no comprimento muscular e apresentam as terminações sensoriais do tipo II (terminações secundárias). Essas terminações (Ia) estão espiraladas em torno dessas fibras musculares e provém dos neurônios sensoriais localizados no gânglio da raiz dorsal, que fazem sinapse com os motoneurônios do

tipo α , informando ao SNC o grau de estiramento das fibras musculares e o quanto de tensão será necessário produzir (STIFANI, 2014).

Os motoneurônios do tipo γ , são em média, três vezes menores que os α (FRIESE *et al.*, 2009) e inervam apenas as fibras intrafusais, controlando de maneira exclusiva a sensibilidade dos fusos musculares. As suas terminações encontram-se nos polos dos fusos musculares, que por sua vez correm em paralelo às fibras extrafusais, mas não apresentam o mesmo comprimento. O disparo desses motoneurônios aumenta a tensão sobre as fibras musculares, mimetizando o estiramento do músculo. Os γ -motoneurônios são classificados em estáticos, responsáveis pela inervação das fibras em cadeia nuclear e bolsa nuclear; e os dinâmicos, inervando as fibras em bolsa nuclear. Esses neurônios não possuem função motora, recebendo apenas contatos sensoriais, contribuindo para a modulação da contração muscular juntamente com os α -motoneurônios (STIFANI, 2014).

Quando o músculo está em repouso (não estirado), potenciais de ação (PAs) são gerados constantemente pelas terminações sensoriais que inervam as fibras intrafusais. Uma vez detectado o estiramento do músculo, os fusos musculares aumentam os PAs consideravelmente. Em seguida, os α -motoneurônios são ativados levando a contração do músculo. No entanto, se nesse momento apenas os α -motoneurônios fossem ativados, os fusos musculares ficariam quiescentes e não mais responderiam a mudanças de comprimento das fibras. Dessa forma, normalmente ocorre uma co-ativação de motoneurônios α e γ , de forma que os fusos musculares são ativados concomitantemente com as fibras extrafusais, mantendo a tensão exercida sobre as fibras intrafusais, tornando possível a sinalização de novas alterações no comprimento do músculo (KERNELL, 2006).

Em relação às diferenças morfológicas entre α e γ -motoneurônios, um estudo desenvolvido em 1986 descreveu diferenças ultraestruturais em neurônios de grande e pequeno diâmetro, uma vez que nessa época não existiam marcadores que pudessem diferenciar os α dos γ -motoneurônios. Nesse estudo, os pesquisadores injetaram solução de peroxidase (HRP) no músculo de gato para avaliar a incorporação dessa enzima pelos motoneurônios, facilitando a identificação de neurônios que inervam especificamente determinado músculo. Os resultados mostraram que no geral não havia grandes mudanças em termos da organização citoplasmática/nuclear dessas células, apenas verificou-se que os neurônios de menor diâmetro ($<30\mu\text{m}$) apresentavam redução na frequência da substância de Nissl, em comparação com os neurônios de grande diâmetro ($>40\mu\text{m}$) (JOHNSON, 1986). No entanto, percebeu-se que em termos da organização sináptica, os neurônios menores

apresentavam redução significativa na frequência sináptica (número de terminais a cada 100 μ m de comprimento da membrana plasmática) e na cobertura sináptica (comprimento das sinapses por 100 μ m de membrana plasmática) (JOHNSON, 1986). Além disso, os pesquisadores diferenciaram a frequência de sinapses no soma e dendritos dessas células que apresentavam sinapses do tipo S (sinapses com vesículas esféricas, presumidamente excitatórias) e F (vesículas achatadas ou pleomórficas associadas às sinapses inibitórias) (KERNELL, 2006). Johnson (1986) demonstrou que ambos os tipos de sinapses, apresentavam-se significativamente reduzidas nos neurônios de menor diâmetro. Com esses resultados, foi possível concluir que os grandes motoneurônios eram os α e os de menor diâmetro eram os γ .

Recentemente, foi possível determinar que os α -motoneurônios recebem grande quantidade de sinapses glutamatérgicas derivadas de aferentes proprioceptivos (terminações primárias Ia), diferentemente dos γ -motoneurônios (FRIESE *et al.*, 2009). Dessa forma, a redução da frequência de contatos sinápticos observado por Johnson (1986) nos neurônios de menor diâmetro está relacionada à redução de sinapses tanto glutamatérgicas quanto colinérgicas (FRIESE *et al.*, 2009). A figura 4 exemplifica a diferença no tamanho dessas células e características de inervação.

Do pericário dos motoneurônios partem os axônios motores mielinizados, que levarão o impulso gerado no soma para o alvo final da unidade motora, as fibras musculares esqueléticas. Os axônios motores, quando se aproximam da fibra muscular, se ramificam em porções não-mielinizadas para inervar as várias fibras musculares que compõem a unidade motora, dando origem as estruturas denominadas de JNM (BIRKS, R.; HUXLEY; KATZ, 1960).

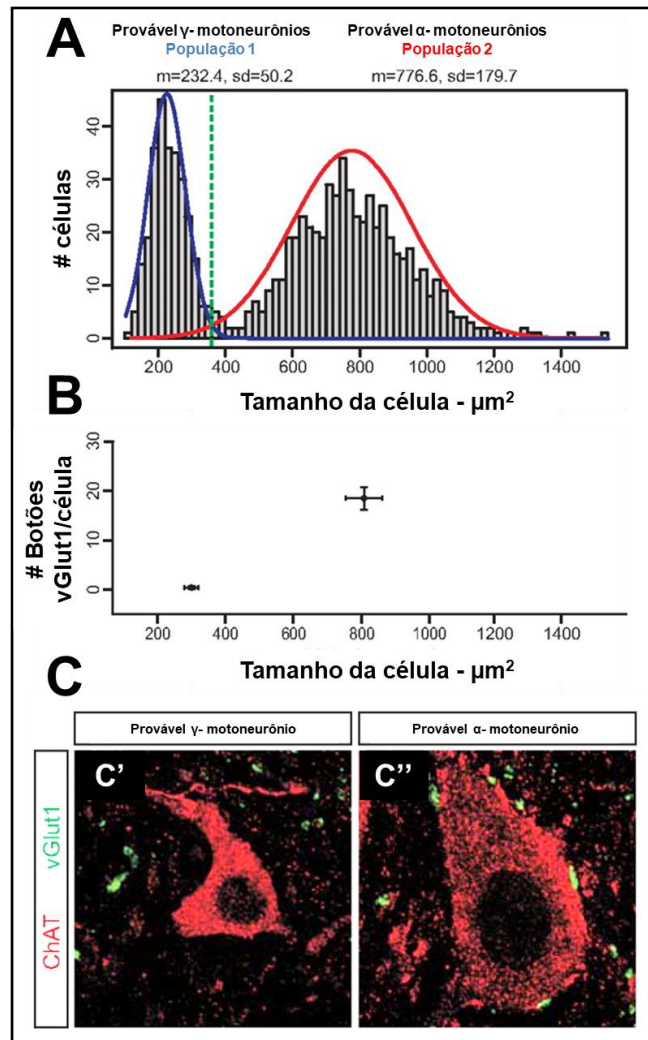


Figura 4: Diferenças morfológicas e moleculares entre os α e γ -motoneurônios. **A.** Histograma de classificação do tamanho das células, evidenciando uma distribuição bimodal onde se percebe a existência de uma população de células com $\sim 232\mu\text{m}^2$ (prováveis γ -motoneurônios) e outra população com $\sim 777\mu\text{m}^2$ (prováveis α -motoneurônios). **B.** Classificação das células de acordo com a presença de botões sinápticos glutamatérgicos (marcação com anticorpo anti-transportador vesicular de glutamato – vGlut1) derivados de aferentes sensoriais que inervam os fusos musculares e tamanho das células. Percebe-se que a população 1 de neurônios não apresentam marcação para o vGlut1 indicando uma população de neurônios do tipo γ . No entanto, os α -motoneurônios apresentam na média, maior quantidade de terminações glutamatérgicas em seu corpo celular. **C.** Imagens representativas da marcação de duas células com anticorpos anti-colina acetiltransferase (ChAT-vermelho), uma vez que todos os motoneurônios são colinérgicos e anticorpo anti-vGlut1 (em verde). É clara a diferença de tamanho entre as duas células e a presença de botões sinápticos glutamatérgicos na célula C'', define esse neurônio como sendo um α , e o da esquerda, com ausência de botões vGlut1 +, um γ -motoneurônio (C'). Figura adaptada de: (FRIESE *et al.*, 2009).

1.1.2. A Junção Neuromuscular (JNM)

A demonstração da natureza química da transmissão sináptica se iniciou com os esforços de Otto Loewi, que primeiro identificou em 1921 uma substância química liberada pela estimulação do nervo vago de rãs, que quando colocada na presença de corações isolados, era capaz de reduzir a frequência cardíaca (LOEWI, 1921). A essa substância, Loewi classificou como “vagusstoff”, posteriormente denominada acetilcolina (ACh). Na mesma época, Sir Henry Hallet Dale, utilizando preparações de JNM de gatos, conseguiu demonstrar que o estímulo de fibras nervosas motoras em músculos de contração voluntária, causava a liberação de ACh que era detectada no sangue. Além disso, demonstraram que a desnervação completa do músculo resultava no bloqueio da liberação de ACh, e que o bloqueio da transmissão do impulso para as fibras musculares pela utilização do curare, não impedia a exocitose de ACh (DALE; FELDBERG; VOGT, 1936). Juntamente com Otto Loewi, Sir Henry Dale recebeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, por suas descobertas relacionadas à transmissão química dos impulsos nervosos (NOBELPRIZE.ORG, 1936). Após a demonstração da natureza química da transmissão sináptica, Bernard Katz e colaboradores, utilizaram as JNM para demonstrar que a ACh era liberada na fenda sináptica de uma forma quântica e fazia-se por meio de vesículas sinápticas (KATZ, 1966). Mais tarde, o primeiro receptor de neurotransmissores a ser purificado e clonado foi o receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR) (DUCLERT; CHANGEUX, 1995).

A JNM de mamíferos é, portanto, uma sinapse química colinérgica composta por uma terminação nervosa pré-sináptica contendo inúmeras vesículas sinápticas colinérgicas, mitocôndrias e componentes do citoesqueleto axonal. Em oposição ao componente pré-sináptico encontram-se as invaginações pós-juncionais, que são projeções do sarcolema da fibra muscular onde se encontram os AChR. Entre os componentes pré e pós-sinápticos há uma estreita fenda sináptica onde a ACh é liberada. A função primordial dessa sinapse é transferir impulsos de uma terminação motora relativamente pequena para uma fibra muscular de grande comprimento e diâmetro e, assim, desencadear a contração muscular (KATZ, 1966). Devido à sua simplicidade estrutural e acessibilidade, a JNM é um dos modelos de sinapses mais estudados e melhor compreendidos (KUMMER; MISGELD; SANES, 2006) (FIGURA 5).

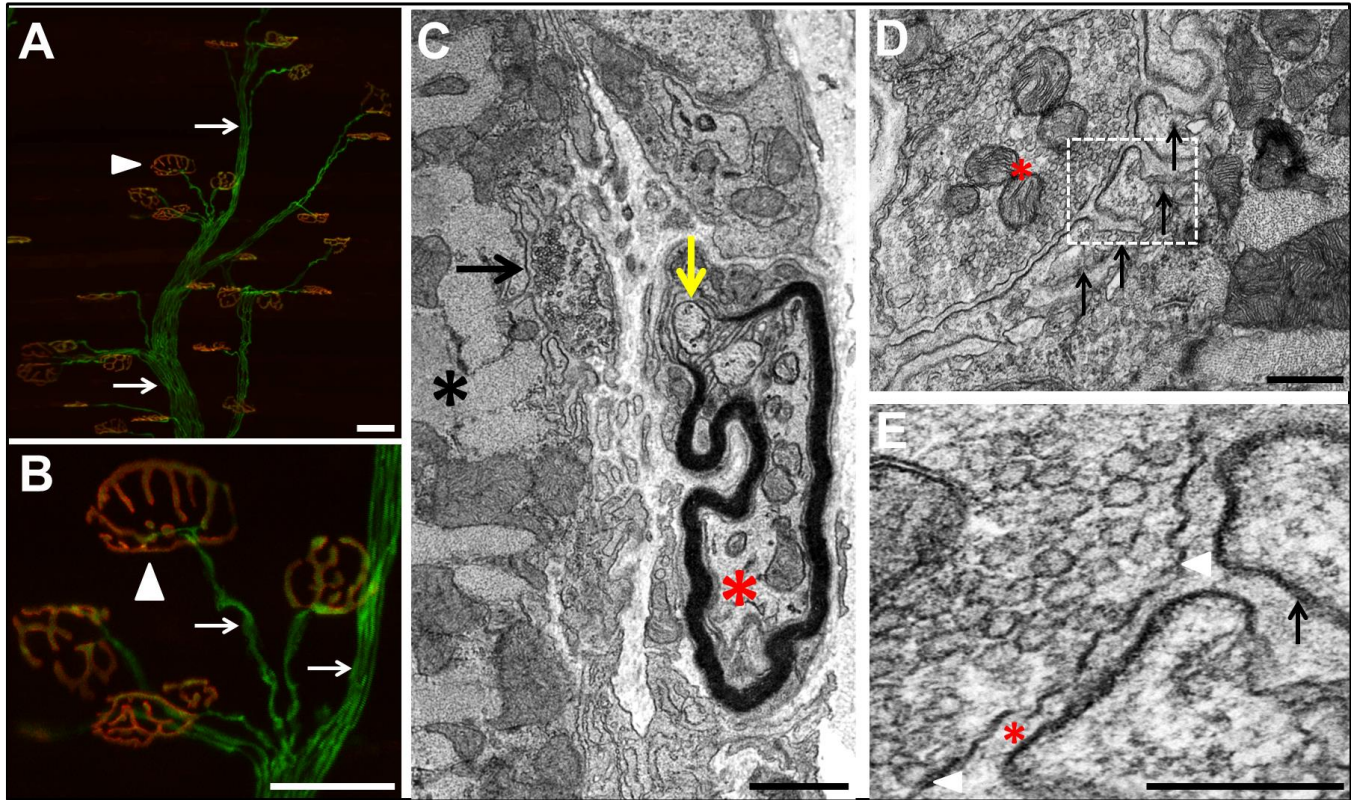


Figura 5: Estrutura das Junções Neuromusculares. **A.** Na imagem é possível visualizar várias JNM do músculo EDL de camundongo. As setas mostram porções do axônio motor (em verde pela proteína fluorescente YFP). A cabeça de seta evidencia uma JNM (em amarelo, pela sobreposição do componente pré-sináptico (verde) com os nAChRs evidenciados em vermelho). Barra de escala: 50 μ m. Imagem: Satoshi e Valdez, 2016. **B.** JNM de A em maior aumento evidenciando a estrutura da sinapse em forma de *pretzel*. Setas brancas (porções do axônio motor). Cabeça de seta (JNM). Barra de escala: 50 μ m. **C.** Imagem panorâmica do músculo diafragma onde é possível identificar um corte do axônio motor mielinizado (asterisco vermelho). Repare que na sua porção final, o axônio motor perde a bainha de mielina, indicando sua aproximação da fibra muscular (seta amarela), e a JNM é evidenciada logo abaixo da porção não-mielinizada do axônio (seta preta). O asterisco preto indica a fibra muscular. Barra de escala: 1,0 μ m. Imagem: Magalhães-Gomes; Rodrigues; Andrade, 2017. **D.** Imagem de uma JNM (asterisco vermelho) composta por inúmeras vesículas sinápticas e mitocôndrias. As setas pretas indicam as invaginações pós-juncionais, as projeções da membrana da célula muscular. Barra de escala: 500nm. Imagem: Magalhães-Gomes; Rodrigues; Andrade, 2017. **E.** A imagem é um aumento da região demarcada em D, mostrando com mais detalhe a íntima relação entre o terminal pré-sináptico (contendo as vesículas sinápticas) e as projeções do músculo onde estão presentes os nAChRs. Esses componentes estão separados por uma estreita fenda sináptica (asterisco vermelho). As cabeças de setas brancas indicam duas zonas ativas. A seta preta indica uma projeção da célula muscular. Barra de escala: 200nm.

Apesar do conhecimento acerca da função e estrutura das JNM de vertebrados, até então, poucos dados existiam sobre as JNM de seres humanos. Recentemente, foi publicado um artigo comparando a JNM humana com a de roedores e os resultados foram surpreendentes, uma vez que mostram grandes diferenças na estrutura dessas sinapses de humanos comparada às de roedores (JONES *et al.*, 2017). Esses pesquisadores mostraram que a JNM humana apresenta-se significativamente menor que as de roedores e morfologicamente é menos complexa que as JNM de outros mamíferos, comparando-se os mesmos músculos. Além disso, um dado ainda controverso mostra que a JNM humana não sofre alterações degenerativas decorrentes do envelhecimento como já demonstrado por vários trabalhos em roedores, onde as JNM são mais fragmentadas (ANIS; ROBBINS, 1987; BALICE-GORDON; LICHTMAN, 1990; VALDEZ *et al.*, 2010; WILLADT; NASH; SLATER, 2016). No entanto, tem que se levar em consideração que esse estudo avaliou a progressão de idade apenas em um único músculo, o *peroneous longus*, que apresenta grande proporção de fibras musculares de contração lenta, o que confere maior resistência à unidade motora. Esse estudo mostrou ainda que a distribuição de proteínas sinápticas e vias moleculares na JNM é diferente da JNM humana comparada a de outros vertebrados (JONES *et al.*, 2017).

A JNM é formada por uma grande quantidade de proteínas (pré, sinápticas e pós-sinápticas) que exercem funções vitais para a formação, desenvolvimento e manutenção dessa sinapse, de forma que alterações nessas proteínas estão associadas a doenças neuromusculares, muitas delas de caráter genético-hereditário, conhecidas como Síndromes Miastênicas Congênitas (SMC) (MCMACKEN *et al.*, 2017a) A figura 6 evidencia as principais proteínas que compõem as JNM e destacam-se as proteínas alvos de mutações que estão associadas às SMC.

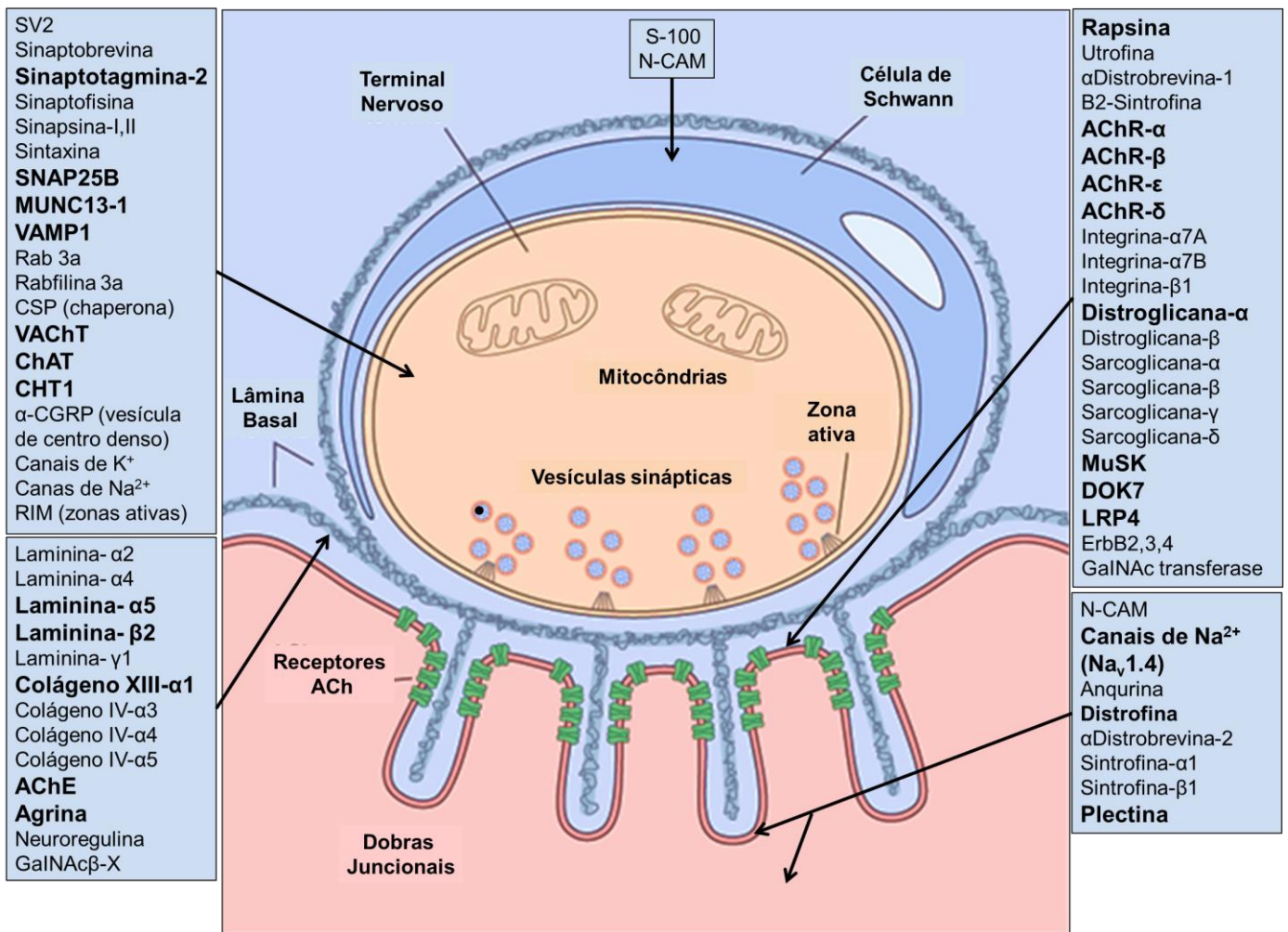


Figura 6: Desenho esquemático da ultraestrutura e organização molecular da JNM. A figura evidencia a JNM com os seus componentes pré-sináptico (terminal nervoso), sináptico (fenda sináptica e lâmina basal) e pós-sináptico (dobras juncionais da fibra muscular adjacente). Estão apontadas na figura, as principais proteínas que compõe a JNM e a localização geral das mesmas. Para o estudo da função dessas proteínas, vários animais modificados geneticamente foram gerados. Algumas proteínas estão evidenciadas em negrito indicando alvos moleculares de doenças neuromusculares já descritas e identificadas em pacientes, em especial aqueles que apresentam SMC. Na figura, a distrofina foi evidenciada por estar associada a quadros de distrofias musculares, no entanto, ela não se caracteriza dentro das SMC, pois o defeito primário ocorre fora da JNM. Imagem adaptada de: (“Formation and Elimination of Synapses | Principles of Neural Science, Fifth Edition | AccessNeurology | McGraw-Hill Medical”, [S.d.]; MCMACKEN *et al.*, 2017a; NICOLE *et al.*, 2017; SANES; LICHTMAN, 1999a)

A transmissão sináptica é iniciada quando um potencial de ação dispara a liberação de neurotransmissores a partir de um terminal nervoso pré-sináptico. O potencial de ação induz a abertura de canais para cálcio (Ca^{2+}) sensíveis à voltagem e o aumento transiente e localizado da concentração intracelular de cálcio resulta na exocitose de vesículas sinápticas (KATZ, 1966).

O terminal pré-sináptico típico é uma porção especializada do axônio motor. É caracterizado por uma zona ativa, que é uma região em que a membrana plasmática do terminal pré-sináptico está em contato íntimo com a membrana plasmática pós-sináptica, além da presença de um aglomerado de vesículas sinápticas.

Todas as funções pré-sinápticas, direta ou indiretamente, envolvem vesículas sinápticas, que se submetem a um tráfego cíclico, o qual pode ser descrito em dois grandes eventos: (1) Exocitose: neste fenômeno, (a) os neurotransmissores são ativamente transportados para dentro das vesículas sinápticas; (b) as vesículas agrupam-se nas zonas ativas; (c) ancoram-se nesta; (d) amadurecem e então; (e) tornam-se competentes para a fusão e consequente exocitose disparada por cálcio. (SÜDHOF, 2013c). (2) Endocitose: após a exocitose, as vesículas sinápticas são endocitadas e recicladas por uma de três vias alternativas: (a) “Kiss and Run” (CECCARELLI; HURLBUT; MAURO, 1973; SOYKAN; HAUCKE, 2016); (b) endocitose mediada por capa de clatrina (Heuser e Reese, 1973; SOYKAN; HAUCKE, 2016); (c) endocitose via invaginação de membrana e formação de cisternas, das quais podem brotar vesículas cobertas por clatrina (RICHARDS; GUATIMOSIM; BETZ, 2000; TAKEI *et al.*, 1996).

A transmissão sináptica química requer as seguintes etapas: (1) a síntese de um neurotransmissor no terminal pré-sináptico; (2) o armazenamento dos neurotransmissores em vesículas sinápticas; (3) a liberação regulada dos neurotransmissores; (4) a presença de receptores específicos para os neurotransmissores na membrana pós-sináptica; (5) e um mecanismo para finalizar a ação dos neurotransmissores (SÜDHOF, 2013).

A exocitose de vesículas sinápticas é responsável pela liberação dos neurotransmissores. Esse evento é regulado por interações importantes entre proteínas presentes na membrana da vesícula e na membrana do terminal pré-sináptico (proteínas do complexo SNARE), que se entrelaçam promovendo a abertura de um poro de fusão e liberação de seu conteúdo na fenda sináptica (SÜDHOF, 2013). A fusão eficiente das vesículas com a membrana do terminal nervoso requer uma estreita relação entre as proteínas do complexo SNARE (RIZZOLI, 2014). Na exocitose de vesículas sinápticas, as proteínas

relevantes do complexo SNARE são: Sinaptobrevina/VAMP 1 e 2, também chamadas de v-SNAREs (vesicular SNAREs), Syntaxina e SNAP-25, conhecidas também como t-SNAREs (target SNAREs) (RIZZOLI, 2014; SÜDHOF, 2013a). A fusão das membranas que permite a exocitose das vesículas ocorre pela interação progressiva entre as proteínas do complexo SNARE. No que diz respeito à localização, a sinaptobrevina está localizada primariamente na membrana da vesícula, syntaxina e SNAP-25 na membrana plasmática do terminal pré-sináptico.

Além dessas, outra proteína de grande relevância para o processo e que está envolvida com a sinalização do Ca^{2+} é a Sinaptotagmina I. Quando ocorre um aumento na concentração intraterminal de Ca^{2+} , a sinaptotagmina I, localizada na membrana da vesícula, altera sua conformação e interage mais fortemente com as proteínas do complexo SNARE e com fosfolípidos da membrana, promovendo a abertura de um poro de fusão e consequente liberação dos neurotransmissores (BAI *et al.*, 2016; SAHEKI; DE CAMILLI, 2017). Em condições de repouso as vesículas sinápticas sofrem fusão naturalmente com a membrana plasmática, entretanto, quando ocorre um potencial de ação que leva a um aumento no Ca^{2+} citosólico, a taxa de vesículas que se fundem a membrana aumenta drasticamente (SAHEKI; DE CAMILLI, 2017). Após a liberação de seu conteúdo, as vesículas passam por um processo de endocitose compensatória, reciclagem e repleenchimento com neurotransmissor para possibilitar um novo ciclo (RIZZOLI, 2014). A Figura 7 traz o ciclo de exocitose/endocitose e as principais proteínas envolvidas.

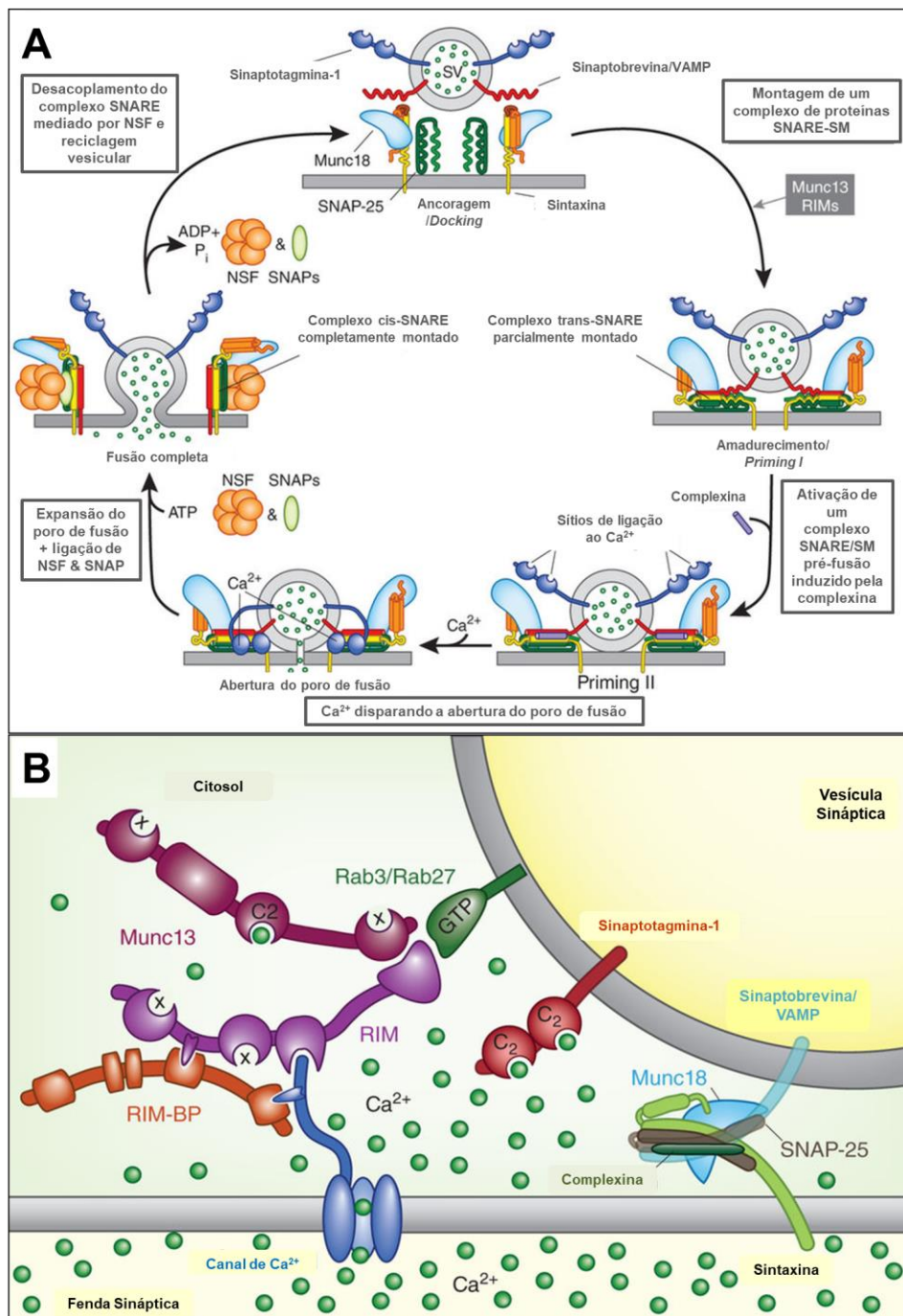


Figura 7: Ciclo de exocitose/endocitose e principais proteínas. A. O ciclo se inicia com a ancoragem (*docking*) das VS próximo à membrana no TN. Repare a conformação aberta das proteínas tanto vesicular quanto do TN. Logo após, as proteínas Munc13 e RIMs auxiliam na montagem de um complexo de proteínas SNARE/SM e estabilizam a ligação das VS com a membrana do TN. É importante ressaltar que durante a montagem das proteínas, as chaperonas (CSPs e sinucleínas) aumentam a formação do complexo. Na etapa (*amadurecimento/Priming I*), o complexo de proteínas SNARE está parcialmente montado e assume conformação trans. No *Priming II*, a proteína complexina acopla-se ao complexo SNARE/SM (pré-fusão), aumentando o *priming*. Logo após a despolarização do TN, a abertura dos VGCCs, promove a ligação dos íons Ca^{2+} nos sítios C2 da sinaptotagmina, mudando a sua conformação e se ligando ao complexo SNARE, induzindo a abertura de um poro de fusão. O poro de fusão aumenta de tamanho, promovendo fusão completa. Complexo

assume posição cis. Ao final do ciclo as proteínas NSF e SNAPs promovem a dissociação do complexo SNARE e um novo ciclo se inicia. **B.** A figura detalha a participação de outras proteínas (RIM, Proteína de ligação a RIM – RIMBP e Munc13) de múltiplos domínios que formam um complexo justo, que medeiam três funções essenciais nas zonas ativas (1): recrutamento de canais para Ca^{2+} , próximos a proteína sinaptotagmina, acoplando a despolarização do TN ao influxo localizado de Ca^{2+} ; (2): Ancoragem (*docking*) das VS no sítio de liberação e (3): *Priming* da maquinaria de fusão dependente de Munc13. Figura adaptada de: (SÜDHOF, 2013b).

A ACh é o neurotransmissor proveniente dos motoneurônios da medula espinal e consequentemente é liberado em todas as junções neuromusculares de vertebrados (KATZ, 1966). Esse neurotransmissor é sintetizado no citoplasma do terminal pré-sináptico de neurônios colinérgicos a partir da colina e acetil-coenzima A (Acetil-CoA) derivada do metabolismo mitocondrial, sendo que essa reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) (Ribeiro et al., 2006) (FIGURA 8).

Uma vez que a ACh é positivamente carregada, ela não se difunde de forma efetiva pelas membranas celulares, portanto se faz necessário um mecanismo de transporte para que essa molécula seja liberada para a fenda sináptica (PRADO et al., 2013). Dessa forma, após a síntese, a acetilcolina é armazenada dentro de VS através do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) (FIGURA 8), uma proteína de doze domínios transmembrana. O VACHT faz parte de uma superfamília de proteínas de transporte, que inclui os transportadores vesiculares de monoaminas VMAT 1 e 2, que possuem um alto grau de similaridade com os segmentos transmembrana do VACHT (PARSONS, 2000; VARDY et al., 2004; PRADO et al., 2013). A internalização das moléculas de ACh provenientes do citosol do TN para dentro das vesículas sinápticas se faz pela ação do VACHT, que utiliza um gradiente eletroquímico ($\Delta\mu_{H^+}$) gerado por uma bomba, a H^+ -ATPase (V- H^+ -ATPase), que troca dois prótons por uma molécula de ACh (NGUYEN; COX; PARSONS, 1998; revisado por PRADO et al., 2013) (FIGURA 8). Essas bombas assemelham-se de forma estrutural e funcional, às bombas que sintetizam ATP, localizadas na membrana mitocondrial interna e que regem a produção de energia (ATP sintase). As V- H^+ -ATPases utilizam da hidrólise do ATP para promover o transporte de H^+ para dentro das vesículas.

O gradiente eletroquímico ($\Delta\mu_{H^+}$) é composto por um gradiente químico de pH (ΔpH) e também por um potencial elétrico transmembrana ($\Delta\psi$), gerado pela movimentação de cargas positivas para dentro da vesícula, podendo ser descrito pela seguinte equação: $\Delta\mu_{H^+} = \Delta pH + \Delta\psi$. Assim, o transporte de todos os neurotransmissores clássicos para dentro de vesículas sinápticas depende de ambos os componentes (HNASKO E EDWARDS, 2012). Assim sendo, fica claro que mecanismos que alterem a atividade e o tráfego do VACHT em terminais pré-sinápticos podem facilmente modificar a liberação de acetilcolina (PRADO et al., 2002).

Experimentos realizados em camundongos deficientes para a ChAT mostraram uma diminuição significativa na transmissão colinérgica (Misgeld et al., 2002). Esses animais, que possuíam redução da atividade de acetilação da enzima, apresentavam alterações nos

potenciais de placa motora em miniatura (MEPPs) e evocados (EPPs) (BRANDON et al., 2003). Além disso, esses modelos animais apresentavam um aumento da arborização dos seus terminais nervosos e uma alteração na distribuição dos receptores para a ACh, que se encontram aumentados e mais espalhados ao longo da placa motora (BRANDON et al., 2003). Com relação ao músculo diafragma em si, esse modelo mostrou diminuição no diâmetro dos miotubos e aumento da contagem de núcleos centrais (MISGELD et al., 2002). DE CASTRO et al. (2009), utilizando um modelo animal em que o gene do VAcHT foi eliminado (VAcHTdel/del), encontraram alterações bastante semelhantes às observadas por BRANDON et al (2003). Dessa forma, esses dados em conjunto mostraram que tanto a ChAT quanto o VAcHT são muito importantes para a formação e estabelecimento das terminações nervosas, bem como interferem no desenvolvimento da célula muscular (MISGELD et al., 2002; BRANDON et al., 2003; DE CASTRO et al., 2009).

Recentemente, um trabalho do nosso grupo de pesquisa, coordenado pelo Prof. Marco Prado da University of Western Ontario demonstrou que um modelo de camundongo desenvolvido para estudos de optogenética (camundongos ChAT-ChR2-EYFP), apresentavam superexpressão do VAcHT. Apesar desses animais terem um melhor desempenho motor na esteira, eles apresentavam uma série de distúrbios cognitivos, principalmente na memória de trabalho e espacial (KOLISNYK *et al.*, 2013). Além disso, em 2016, num trabalho do qual fui co-autor, esses mesmos animais apresentavam MEPPs com amplitude aumentada, no entanto, as JNM do membro posterior, exibiam sinais degenerativos, como fragmentação dos AChRs e maior desnervação (SUGITA *et al.*, 2016). Fica claro, portanto, que é necessário níveis fisiológicos do VAcHT para que as funções neuromusculares sejam mantidas dentro da normalidade.

Após a exocitose de vesículas sinápticas contendo ACh e consequente ativação de receptores nicotínicos (AChRs), esse neurotransmissor é hidrolisado pela acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica, gerando colina e acetato. A colina é recaptada para o interior do terminal por meio de seu transportador de membrana de alta afinidade (CHT1) estando disponível para síntese de novas moléculas de ACh (revisado por Ribeiro et al., 2006) (FIGURA 8).

A ACh, quando liberada na fenda sináptica da JNM de mamíferos, levará à ativação da célula alvo pós-sináptica, no caso as fibras musculares esqueléticas, o que em última instância promoverá a sua contração. As fibras musculares esqueléticas compõem a via final

da UM, composta, como previamente descrita, pelos motoneurônios e seus axônios, juntamente com as JNM. No próximo tópico daremos mais detalhes sobre o MEE.

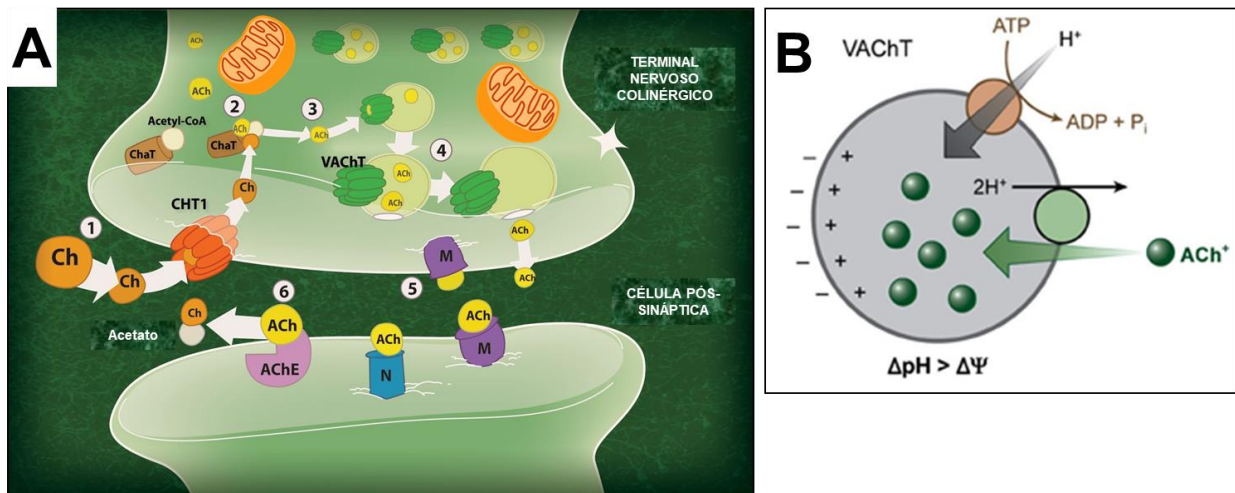


Figura 8: Esquema geral da neurotransmissão colinérgica e mecanismo de preenchimento das VS via VACHT. A. Na figura é possível distinguir o TN colinérgico (pré-sináptico), contendo as proteínas necessárias para síntese e armazenamento de ACh, bem como VS e mitocôndrias. Do outro lado do terminal, encontra-se a célula alvo pós-sináptica, que na JNM, é a fibra muscular. Na fenda sináptica é possível identificar a enzima que catalisa a hidrólise da ACh. (1) a colina presente na fenda sináptica é recaptada para o interior do TN por ação do CHT1. (2) uma vez no terminal, a colina juntamente com a Acetil-CoA (metabolismo mitocondrial) transformam-se em ACh pela ação da enzima ChAT. (3) uma vez sintetizada, a ACh deve ser internalizada nas VS através do VACHT. (4) A membrana do TN é despolarizada pela chegada de um potencial de ação gerado no corpo celular do motoneurônio, o que leva a abertura de VGCCs. O aumento dos níveis de Ca²⁺ no citosol, recruta as VS que são excitadas, liberando a ACh na fenda sináptica. (5) a ACh então liga-se a receptores tanto nicotínicos quanto muscarínicos. No caso da JNM, a ligação ocorre nos nAChRs, levando a despolarização da célula muscular, desencadeando a sua contração muscular esquelética. A liberação de ACh é regulada, através de um *feedback* negativo, onde a ACh liga-se a receptores muscarínicos pré-sinápticos (auto-receptores), sinalizando ao neurônio que a quantidade liberada de neurotransmissor é suficiente. (6) a ação da ACh é finalizada pela sua hidrólise promovida pela enzima AChE, que cliva a molécula, liberando acetato + colina, sendo esta última, recaptada para terminal pré-sináptica, permitindo o início de um novo ciclo. Adaptado de: (PRADO *et al.*, 2013) **B.** A figura é uma representação do mecanismo de preenchimento vesicular de ACh via VACHT. Uma vez que a ACh é carregada positivamente, a sua entrada na vesícula não é energeticamente favorável, de forma que a ação de um transportador é necessária. Dessa forma, o VACHT transporta uma molécula de ACh para dentro da VS, trocando dois íons H⁺. A VS apresenta uma próton-ATPase, que acidifica o interior da VS, criando um gradiente químico (ΔpH) e potencial elétrico transmembrana (Δψ), sendo que para o VACHT, o ΔpH é mais significativo (VAN LIEFFERINGE *et al.*, 2013).

1.1.3. O Músculo Estriado Esquelético (MEE)

O M.E.E é formado por feixes de células longas, cilíndricas, apresentando miofibrilas de contração voluntária, contendo múltiplos núcleos que se localizam próximos à membrana muscular, ou sarcolema (JUNQUEIRA & CANEIRO, 2008). Em cada músculo, 85% do peso úmido correspondem às fibras musculares, sendo que o restante do peso é constituído por tendões, outros tecidos conjuntivos e vasos sanguíneos (GOLLNICK et al., 1981). A maioria dos músculos estriados esqueléticos é presa aos ossos por meio de tendões que se localizam em ambas as extremidades e se estendem através de uma ou de várias juntas (KERNELL, 2006).

O MEE é formado no embrião a partir do mesoderma paraxial que se segmenta em somitos em ambos os lados do tubo neural e notocorda. A parte ventral do somito é denominada de esclerótomo, que contribuirá para a formação das cartilagens e dos ossos da coluna vertebral e costelas, enquanto que a parte dorsal do somito, classificado como dermomiótomo, segundo a própria nomenclatura, dará origem à derme de revestimento das costas e aos músculos esqueléticos do tronco e membros. Alguns músculos da cabeça derivam do mesoderma paraxial não segmentado e do mesoderma pré-cordal (BUCKINGHAM *et al.*, 2003). Durante o desenvolvimento, as fibras musculares são formadas pela fusão de progenitores derivados do mesoderma, denominados mioblastos. No período neonatal/juvenil, o número de fibras musculares permanece constante, no entanto, cada fibra muscular cresce em tamanho (hipertrofia) pela fusão de células satélites (CS), uma população de células-tronco derivadas do músculo (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013).

O músculo MEE adulto é estável sob condições normais, apresentando de forma esporádica, fusão de CS para compensar o desgaste diário. Entretanto, o MEE apresenta a marcante habilidade de regenerar após injúria. Assim, na resposta a um trauma, o MEE passa por um processo altamente orquestrado de degeneração e regeneração, envolvendo alterações nos níveis teciduais, celulares e moleculares, o que resulta no reestabelecimento da inervação e vascularização do aparato muscular contrátil. Esse processo regenerativo é fruto da interação dinâmica entre as CS e o ambiente que as envolve (nicho das CS) (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013).

As CS foram descritas e nomeadas por Alexander Mauro, em 1961. No curso de um estudo de microscopia eletrônica de transmissão da região periférica da fibra muscular esquelética do músculo *tibialis anticus* de rã, Mauro percebeu a presença de determinadas células, intimamente associadas à fibra muscular, que apresentavam uma estreita faixa de

citoplasma (poucas organelas), comparado ao núcleo extenso, o qual conferia o formato da célula. Além disso, essas células localizavam-se entre a lâmina basal da fibra muscular e o seu sarcolema, empurrando as miofibrilas da célula muscular para o lado oposto (MAURO, 1961). Nesse trabalho, o autor já sugeria a participação dessas células no processo regenerativo, uma vez que 48 horas após injúria, havia presença marcante de ‘‘células livres’’ que apareciam tanto circulares quanto fusiformes.

Atualmente já existem inúmeros marcadores de superfície celular das CS e fatores de transcrição que estão envolvidos no processo regenerativo. Como dito anteriormente, as CS permanecem quiescentes sob condições fisiológicas e expressam o fator de transcrição Pax-7 e Pax-3 em CS musculares. Pax-3 é de extrema importância no desenvolvimento embrionário do músculo, mas a sua expressão é reduzida antes do nascimento. De forma contrária, Pax-7 é dispensável no desenvolvimento, mas essencial para o funcionamento das CS após o nascimento (OUSTANINA; HAUSE; BRAUN, 2004; RENDL, 2014). De forma geral, a via de diferenciação miogênica, inclui a ativação das CS quiescentes, determinação da linhagem miogênica e proliferação, fusão para a formação de miotubos e finalmente, a maturação em fibras musculares (RENDL, 2014; YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013).

Após exercício físico, ou injúria muscular, as CS são ativadas, deixam a fase G₀ do ciclo celular. Em seguida, essas células entram em divisão celular, podendo ocorrer divisão simétrica ou assimétrica, dependendo da posição das células filhas em relação à fibra muscular (YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013). Após ativação e divisão celular, as CS darão origem às células progenitoras miogênica, denominada, mioblastos, uma população transiente de células de grande potencial proliferativo (RENDL, 2014). Nessa etapa, Pax-7 e Pax-3 ativam genes que promovem a proliferação e comprometimento com o desenvolvimento da linhagem miogênica (SEALE *et al.*, 2000), enquanto que suprimem outros genes que induzem a diferenciação miogênica final (RENDL, 2014; SOLEIMANI *et al.*, 2012). Na via molecular miogênica, abaixo dos fatores de transcrição Pax, os fatores de regulação miogênicos (MRFs) são responsáveis, tanto pela determinação miogênica das CS, quanto à regulação da diferenciação miogênica (RENDL, 2014).

Os MRFs pertencem a uma família de fatores de transcrição *helix-loop-helix*, que incluem, o fator miogênico 5 (Myf5), proteína determinante de mioblasto (MyoD), miogenina e fator de regulação músculo-específico (Mrf4, também conhecido por Myf6). A expressão de Myf5 e/ou MyoD é rapidamente aumentada após ativação das CS. Pax-7 e Pax-3 regulam e induzem a expressão de Myf5 e MyoD. Uma vez que a quantidade de células progenitoras

miogênicas é suficiente, os níveis de Pax-7 são reduzidos antes da diferenciação final. A miogenina, sendo um alvo direto de MyoD, será por este ativada, e juntamente com Mrf4, iniciará a diferenciação terminal, transição de mioblastos para miócitos alongados, fusão em miotubos e finalmente, maturação em fibras musculares multinucleadas, que agora passarão a expressar proteínas características da fibra madura, como as isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) (RENDL, 2014; YIN; PRICE; RUDNICKI, 2013) (FIGURA 9).

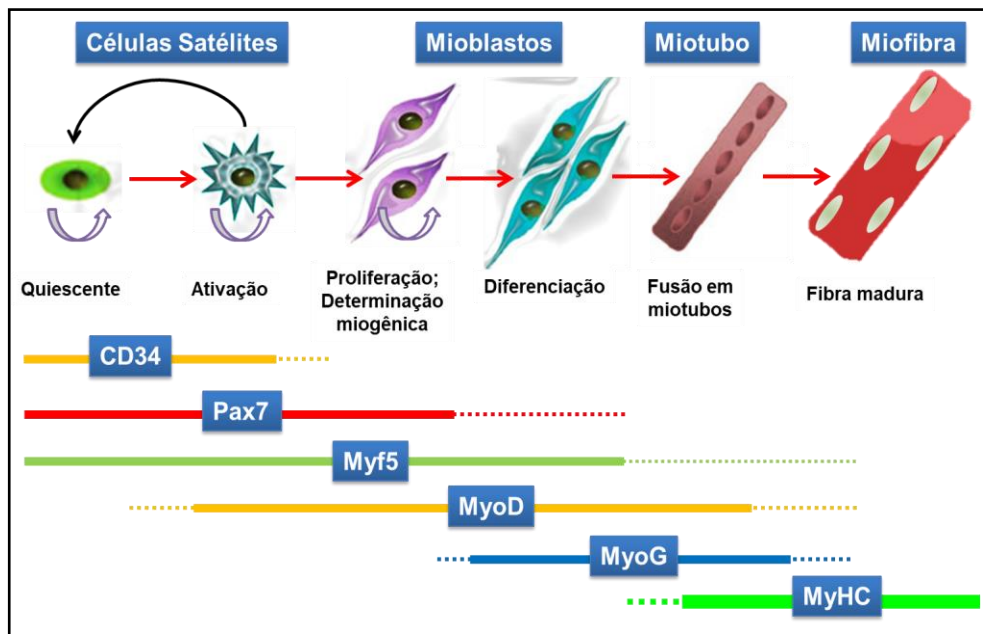


Figura 9: Representação esquemática da regeneração muscular. Após um dano muscular, as CS são ativadas, se dividindo para a produção de mioblastos. Os mioblastos sofrerão mitose, antes de se comprometerem com a diferenciação e fusão para formação de miotubos, os quais serão amadurecidos em fibras musculares. Os marcadores, CD34, Pax7 e Myf5 são expressos nas CS quiescentes. A ativação das CS ocorre pela rápida expressão de MyoD, enquanto que a miogenina (MyoG) marca a diferenciação. A expressão de genes estruturais musculares, como a MyHC (representado) e actina, marcam a última etapa da diferenciação, quando ocorre a estruturação sarcomérica. Adaptado de: (ZAMMIT; PARTRIDGE; YABLONKA-REUVENI, 2006)

O tamanho das fibras musculares é regulado por mecanismos moleculares que envolvem a interação entre múltiplas vias de sinalização. Sob condições fisiológicas, uma rede de sinais interconectados é ativada ou inibida para o controle e coordenação de sinais hipertróficos e atroficos, o que culmina com um delicado balanço entre a síntese de proteínas musculares e sua degradação (proteólise). A perda de massa muscular é denominada ‘atrofia’ e é um dos padrões diagnósticos para a caquexia que ocorre no câncer, doenças cardíacas, COPD (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), doenças renais e doenças

neuromusculares (EGERMAN; GLASS, 2014). A atrofia é definida como uma redução no tamanho de um tecido ou órgão devido ao encolhimento celular sendo que a redução no tamanho celular é causada pela perda de organelas, citoplasma e proteínas (BONALDO; SANDRI, 2013). As duas vias mais importantes do sistema celular proteolítico e que controlam o *turnover* de proteínas musculares são as da maquinaria ubiquitina-proteassomo e autofagia-lisossomo (BONALDO; SANDRI, 2013).

O sistema ubiquitina-proteassomo é formado por um conjunto de proteínas, a saber: enzimas ativadoras de ubiquitinas (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitinas (E2) e proteínas ubiquitinas ligase (E3) (BODINE; BAEHR, 2014). As enzimas E1 ativam as proteínas ubiquitinas após clivagem de ATP. Em seguida, a ubiquitina é movida a partir das enzimas E1 para a classe de enzimas E2. A reação final de ubiquitinação é catalisada pelas enzimas ligases E3. E3 se liga a E2 e a um substrato proteico (que será degradado), o que induz a transferência da ubiquitina das enzimas E2 para o substrato. Uma vez que o substrato é poliubiquitinado, a proteína marcada para degradação pelas ubiquitinas se liga ao proteassoma e enfim a proteína é degradada (BONALDO; SANDRI, 2013). Nesse sentido, foram identificadas no músculo esquelético duas E3 ubiquitina ligases, a saber: a MuRF1 (*Muscle RING finger 1*) e a MAFbx/Atrogin-1 (*muscle atrophy F-box*) (BODINE; BAEHR, 2014). De forma similar, Atrogin-1 é seletivamente expressa no músculo estriado (BODINE; BAEHR, 2014). MuRF1 e Atrogin-1 estão envolvidas com a ligação de substratos proteicos que serão ubiquitinados e subsequentemente degradados pelo proteassomo 26S. Dessa forma um fator indutor de atrofia aumenta a expressão de MuRF1 e Atrogin-1 nos sarcômeros, o que promove a degradação dos filamentos sarcoméricos (BODINE; BAEHR, 2014). A figura 10 traz um breve resumo do mecanismo de degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteassoma.

As miosinas são proteínas dos sarcômeros, sendo alvos do sistema de degradação proteica. A seguir, traremos mais detalhes sobre essas proteínas essenciais para a contração muscular e como elas conferem a especificidade de cada tipo muscular.

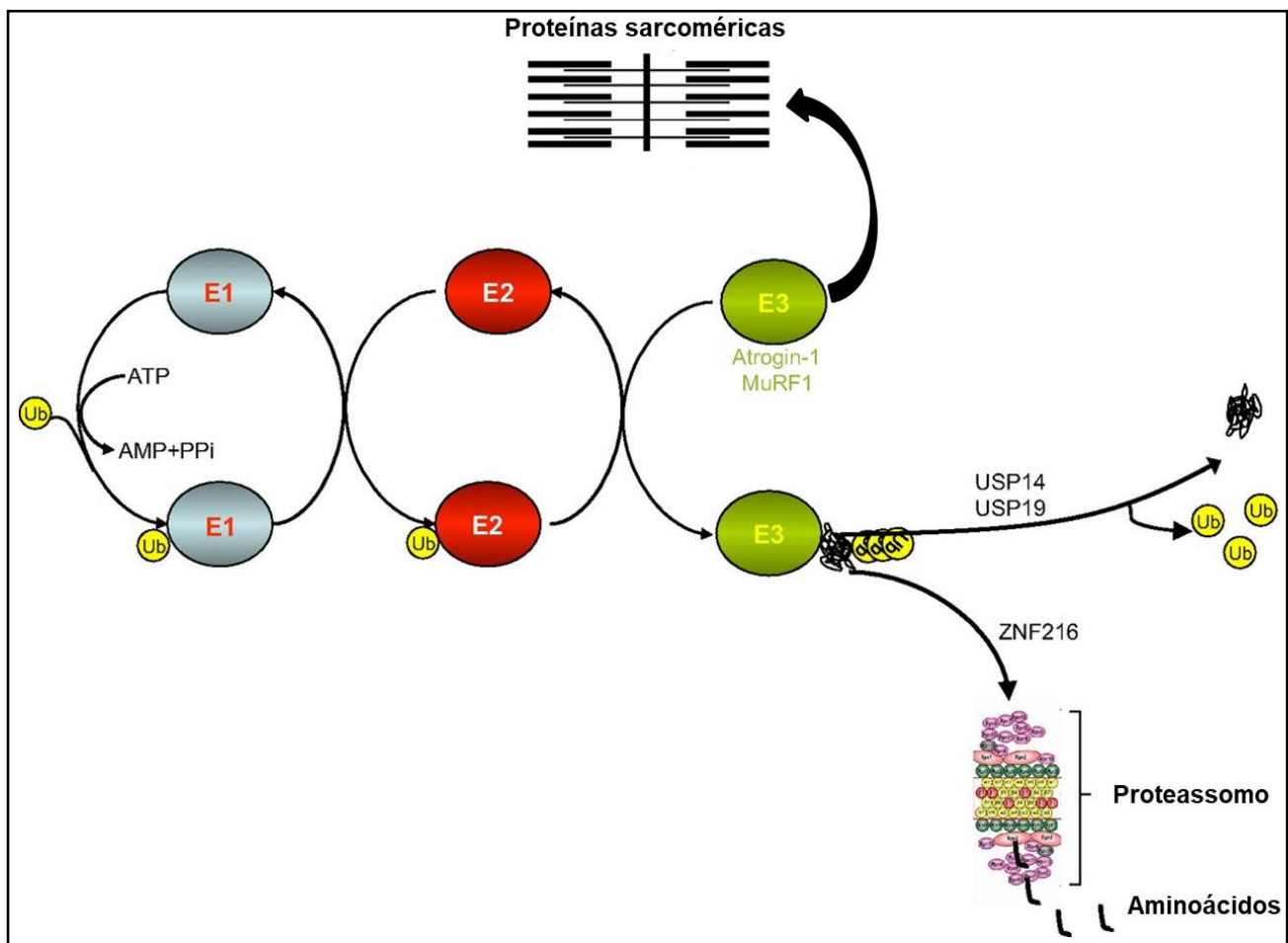


Figura 10: Representação da ativação do sistema ubiquitina-proteassoma e o papel das ubiquitinas ligases E3, Atrogin-1 e MuRF1 na atrofia muscular. As enzimas E1 ativam as proteínas ubiquitinas após clivagem do ATP. A ubiquitina é, em seguida, movida das enzimas E1 para E2. A reação de ubiquitinação é catalisada pelas enzimas E3. E3 se liga a E2 e ao substrato proteico, induzindo a transferência da ubiquitina de E2 para o substrato proteico a ser degradado. O substrato quando poliubiquitinado é ancorado ao proteassoma para degradação. As cadeias de poliubiquitinas podem ser removidas por proteases de processamento específicas de ubiquitinas (USPs). ZNF216 está envolvido no reconhecimento e entrega de proteínas ubiquitinadas ao proteassoma durante atrofia muscular. Figura adaptada de: (BONALDO; SANDRI, 2013).

As diferentes isoformas (1, 2A, 2X e 2B) da MyHC conferem à musculatura esquelética velocidades distintas de contração muscular, de modo que as fibras que expressam a isoforma do tipo 1 apresentam velocidade de contração lenta e são comumente classificadas como fibras vermelhas, pela alta densidade capilar. Já a expressão das outras isoformas (2A, 2X e 2B) confere ao músculo uma maior velocidade de contração, sendo essas fibras também chamadas de fibras brancas, pela baixa quantidade de vasos sanguíneos (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011b). A musculatura da panturrilha é composta por vários tipos musculares, no entanto, existe um músculo em especial que compõem o complexo do gastrocnêmio, que é o Sóleo. Esse músculo é constantemente ativo, tendo como função a manutenção postural (DI GIULIO *et al.*, 2009). Para tanto, esse tipo muscular apresenta uma grande percentual de fibras expressando isoformas de contração mais lenta, o que confere como já demonstrado anteriormente, uma maior resistência à fadiga muscular. De forma prática, maratonistas são esportistas que apresentam em sua musculatura grande predominância de fibras lentas. Contrariamente, velocistas precisam correr rapidamente, uma distância não tão longa, e em curto espaço de tempo (segundos). Nesse caso, alguns músculos da perna, como o Extensor Longo dos Dedos (EDL), precisam ser ativados, uma vez que apesar de entrarem em fadiga rapidamente, a força gerada na contração é superior, conferindo maior impulso e velocidade. Esses velocistas, por tanto, apresentam mais fibras musculares expressando isoformas de contração rápida.

As fibras musculares apresentam diferenças bioquímicas, metabólicas e moleculares, o que permite uma diferenciação entre os tipos de fibras (Schiaffino & Reggiani, 2011). A diversificação dos tipos de fibras musculares inicia-se durante o período embrionário do desenvolvimento, sendo independente de influências neuronais. No entanto, é somente após a formação e estabilização das sinapses musculares que a grande variabilidade dos tipos de fibras ocorre (Close, 1964). Como citado anteriormente, a unidade motora se torna muito importante para diferenciar as fibras musculares, e normalmente a grande maioria das fibras musculares de uma unidade motora é de um único tipo (Chakkalakal *et al.*, 2010). A Tabela 1 traz um resumo das principais características dos tipos de fibras musculares.

Tabela 1: Características dos diferentes tipos de fibras musculares. Adaptado de: (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011a)

	TIPO 1 (VERMELHA)	TIPO 2A	TIPO 2X	TIPO 2B (BRANCA)
Gene	<i>Myh7</i>	<i>Myh2</i>	<i>Myh1</i>	<i>Myh4</i>
Velocidade de contração	Lenta	Moderada/rápida	Rápida	Superior a IIX
Tamanho da JNM	Pequena	Média	Grande	Superior a IIX
Resistência à fadiga	Alta	Moderada/alta	Intermediária	Baixa
Respiração	Aeróbica	Aeróbica de longo prazo	Anaeróbica de curto prazo	Anaeróbica
Utilização em 24hrs	5,3 a 8,4 hrs	23-72 minutos	< 5 minutos	0,5-3 minutos
Força produzida	Baixa	Média	Alta	Superior a IIX
Densidade de mitocôndrias	Alta	Alta	Média	Baixa
Densidade de capilares	Alta	Intermediária	Baixa	Baixa
Capacidade oxidativa	Alto	Alto	Intermediário	Baixo
Capacidade glicolítica	Baixo	Alto	Alto	Alto
Conteúdo de mioglobina	Alto	Alto	Baixo	Baixo

As propriedades das fibras musculares podem ser determinadas de forma independente, no entanto, influências externas podem alterar o padrão sináptico durante a maturação das unidades motoras (CHAKKALAKAL *et al.*, 2010). Além disso, já foi demonstrado que a estimulação crônica externa de músculos lentos e rápidos com padrões de estímulos distintos ao original para o músculo, é capaz de alterar os tipos de fibras e as características de disparo da UM, demonstrando que um efeito retrógrado do músculo na sua UM é possível (REID, BRIAN *et al.*, 2003). Algumas características pré-sinápticas podem ser descritas em relação aos diferentes tipos de fibras: (1) Motoneurônios que inervam fibras de contração tipo 1 apresentam uma alta taxa de impulsos (300.000 a 500.000 em 24hrs) e baixa frequência de disparo (~20 Hz). Fibras tipo 2A e 2X recebem 90.000 a 250.000 impulsos a uma frequência média de disparo de 50 a 80 Hz. As fibras tipo 2B recebem 3.000 a 10.000 impulsos a uma frequência de 70 a 90 Hz. (2) As fibras musculares de contração lenta são inervadas por junções neuromusculares (JNM) de menor área, diferentemente das fibras de contração rápida que apresentam JNM de tamanho superior. Ademais, JNM de fibras tipo 2 possuem uma maior amplitude do potencial evocado quando comparado a fibras tipo 1, porém, essa amplitude decresce durante repetidas estimulações. O conteúdo quântico de ACh liberada com o tempo nas JNM de fibras tipo 1 (Sóleo) é inferior à quantidade liberada em fibras do tipo 2 (EDL), no entanto, as JNM inervando fibras lentas conseguem manter por mais tempo a liberação de ACh, o que correlaciona-se ao padrão de atividade *in vivo* desse músculo (REID *et al.*, 1999; SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). (FIGURA 11).

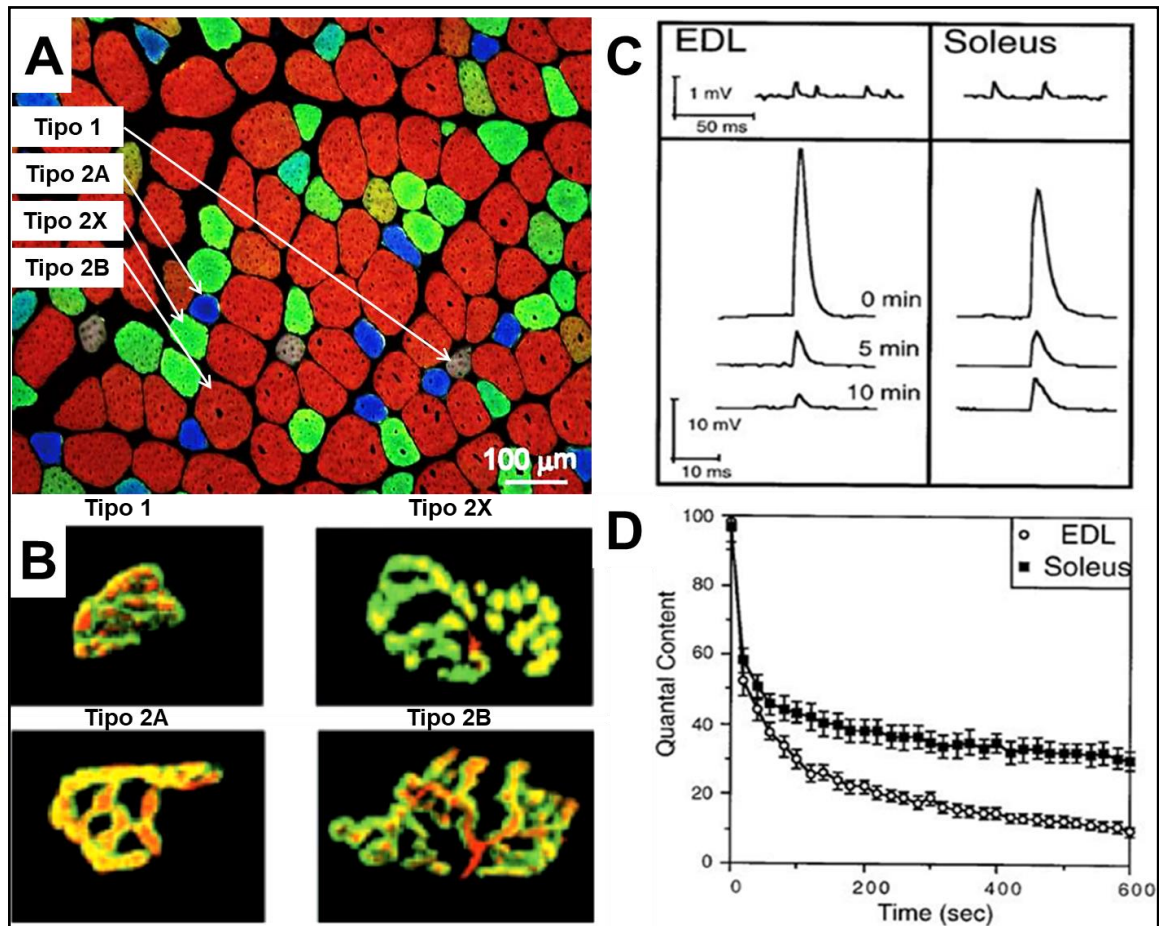


Figura 11: Características dos tipos de fibras musculares das unidades motoras. **A.** Corte transversal de MEE, marcado com anticorpos que se ligam a fibras musculares expressando diferentes isoformas da MyHC. Repare a diferença no tamanho das fibras musculares de acordo com tipo de isoforma que expressam, sendo que o aumento da área é crescente das fibras tipo 1 em direção a 2B. Adaptado de: (SAWANO *et al.*, 2016). **B.** O tamanho das JNM variam de acordo com o tipo de fibra muscular que inervam, da mesma forma, JNM que inervam fibras do tipo 1, apresentam área menor em comparação a 2A, 2X e 2B. Adaptado de: (MANTILLA; SIECK, 2003). **C.** No curso da liberação espontânea (MEPP), não há diferença entre músculos rápidos (EDL) e lentos (Sóleo) Painel superior. No entanto, quando os músculos são estimulados a uma frequência de 20Hz (EPP), percebe-se o significativo aumento da liberação de ACh no EDL, em comparação ao Sóleo. Entretanto, repare que após estímulos seguidos, o músculo rápido EDL passa a liberar menos ACh em comparação com o Sóleo. **D.** O conteúdo quântico de ACh (relação MEPP/EPP), cai rapidamente após estímulo, sendo que no EDL a queda é mais rápida e a liberação de ACh é também significativamente superior, quando comparado ao músculo Sóleo, que mantém adequada a liberação quantal durante a estimulação prolongada a 20Hz. Reproduzido de: (REID, B; SLATER; BEWICK, 1999).

Um corte longitudinal do MEE possibilita a visualização das estriações, que se arranjam em um padrão transversal de bandas claras, denominadas de bandas I e bandas escuras, as bandas A. Em um músculo em repouso, essas bandas ocorrem de forma periódica, a cada 2 a 3 μm , de modo que durante a contração muscular a banda I é tracionada para o meio do sarcômero (as unidades funcionais do MEE), estreitando-se, diferentemente da banda A que não muda de tamanho. A banda I é basicamente composta pelos filamentos finos de Actina, enquanto que a banda A compõe dos filamentos espessos de Miosina. Além disso, compondo cada miofibrila, além da actina e miosina, outras proteínas de fundamental importância para contração muscular são encontradas, como a tropomiosina e a família das troponinas (C, I e T) (HERZORG et al., 1992; WANG e KERNELL, 2000; KERNELL, 2006). Como citado, os sarcômeros são as unidades estruturais e funcionais do MEE, de modo que cada miofibrila é composta por grande quantidade de sarcômeros em série, os quais são estruturalmente formados pelo arranjo das proteínas contráteis, sendo actina e miosina as principais. Os sarcômeros são conectados a uma estrutura proteica, denominada discos Z, que conectam os filamentos finos de actina. Os filamentos espessos de miosina assumem uma posição central no sarcômero e ancoram-se aos filamentos de titina, que se conectam aos discos Z (HERZORG et al., 1992; WANG e KERNELL, 2000; KERNELL, 2006) (FIGURA 12).

Além desses componentes, a fibra muscular é composta por complexos de tríades, que são formadas por uma aposição juncional entre as membranas de uma ou mais cisternas do retículo sarcoplasmático (RS) com membranas dos túbulos transversos (TT). Os TT são contínuos ao sarcolema e possuem papel fundamental na contração muscular, uma vez que a despolarização do sarcolema é transmitida para a musculatura por meio dos TT que, como dito, estão acoplados ao RS. O RS quando estimulado pelo impulso elétrico muscular libera íons Ca^{2+} , que levarão à contração muscular (KELLY, 1969; WEBER, 1959).

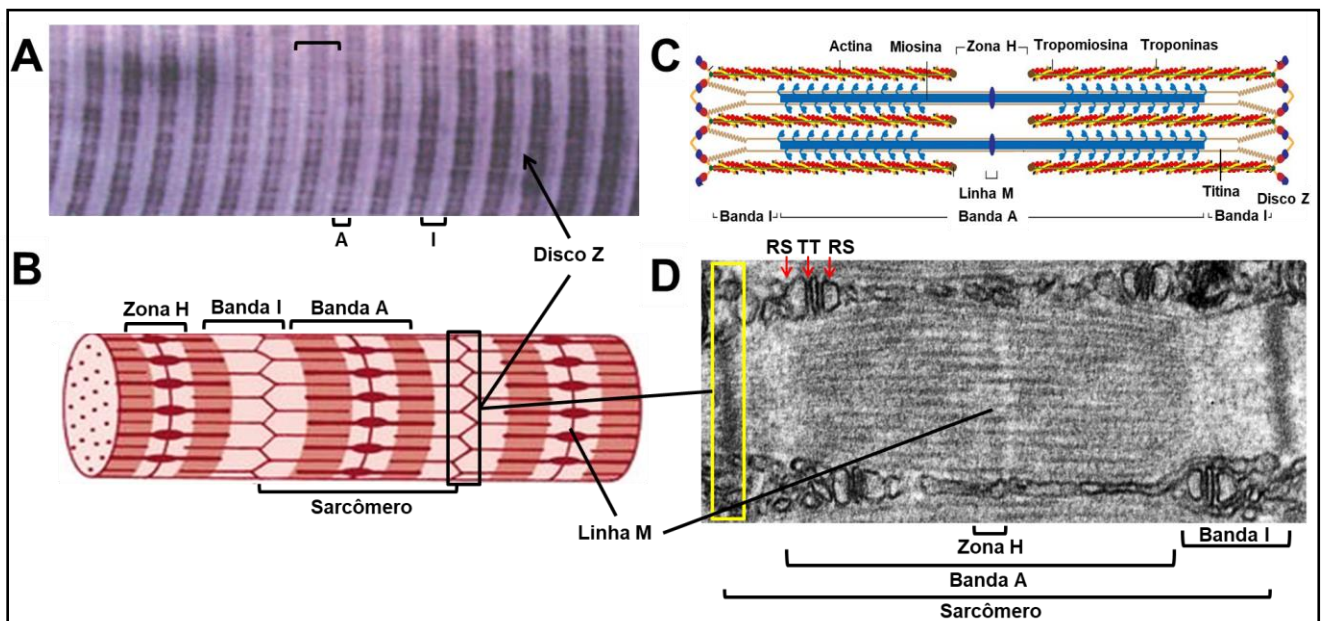


Figura 12: Estrutura dos sarcômeros **A.** Corte longitudinal de músculo esquelético visualizado em um microscópio de luz polarizada onde é possível visualizar a existência de bandas escuras (bandas A) e bandas claras (bandas I). A banda I é atravessada por uma fina linha, os discos Z. Dois discos Z delimitam um sarcômero (chave). Adaptado de: (“Anatomy Atlases: Atlas of Microscopic Anatomy: Section 1 - Cells”, [S.d.]) **B.** Representação de uma miofibrila formada por sarcômeros e o arranjo das proteínas contráteis e estruturais. Adaptado de: (HALL; GUYTON, 2011). **C.** Composição proteica do sarcômero, demonstrando o arranjo intracelular das diferentes proteínas na estruturação do mesmo. Adaptado de: (RAHIMOV; KUNKEL, 2013). **D.** Micrografia eletrônica de transmissão de um sarcômero do músculo EDL de camundongo, evidenciando as regiões demarcadas em B e C. Na imagem é possível observar tríades (setas vermelhas) entre dois sarcômeros. RS. Retículo sarcoplasmático. TT. Túbulos-T. Repare que o RS localiza-se lateralmente a um TT e se projetam na direção da banda A, local de sobreposição dos filamentos de actina+miosina. Imagem de: Magalhães-Gomes, 2017.

A contração muscular ocorre a partir da ativação do neurônio motor na medula espinal. O impulso elétrico gerado no pericário será direcionado pelos axônios motores até a JNM. Uma vez na JNM, o potencial de ação induzirá a exocitose de VS contendo ACh, que se ligará a seus nAChRs na membrana muscular pós-sináptica. Os nAChRs quando ativados, promoverão a despolarização do sarcolema, de modo que o impulso elétrico será direcionado para toda a musculatura pelos TT. O impulso passando pelos TT em justaposição ao RS induzirá a saída de íons Ca^{2+} do RS, aumentando a concentração do íon no sarcoplasma. Uma vez no sarcoplasma, os íons Ca^{2+} se ligam de maneira reversível às moléculas de troponina C, que se localizam nos filamentos de actina. A ligação do cálcio induz mudança conformacional na tropomiosina, que deixará livre os sítios ativos para a miosina. A presença do $\text{ADP} + \text{Pi}$ à cabeça da miosina, promoverá a interação da miosina + actina, formando uma ponte cruzada.

Logo após, a miosina libera ADP + Pi, promovendo o deslizamento do complexo actina/miosina para o centro do sarcômero, em direção a linha M. Uma vez que o potencial de ação muscular se mantém e os níveis de Ca²⁺ estejam constantes, o ciclo de contração muscular é mantido. Com o fim do potencial de ação, o Ca²⁺ sarcoplasmático será bombeado ativamente para o interior do RS por meio de uma bomba de RS-Ca²⁺. Sem novo estímulo, o ATP liga-se novamente à cabeça da miosina, assumindo uma configuração de baixa energia, desprendendo-se da actina. A tropomiosina retorna à configuração original. Em seguida, a molécula de ATP é hidrolisada pela enzima ATPase localizada na porção globular da miosina, transformando em ADP + Pi, o que retorna a miosina a uma configuração de alta energia, a espera de um novo potencial de ação e liberação de íons Ca²⁺ do RS (GREFTE et al., 2007; KERNELL, 2006).

O M.E.E é um tecido de grande plasticidade, de modo que as características fisiológicas, bioquímicas e moleculares podem ser alteradas frente a estímulos fisiológicos ou patológicos. Dessa forma, pode-se dizer que o fenótipo do M.E.E é resultante da interação entre as características genéticas e as influências do meio externo nas fibras musculares, sendo caracterizado pelo número de fibras musculares, a área de secção transversal (CSA), o número de sarcômeros em série e a distribuição dos diferentes tipos de fibras musculares (JASPERS et al., 2010). Em relação a essa plasticidade frente a estímulos patológicos, a tabela 2 torna-se interessante, uma vez que detalha algumas alterações encontradas em MEE nas diversas doenças e sua implicação nos tipos de fibras.

Tabela 2: Alterações musculares e seus efeitos em tipos específicos de fibras. Adaptado de: (TALBOT; MAVES, 2016)

DESORDEM	EFEITOS NOS TIPOS DE FIBRAS
Distrofia Muscular de Duchenne	Degeneração de todos os tipos. Fibras 2X são as primeiras a sofrer degeneração.
Distrofia Muscular fácio-escápulo-umeral	Redução da força máxima em fibras tipo 2; Aumento da proporção fibras tipo 1
Distrofia Muscular tipo 1	Atrofia tipo 1; Aumento de núcleo central fibras tipo 1; Redução força máxima em fibras tipo 1
Distrofia Muscular tipo 2	Atrofia e hipertrofia em fibras tipo 2; Aumento de núcleo central em fibras tipo 2
Desproporção Congênita de Fibras	Aumento na proporção e atrofia de fibras do tipo 1 em relação a fibras tipo 2
Miosinopatias	Mutação no gene <i>Myh7</i> causando atrofia de tipo 1; Mutação no gene <i>Myh2</i> perda de fibras tipo 2

Doença de Pompe	Em camundongos, atrofia de fibras tipo 2 e aumento da autofagia
Obesidade e Diabetes tipo 2	Aumento da razão fibras tipo 2 em relação a fibras tipo 1
Inatividade Muscular (desnervação, alterações na medula espinal etc)	Atrofia de fibras do tipo 1; Mudança de tipo 1 e 2A para 2X
Envelhecimento/sarcopenia	Perda e atrofia de fibras tipo 2
Disfunção cardíaca e COPD	Mudança de tipo 1 para 2 (músculos dos membros); Mudança de fibras tipo 2 para 1 (diafragma)

COPD: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

Algumas doenças neuromusculares como a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), Atrofia Muscular Espinhal (AME) e as Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs) são causadas por alterações genéticas em proteínas que compõem a UM e/ou por influências do meio.

A ELA e a AME são doenças específicas do neurônio motor, de modo que a ELA pode ocorrer por distúrbios genéticos, como é o caso da ELA familiar (5 a 10% dos casos), os outros 90% são por causas esporádicas. Em 20% dos casos de ELA familiar, foram identificadas mutações no gene da Superóxido Dismutase (SOD1), que leva ao acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo oxidativo, levando à morte neuronal. Os 80% restantes, são causados por outras mutações. A ELA também está relacionada a causas ambientais, como exposição a metais pesados e casos relacionados a infecções virais e doenças priônicas (ROWLAND; SHNEIDER, 2001). A AME também é uma doença do neurônio motor, de caráter autossômica recessiva, caracterizada por degeneração dos neurônios motores, atrofia muscular e fraqueza generalizada. Nessa condição, a causa é primariamente genética, uma vez que os pacientes que a desenvolvem apresentam deleção, conversão ou mutação no gene de sobrevivência 1 do neurônio motor (SMN1). É uma doença extremamente incapacitante, de modo que a grande maioria dos casos, a doença se manifesta na sua forma mais grave (LUNN; WANG, 2008a). No entanto, diferentemente da ELA, a AME é atualmente a única doença desse tipo que possui tratamento específico para a alteração genética, proporcionando um aumento na sobrevivência e melhora importante da função motora dos pacientes (FINKEL *et al.*, 2017).

De forma contrária, as SMCs não são causadas por alterações do neurônio motor, mas sim por distúrbios genéticos em proteínas que compõem as JNM, o que leva a diferentes graus de complexidade, dependendo da proteína alvo. Como o modelo animal desse estudo relaciona-se a essas síndromes, no próximo tópico, daremos mais detalhes sobre as SMCs.

1.2. As Síndromes Miastênicas Congênitas (SMCs)

As SMCs apresentam-se dentro de um grupo raro de desordens hereditárias em que a transmissão neuromuscular é comprometida na JNM (ENGEL et al., 2015). Esse comprometimento ocorre por defeitos genéticos em diferentes proteínas envolvidas na transmissão sináptica, desenvolvimento e manutenção das JNM, ou por anomalias na glicosilação proteica (ENGEL et al., 2015; VISSER et al., 2017). Até o presente momento foram identificadas cerca de 20 mutações em genes que codificam importantes proteínas da JNM e que estão relacionadas às SMCs (RODRÍGUEZ CRUZ; PALACE; BEESON, 2014). A maioria dos casos ocorrem por defeitos em proteínas pós-sinápticas (>50%), sendo que 5% dos casos ocorrem por defeitos pré-sinápticos. (ARAN et al., 2017; ENGEL et al., 2015; O'GRADY et al., 2016; RODRÍGUEZ CRUZ; PALACE; BEESON, 2014) (TABELA 3). Apesar das características clínicas e genéticas dessas síndromes serem bastante heterogêneas, todas as SMCs compartilham de um mesmo comprometimento na margem de segurança da transmissão neuromuscular, o que leva a diferentes graus de fraqueza muscular dependendo do mecanismo molecular resultante da alteração genética (VISSER et al., 2017).

As SMCs causadas por mutações em proteínas pré-sinápticas já foram diagnosticadas em alguns pacientes apresentando alterações em sete proteínas, a saber: ChAT (BYRING et al., 2002; OHNO et al., 2001), proteínas relacionadas ao complexo SNARE sendo elas, a SNAP25B (SHEN et al., 2014), a Sinaptotagmina-2 (HERRMANN et al., 2014) (ENGEL et al., 2015), Sinaptobrevina-1 (SHEN et al., 2017) e MUNC13-1 (ENGEL et al., 2016).

Em 2016 e 2017, foram identificados os primeiros casos de pacientes diagnosticados com SMCs por alterações em duas importante proteínas pré-sinápticas diretamente relacionadas à maquinaria de síntese de ACh, CHT1 (BAUCHÉ et al., 2016) e o VACHT (ARAN et al., 2017; O'GRADY et al., 2016). Ambas as proteínas, juntamente com a ChAT são cruciais para a neurotransmissão colinérgica.

Defeitos no VACHT geralmente levam a quadros mais graves, uma vez que esse transportador é de baixa velocidade, o que a torna uma proteína limitante para a

neurotransmissão colinérgica (VAROQUI; ERICKSON, 1996). Além disso, o comprometimento da atividade do VAcHT afeta tanto os receptores nicotínicos (altamente expressos nas JNMs de mamíferos), quanto muscarínicos (alta concentração no músculo cardíaco), exacerbando as manifestações clínicas (O'GRADY et al., 2016). Dessa forma, a identificação desses primeiros pacientes com defeitos genéticos no gene do VAcHT pode auxiliar no diagnóstico de pacientes com SMCs sem causa genética conhecida.

Com o intuito de melhor compreender o papel da acetilcolina tanto no plano do SNC quanto no SNP, o grupo de pesquisa do nosso colaborador nesse projeto, Prof. Marco Prado, foi pioneiro na geração de linhagens de camundongos que expressam apenas 30% do VAcHT ou que eram *knockout* para essa proteína (camundongos VAcHT KD^{HOM} e VAcHT KO, respectivamente). Esses camundongos VAcHT KD^{HOM} são miastênicos, e apresentam alterações cognitivas, caracterizando-os dessa forma, como um modelo animal para estudo de uma SMC pré-sináptica por defeito no VAcHT (PRADO et al., 2006).

A avaliação dos camundongos VAcHT KO demonstrou o papel crucial dessa proteína para sobrevivência, uma vez que esses animais vinham a óbito logo após o nascimento devido à falência respiratória. Identificaram-se ainda importantes alterações nas placas motoras e músculo esquelético desses animais (DE CASTRO et al., 2009).

A relevância clínica desses achados, tanto para os animais VAcHT KD^{HOM} quanto para os VAcHT KO, ficou demonstrada pela inédita identificação de pacientes diagnosticados com SMC causada por variações bialélicas do gene SLC18A3, que codifica a proteína VAcHT (O'GRADY et al., 2016) levando a uma perda de função dessa proteína (ARAN et al., 2017) (SCHWARTZ et al., 2018).

Uma vez que alterações em componentes pré-sinápticos da JNM já foram identificadas por nosso grupo de pesquisa em relação aos animais VAcHT KD^{HOM} (LIMA et al., 2010; PRADO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2013), torna-se importante avaliar possíveis comprometimentos no componente pós-sináptico, mais especificamente, no MEE, o que, até o momento, não havia sido feito. Dessa forma, utilizando modelos animais com disfunção colinérgica, essa tese tem como objetivo contribuir para o esclarecimento das possíveis alterações musculares decorrentes do aumento ou diminuição da expressão do VAcHT.

Tabela 3: Genes relacionados às principais SMC, função e comprometimento. Adaptada de: (MCMACKEN *et al.*, 2017b)

GENE/PROTEÍNA	FUNÇÃO/COMPROMETIMENTO
Genes que interferem com a síntese e liberação de ACh	
CHAT	A mutação impacta a síntese de ACh.
SLC5A7 (CHT1)	A mutação impacta a liberação de ACh.
SLC18A3 (VAcHT)	A mutação impacta o preenchimento vesicular e liberação de ACh.
MYO9A (Miosina 9A)	Proteína envolvida com a ramificação neuronal e orientação axonal.
SYT2 (Sinaptotagmina2)	A mutação impacta a exocitose vesicular induzida por Ca ²⁺
SNAP25B	A mutação impacta a formação do complexo SNARE e fusão de VS
MUNC13-1	A mutação impacta a ancoragem e amadurecimento das VS
VAMP1 (Sinaptobrevina)	A mutação impacta a formação do complexo SNARE e fusão de VS
Genes que alteram a comunicação entre nervo/músculo na fenda sináptica	
COLQ (Cadeia semelhante a colágeno)	A mutação impacta a ancoragem da AChE à lâmina basal, resultando em sua deficiência.
LAMB2 (Laminina β2)	A mutação está relacionada ao crescimento dos terminais nervosos para além da placa motora.
AGRN (Agrina)	A mutação impacta a distribuição dos AChRs na membrana pós-sináptica.
COL13A1 (Cadeia α do colágeno tipo XIII)	A mutação impacta a maturação da JNM.
Genes que interferem com os nAChRs e a transmissão dos potenciais de ação	
CHRNE (AChR)	A mutação impacta a subunidade ε do pentâmero do AChR.
CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNG (AChR)	A mutação impacta as subunidades α, β e γ do AChR.
RAPSN (Rapsina)	A mutação impacta a distribuição dos AChRs.
Síndrome do fechamento rápido (CHRNA1, CHRNE)	A mutação causa um fechamento rápido inapropriado dos AChRs após ligação da ACh
Síndrome do fechamento lento (CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE)	A mutação leva a abertura prolongada dos AChRs após ligação da ACh.
SCN4A (Canais de Na²⁺ Na_v 1.4)	A mutação impacta a geração do potencial de ação muscular.
Genes que interferem com proteínas centrais ao desenvolvimento pós-sináptico	
DOK7	A mutação impacta a maturação normal da membrana pós-sináptica
MUSK (Proteína Quinase Músculo-Específica)	A mutação impacta o desenvolvimento da JNM (regulação do agrupamento dos AChRs e especialização pós-sináptica).
LRP4 (Proteína receptora de LDL do tipo 4)	A mutação impacta o desenvolvimento da JNM (proteína que se liga a agrina).
PLEC1 (Plectina1)	A mutação impacta a transmissão neuromuscular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar possíveis alterações neuromusculares em linhagens de camundongos com disfunção colinérgica em diferentes idades.

2.2. Objetivos Específicos

1) Caracterizar os motoneurônios do segmento lombar da medula espinal de camundongos WT, e ChAT–ChR2–EYFP que apresentam disfunção colinérgica;

2) Avaliar aspectos funcionais das JNMs (reciclagem de vesículas sinápticas) e ultraestruturais das terminações nervosas do músculo diafragma, em camundongos WT e ChAT–ChR2–EYFP.

3) Avaliar a morfologia, padrão de expressão das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) e a ultraestrutura das fibras musculares do Sóleo (SOL) e Extensor Longo dos Dedos (EDL) em camundongos WT, VAcHt KD^{HOM} e ChAT–ChR2–EYFP.

4) Avaliar possíveis alterações em genes específicos da musculatura estriada esquelética e genes mitocondriais em camundongos WT, VAcHt KD^{HOM}.

5) Avaliar a função neuromuscular de camundongos WT, VAcHt KD^{HOM} e ChAT–ChR2–EYFP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População e amostra

A população foi constituída de camundongos machos, adultos (3 a 6 meses) C57BL/6J selvagens (WT) e camundongos com alteração na expressão do VChT (KD^{HOM}), gerados pela equipe do Professor Marco Antônio Prado utilizando técnicas de recombinação homóloga baseadas no sistema Cre-LoxP (PRADO *et al.*, 2006; DE CASTRO *et al.*, 2009). O desenvolvimento dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP [B6.Cg-Tg(Chat-COP4*H134R/EYFP)6Gfng/J; The Jackson Laboratory] está descrito em Zhao et al (2011). Os camundongos controles derivam de ninhadas negativas para o constructo ChAT-ChR2-EYFP. Foram utilizados nesse estudo apenas animais machos, com idades de 3 e 18 meses. Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos da linhagem C57BL/6J. Os animais foram acondicionados em caixas microisoladoras (Alesco®) em grupos de três a cinco camundongos por caixa em um ambiente com controle de temperatura, ciclo claro-escuro e água e comida disponibilizado *ad libitum*. CEUA: 40/2009 (animais VChT KD e 76/2015 (ChAT-ChR2-EYFP). Os camundongos foram obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG, coordenado pela Profa. Silvia Guatimosim. O número de animais utilizados para cada genótipo (amostra), está descrito nas legendas de cada figura. Os animais foram genotipados através de PCR e eletroforese em gel de agarose. Os seguintes *primers* foram utilizados para seleção das regiões gênicas de interesse para os animais VChT KD^{HOM} (P1 5' TCA TAG CCC CAA GTG GAG GGA GA 3'; P2 5' GGA ACT TCC TGA CTA GGG GAG GAG 3' e P3 5'GGT TCA TAT CCC CGA GCT CAG GAG 3') e para os animais ChAT-ChR2-EYFP a seguinte combinação de *primers*: Rosa F: 5'-AAGTTCATCTGCACCACCG-3'; Rosa R: 5'-TCCTTGAAGAAGATGGTGCG-3'; CTinmercremer1: 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'; CTinmercremer2: 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3' (FIGURA 15).

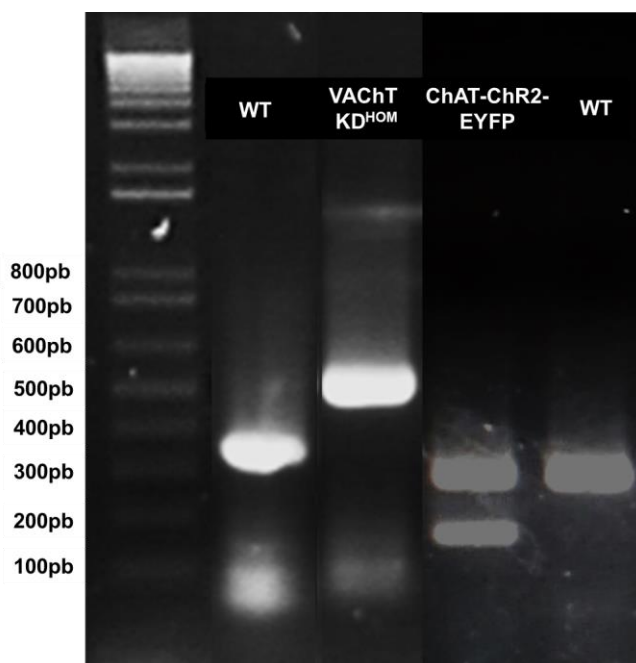


Figura 13: Imagem representativa do gel de agarose mostrando os genótipos utilizados neste trabalho. Os *primers* P1 e P3 amplificam as regiões de 336pb, que identificam os WTs. Os *primers* P1 e P2 amplificam a região de interesse que apresenta 495pb e seleciona os animais VAcHT KD^{HOM}. Os *primers* Rosa identificam os animais ChAT-ChR2-EYFP, amplificando as regiões com ~200pb. Os animais WT são aqueles onde a combinação dos *primers* CT 1 e 2 amplificam as regiões com ~300pb. Os *primers* CTs funcionam como o controle interno positivo, de modo que todas as reações devem apresentar a banda em 300pb.

3.2. Experimentos realizados

3.3. Avaliação dos neurônios do segmento lombar da medula espinal (L1 a L5) dos animais ChAT-ChR2-EYFP

3.3.1. Histologia de retina

Os camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP foram sacrificados com dose letal de isoflurano inalatório e em seguida foi realizado o deslocamento cervical. Imediatamente após o sacrifício, foi realizada uma incisão púbico-xifoide. Em seguida, o peritônio foi aberto, e em seguida, os órgãos da cavidade abdominal expostos e deslocados para baixo, permitindo a visualização da coluna vertebral. O segmento lombar da medula espinal foi coletado com o auxílio de um bisturi, onde o mesmo foi posicionado transversalmente à coluna vertebral,

tendo como ponto inicial a última costela do tórax. Deslocando-se o bisturi 2cm abaixo, foi realizado um novo corte na mesma direção.

O conjunto coluna vertebral/medula espinal foi imediatamente imerso em solução fixadora de glutaraldeído 4% preparada em solução tampão fosfato a 0,2M, por 24 horas a 4°C. No dia seguinte, a medula foi extraída do canal medular e nova fixação de 24 horas foi realizada. Após fixação, a medula foi desidratada em série crescente de álcool etílico (álcool 70%, 80%, 95% e mais um banho em 95%, 30 minutos cada). Após a desidratação, a medula foi imersa em solução 1:1 de álcool 95% e resina glicol metacrilato (Leica Histo-resin) por 24 horas a 5°C. Em seguida, as amostras foram infiltradas em resina pura (Leica Histo-resin) para posterior inclusão. A inclusão foi feita utilizando-se a resina pura adicionando-se a solução polimerizante na proporção: 15mL de resina glicolmetacrilato para 1 mL da solução polimerizante. A medula foi orientada nos moldes para permitir a secção transversal dos mesmos e em seguida embebidos na solução de inclusão. Para completa polimerização, os blocos permaneceram por, no mínimo, 24 horas em temperatura ambiente ou em estufa a 42°C. Após inclusão, os blocos contendo as medulas foram montados em suportes para micrótomo e cortados utilizando-se navalhas de vidro (Leica). Cortes transversais das medulas com 5 µm foram obtidos de forma semi-seriada, utilizando um micrótomo (Leica Reichert-Jung®) localizado no laboratório Multiusuário do PPG Biologia Celular, ICB, UFMG. Os cortes foram distendidos em água destilada, na temperatura ambiente, e logo em seguida transferidos para lâminas de vidro. As lâminas contendo pelo menos 5 secções eram colocadas em chapa quente a 70°C por 15 minutos para secagem e adesão e distensão máxima dos cortes. Após essa etapa, os cortes foram corados com solução de Azul de toluidina-O (EMS) em água destilada 1:10 por 15 minutos. Os cortes foram então imersos 5x em álcool 95% para obtenção da intensidade de coloração desejada. Em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando meio de montagem Entellan Mounting Medium (Merck®).

Obtenção e análises de imagens

Os 5 cortes foram fotomicrografados em microscópio com objetiva de 63x (Leica DM2500®) acoplado a uma câmera de CCD Leica DFC 345FX. Tendo como base o canal endimário, foram adquiridas imagens dos dois cornos ventrais da medula espinal. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image J software (NIH), onde foi avaliado o diâmetro de ferret e contado o número de neurônios. A separação entre neurônios α e β - γ foi realizada de acordo com critério de tamanho, onde os neurônios que apresentam diâmetro

$\geq 25\mu\text{m}$, são contados como neurônios motores α e os que apresentavam diâmetro $< 20\mu\text{m}$ foram considerados do tipo β - γ (Gadamski et al., 2006 e Tomlinson, Irving, Rebeiz, 1973). Os dados analisados foram graficamente representados e estatisticamente analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

3.4. Imunofluorescência para ChAT e Osteopontina (OPN) dos animais ChAT-ChR2-EYFP

Para diferenciar especificamente os neurônios motores α e γ - β dos interneurônios, nós utilizamos a marcação com anticorpos anti-ChAT (identifica neurônios motores α e γ - β) e OPN (identifica especificamente neurônios motores do tipo α) (MISAWA *et al.*, 2012). Para tanto, o mesmo procedimento de coleta descrito no item 3.3.1, foi realizado, com a diferença que a medula espinal foi imediatamente fixada em solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) 4% em solução salina tamponada 1x (PBS1X). Após a fixação, a medula foi imersa em solução criopreservante de sacarose (Sigma-Aldrich) 30% em PBS1X por pelos menos 24hrs a 4oC. Em seguida, o excesso de sacarose foi sugado em papel filtro e a medula posicionada em moldes plásticos (Sakura), imersas em solução de congelamento OCT-TissueTek (Sakura) e imediatamente congeladas em isopentano (Sigma-Aldrich) resfriado em nitrogênio líquido. Após congelamento, os blocos foram armazenados em *freezer* -80°C. Os blocos foram cortados em um criostato (Leica CM3050S), localizado no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI), ICB, UFMG. Cortes sequenciais de 30 μm coletados em lâminas de vidro, previamente preparadas com solução de gelatina de pele suína (Sigma-Aldrich) e sulfato de cromo (III) e potássio. Para cada animal foram coletados e analisados 3 cortes.

As lâminas contendo os cortes foram demarcadas utilizando-se canetas hidrofóbicas (Sigma-Aldrich). O bloqueio de sítios inespecíficos de ligação dos anticorpos foi realizado com a incubação dos cortes em solução 3%BSA, 5% Soro de Burro e 0,1% TX100 em PBS1X, por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos goat anti-ChAT 1:100 (AB144P, Millipore) e goat anti-Osteopontin 1:100 (AF808; R&D Systems), diluídos na mesma solução de bloqueio acima, *overnight* a 4oC. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3X com PBS1X (5' cada) e posteriormente incubadas com anticorpo secundário Alexa donkey anti-goat IgG 488 1:1000 (ThermoFisher Scientific), diluído no mesmo bloqueio (1 hora à TA). Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas 3X com PBS1X (5' cada), incubadas com DAPI 1:1000 (ThermoFisher Scientific) antes da

última lavagem e montadas com lamínulas Gold Seal #1½ (.16-.19 mm) e meio de montagem anti-fade ProlongGold (ThermoFisher Scientific).

Obtenção e análises de imagens

Em seguida, as lâminas foram levadas ao microscópio confocal LSM 880 Airy-Scan (Zeiss), localizado no CAPI, ICB, UFMG. Os motoneurônios localizados na lâmina IX de Rexed foram selecionados e imagens em série-z, com intervalos de 2,0µm entre as fatias ópticas foram coletadas. Para obtenção das imagens foi utilizado objetiva EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27. Para excitação do anticorpo secundário conjugado à sonda Alexa 488 e do DAPI, foi utilizado um laser de Argônio Ar multilinha (458, 488 e 514 nm) e para a seleção do espectro de fluorescência, foram utilizados filtros de emissão *band-pass* 495 a 630nm para seleção do espectro do 488 e um filtro 410-495 para seleção do espectro do DAPI. Os ganhos tanto do 488 quanto do DAPI foram selecionados de modo que a melhor imagem fosse obtida. Não foram realizadas análises de intensidade de fluorescência.

Após, as imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image J (NIH) onde nós analisamos o diâmetro de ferret e número das células marcadas com os anticorpos. Os dados analisados foram graficamente representados e estatisticamente analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

3.5. Avaliação por imunofluorescência das JNM do músculo EDL dos animais ChAT-ChR2-EYFP

Para esses experimentos, foram utilizados os camundongos ChAT-ChR2-EYFP (B6.Cg-Tg(Chat-COP4*H134R/EYFP,Slc18a3)6Gfng/J), ChAT-IRES-Cre (B6;129S6-Chat<tm1(cre)Lowl>/J) e tdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J). Para facilitar as análises das JNM do EDL provenientes de neurônios motores foram gerados camundongos ChAT-ChR2-EYFP expressando a proteína tdTomato especificamente em neurônios colinérgicos. Isso foi possível pelo cruzamento dos animais ChAT-ChR2-EYFP com os camundongos ChAT-IRES-Cre e tdTomato.

Os camundongos WT (tdTomato) e ChAT-ChR2-EYFP (tdTomato), foram anestesiados com isoflurano e realizada perfusão cardíaca, primeiramente com PBS1X para drenagem no excesso de sangue e logo depois com PFA 4% em PBS1X. Após perfusão, o músculo Extensor Longo dos Dedos (EDL) foi coletado e bloqueado em solução 3% BSA, 5% Soro de cabra, 1%TX100 em PBS, por 1 hora a TA. Em seguida, os músculos foram incubados com a neurotoxina derivada da serpente *Bungarus multicinctus*, α -bungarotoxina conjugada a sonda Alexa 555, diluída 1:1000 (ThermoFisher Scientific) na solução de

bloqueio, por 2 horas a TA. Em seguida, os músculos foram lavados 3X com PBS-T (0,1% TX100) e montados em lâmina/lamínula com solução Vectashield (Vector Labs) para posterior aquisição de imagens.

Obtenção e análises de imagens

As lâminas contendo os músculos foram levadas para o microscópio confocal motorizado LSM 700 (Zeiss), localizado na Virginia Tech Carilion Research Institute, onde imagens em série-z de alta resolução foram coletadas de toda a extensão da placa motora (*image stitching*), utilizando-se objetiva Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Para excitação do constructo tdTomato nos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP foi utilizado um laser de Argônio e a α -bungarotoxina Alexa 555 (evidenciar os aglomerados de AChRs) foi excitada utilizando um laser HeNe (555 nm). Para a seleção do espectro de fluorescência, foram utilizados filtros de emissão SP 555 para seleção do espectro do 488 e um filtro LP 640 para seleção do espectro da α -bungarotoxina Alexa 555. Após a aquisição, foram criadas imagens em alta intensidade de projeção pelo ZEN software. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa Image J (NIH) onde nós analisamos a área dos componentes pré e pós-sinápticos. Os dados analisados foram graficamente representados e estatisticamente analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.

3.6. Avaliação da endocitose e exocitose de vesículas sinápticas no músculo Diafragma dos animais ChAT-ChR2-EYFP

Os animais WT e ChAT-ChR2-EYFP nas idades de 3 e 18 meses, foram inicialmente anestesiados com isoflurano e em seguida, procedeu-se o sacrifício por deslocamento cervical. O músculo diafragma associado ao nervo frênico foi dissecado dos camundongos, seccionado em dois hemidiafragmas e os conjuntos músculos-nervos foram montados em placas cobertas por gel de silicone Sylgard® e fixados com alfinetes entomológicos. As preparações foram imersas em solução Ringer contendo 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4, e aerada com uma mistura de 5% CO₂/ 95% O₂. As preparações neuromusculares foram marcadas com a sonda vital FM 1-43 (4 μ M), em solução Ringer contendo alta concentração de potássio (60 mM KCl), durante 10 minutos, para marcar o aglomerado de vesículas sinápticas sujeitas à reciclagem. Após a estimulação, a preparação foi mantida em repouso por 10 minutos para garantir a captação máxima de FM1-43 durante a endocitose compensatória. O excesso de FM1-43 aderido à membrana do terminal sináptico e à membrana da célula muscular foi

removido durante um período de lavagem da preparação em Ringer sem o marcador por 20 minutos. Após a lavagem, as vesículas endocitadas foram evidenciadas através de uma segunda etapa de estimulação (Betz & Bewick, 1992). As preparações foram incubadas na presença de d-tubocurarina (8 μ M) para evitar contrações musculares durante a estimulação à desmarcação ou a aquisição de imagens. Para cada animal nós utilizamos apenas uma terminação pré-sináptica para o acompanhamento do processo de desmarcação.

Obtenção e análise das imagens

As imagens dos terminais nervosos marcados com FM1-43 foram obtidas com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica DM2500®) acoplado a uma câmera de CCD Leica DFC 345FX, utilizando-se objetivas de imersão em água (63x com abertura numérica de 0,95). As imagens coletadas pela câmera foram processadas e visualizadas em microcomputador utilizando-se o programa *Leica Application Suite software* (LAS) para o acompanhamento das etapas de marcação e desmarcação das junções neuromusculares. A luz utilizada para iluminar a preparação provinha de uma lâmpada de mercúrio e passava por filtros de 505/530 nm para seleção do espectro de fluorescência, adequado à excitação do marcador FM1-43. Todas as variáveis de ajuste das imagens como, por exemplo, tempo de exposição e ganho eram mantidas constantes para imagens obtidas em um mesmo experimento. Para determinar a taxa de desmarcação foram analisados 5 *spots* fluorescentes em cada terminação nervosa em cada intervalo de tempo.

3.7. Avaliação específica da endocitose pela marcação com FM1-43 fx e α -bungarotoxina no músculo Diafragma dos animais ChAT-ChR2-EYFP

O músculo diafragma foi dissecado e seccionado em dois hemidiafragmas sendo que os conjuntos músculo-nervos resultantes foram montados em placas contendo o fundo coberto por gel de silicone Sylgard® e fixados com alfinetes entomológicos e banhados em solução Ringer contendo 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4, e aerada com uma mistura de 5% CO₂/95% O₂. As preparações foram então marcadas com α -bungarotoxina – Alexa Fluor 555 para visualização de aglomerados de receptores para acetilcolina na membrana pós-sináptica e, também, com o marcador fluorescente FM1-43 fx (análogo fixável do FM1-43) na concentração de 8 μ M, para marcar vesículas sinápticas em reciclagem durante estimulação, com solução Ringer contendo alta concentração de potássio (60 mM KCl), por 10 minutos (Betz et al., 1992). Após a estimulação, a preparação foi mantida em repouso por 10 minutos

na presença de FM1-43 fx para garantir a captação máxima da sonda fluorescente durante a endocitose compensatória. O excesso de FM1-43 fx aderido à membrana do terminal sináptico e à membrana da célula muscular foi removido durante um período de lavagem da preparação em Ringer contendo Advasep-7 (1mM) e isento de marcador por no mínimo 15 minutos. As preparações foram fixadas em PFA a 4% no gelo por no mínimo 40 minutos. Após a fixação os músculos foram lavados com glicina em solução salina tamponada (PBS1X- 0,1 M) para redução do sinal fluorescente do fixador. Finalmente, os hemidiafragmas de WT e ChAT-ChR2-EYFP foram montados em lâmina de vidro usando o meio de montagem ProLong® Gold (Thermo-Scientific).

Obtenção e análise das imagens

As imagens de JNMs marcadas com FM1-43 fx e α -bungarotoxina foram adquiridas através de um microscópio confocal de escaneamento a laser (Zeiss LSM 880), localizado no CAPI, ICB-UFMG. Utilizou-se a objetiva de imersão em óleo de 40x (abertura numérica 1.30) e 63x (abertura numérica 1.4). A luz de excitação partia de um laser de argônio (488 nm) e de hélio-neônio (543 nm). O espectro de emissão foi fixado utilizando-se filtros BP 510-568 nm para FM 1-43 fx e 578-697 para α -bungarotoxina. Secções ópticas na modalidade de série Z foram coletadas em intervalos de 1,0 μ m. Durante a aquisição das imagens, os hemidiafragmas foram digitalizados, sendo selecionadas em torno de 20 imagens (em objetiva de 40x) para contagem dos perfis de elementos pré e pós-sinápticos, 10 imagens (em objetiva de 63x) para avaliação da área e intensidade de fluorescência dos elementos. As análises quantitativas dos elementos pré e pós-sinápticos foram realizadas com o software Image J (NIH). Para análise da intensidade de fluorescência, as imagens foram convertidas para o formato da escala de cinza de 8 bits e cada elemento marcado foi avaliado individualmente, sendo que a fluorescência média dos elementos sinápticos de cada animal foi considerada para a comparação entre os genótipos. Para a análise estatística da intensidade de fluorescência da JNM, foram selecionadas as 50 JNM mais fluorescentes por animal.

3.8. Avaliação ultraestrutural das JNMs do músculo Diafragma dos animais ChAT-ChR2-EYFP

As amostras do músculo diafragma foram fixadas em solução recém-preparada de PFA 4,0%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7.4) (solução de Karnovsky modificada), overnight à 4° C. Após fixados, os tecidos foram fragmentados na região das

placas motoras e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0.1M (pH 7.4) por 90 minutos a 4 °C. Ferrocianeto de potássio foi adicionado a esta solução na concentração de 1,6% (solução de tetróxido de ósmio reduzido). Os tecidos passaram pela lavagem em solução de tampão cacodilato 0.1M (pH 7.4) em três banhos de 10 minutos à temperatura ambiente. Contrastados por imersão em uranila 2,0% *overnight* à 4° C. Em seguida, os músculos foram lavados com água deionizada por 10 minutos em temperatura ambiente, recortados em fragmentos de cerca de 3 mm de comprimento, desidratados em uma série crescente de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%) e acetona absoluta à temperatura ambiente. Posteriormente os fragmentos passaram por pré-infiltração e infiltração em resina epon 812 (EMS). Após a polimerização dos blocos foi realizada a microtomia com navalha de vidro (cortes semifinos de 300 nm) para seleção das áreas de interesse e, em seguida, a microtomia com navalha de diamante (cortes ultrafinos de 50 nm) apenas da região selecionada. Os cortes foram montados em grades de cobre de 200 mesh e contrastados com citrato de chumbo para posterior visualização. As telas de cobre foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit-FEI/Quanta, com voltagem de aceleração de 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG.

3.9. Estudo Miográfico *in vitro*

A preparação nervo frênico-diafragma foi removida e montada em cubas para órgãos isolados para a realização de registros miográficos *in vitro*, de acordo com Gallacci & Oliveira (1994). Em resumo, a preparação foi montada verticalmente em uma câmara convencional de banho para músculo isolado, contendo 15 mL de solução de Ringer (NaCl, 135 mM; KCl, 5 mM; MgCl₂, 1 mM; CaCl₂, 2 mM; NaHCO₃, 15 mM; NaH₂PO₄, 1 mM; glicose, 11 mM). A solução foi aerada com O₂ (95%) + CO₂ (5%) e mantida a 35 °C. As contrações musculares foram registradas através de um transdutor de força isométrica (FT03, Grass) acoplado a um sistema de aquisição de dados (AcquireLab- Gould). As contrações musculares foram evocadas indiretamente, por pulsos elétricos retangulares com duração de 0,5 ms, intensidade supramáxima e frequência de 0,2 Hz aplicados por um estimulador eletrônico (S88K, Grass) no nervo frênico. Uma vez montado no aparato de teste, os músculos foram estabilizados por 30 min, durante os quais o líquido nutriente foi trocado a cada 10 minutos e o estímulo elétrico foi mantido para estabelecer a viabilidade muscular.

A margem de segurança da transmissão neuromuscular foi avaliada através da administração de concentrações crescentes de brometo de pancurônio ou magnésio nas

preparações evocadas indiretamente. Estas substâncias foram adicionadas ao banho de órgãos, respeitando um período de 10 minutos entre cada concentração. A amplificação da contração muscular na presença e na ausência das concentrações crescentes de pancurônio ou de magnésio foi utilizada para estimar a margem de segurança da transmissão neuromuscular.

3.10. Avaliação histológica da musculatura estriada esquelética dos animais ChAT-ChR2-EYFP e VChT KD^{HOM}

Para esses experimentos os músculos Sóleo e Extensor Longo dos Dedos (EDL) dos animais WT, VChT KD^{HOM} e ChAT-ChR2-EYFP foram dissecados. Adicionalmente, o músculo Gastrocnêmio foi coletados dos animais VChT KD^{HOM}. O protocolo de fixação, inclusão em resina glicol metacrilato e microtomia, foi o mesmo utilizado na preparação da medula espinal lombar (vide item 3.3.1), com a diferença que com os músculos, apenas uma secção transversal de cada músculo por animal/genótipo foi analisada. A microtomia dessas amostras foi realizada utilizando um micrótomo (Leica Reichert-Jung®) localizado no laboratório de Neurobiologia, Conceição Machado no Departamento de Morfologia, ICB, UFMG.

Obtenção e análises de imagens

Foi fotografado 1 corte por animal/genótipo em microscópio óptico com objetiva de 20x (Axioplan 2 Carl Zeiss), localizado no laboratório de Neurobiologia, Profa. Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB, UFMG. Para os músculos Sóleo e EDL foram feitas imagens de toda a secção transversal do músculo, enquanto que para o músculo gastrocnêmio, foram feitas em torno de 15 imagens em aumento de 20x das porções lateral e medial do músculo, excluindo-se o músculo plantar que compõe o complexo muscular. As imagens foram analisadas utilizando-se o software Axiovision (Carl Zeiss), por onde foi analisada a área de secção transversal (CSA) das fibras musculares. Os dados foram graficamente representados e estatisticamente analisados utilizando-se o programa GraphPad Prisma 5.0.

3.11. Avaliação por imunofluorescência dos tipos de fibras musculares no Sóleo e EDL dos animais ChAT-ChR2-EYFP e VChT KD^{HOM}

As isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) foram identificadas de acordo com o protocolo descrito por (Valdez et al. 2012). Os músculos Sóleo e EDL foram coletados, e imediatamente imersos em OCT (Easy Path), orientados em moldes plásticos (Sakura) para

congelamento e cobertos com OCT. Os músculos Sóleo e EDL foram seccionados na sua porção média, imersos no mesmo molde e congelados em isopentano (Sigma-Aldrich), resfriados em nitrogênio líquido. Os blocos contendo os músculos foram cortados em um micrótomo (Leica CM3050S), onde cortes transversais de (10 μ m) foram coletados em lâminas previamente preparadas com gelatina. As lâminas foram então bloqueadas por 30' a TA com 3% BSA (Sigma-Aldrich), 5% soro de cabra (Sigma-Aldrich), e 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS 1x. Os cortes foram, em seguida, incubados overnight a 4oC com os seguintes anticorpos primários: tipo 1 (Leica Microsystems Cat# NCL-MHCs Lot# RRID:AB_563898; 1:250); tipo 2A (DSHB Cat# SC-71 Lot# RRID:AB_2147165; 1:100), tipo 2X (DSHB Cat# BF-35 Lot# RRID:AB_2274680, que reconhece todas isoformas da MyHC, exceto a isoforma 2X; 1:100), e tipo 2B (DSHB Cat# BF-F3 Lot# RRID:AB_2266724; 1:100). Os anticorpos SC-71, BF-35 e BF-F3 foram depositados no Hybridoma Bank (DSHB) por Stefano Schiaffino. Todos os anticorpos foram diluídos na mesma solução de bloqueio, sem Triton X100. As lâminas foram lavadas 3X com PBS1X e incubadas com por 1 hora a TA com os anticorpos secundários, Alexa 488 goat anti-mouse IgG1 (Thermo Fisher Scientific Cat# A-21121 Lot# RRID:AB_2535764. Reconhece os anticorpos tipos 1, 2A e 2X) e Alexa 488 goat anti-mouse IgM (Thermo Fisher Scientific Cat# A-21042 Lot# RRID:AB_2535711. Reconhece o anticorpo tipo 2B). Os cortes foram lavados 3X com PBS1X e as lâminas montadas em lâmina/lamínula utilizando o meio para preservação da fluorescência, VectaShield (Vector Laboratories Cat# H-1000 Lot# RRID:AB_2336789).

Obtenção e análises de imagens

As imagens de uma secção transversal dos músculos para cada animal/genótipo foram obtidas utilizando uma objetiva (10x, 0.25AN) em um microscópio de fluorescência (Leica DM2500) acoplado a uma câmera Leica DFC 345FX e visualizados em computador. Para excitação do Alexa, nós utilizamos uma lâmpada de mercúrio de 100W, sendo que um filtro FITC foi utilizado para coleta da luz de emissão. As imagens foram analisadas pelo software image J onde cada tipo de fibra foi contado e expresso como a porcentagem em relação ao número total de fibras contadas no corte. Os cortes também foram utilizados para análise da CSA dos tipos de fibras musculares. Cada anticorpo foi validado utilizando os controles negativos apropriados, omitindo-se os anticorpos primários dos cortes. Os dados foram representados em gráficos pelo programa GraphPad Prisma 5.0 e analisados estatisticamente pelo mesmo.

3.12. Teste de Fadiga Muscular

Estudo Miográfico

O estudo miográfico foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Junção Neuromuscular e Toxinologia do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Preparação do músculo EDL e Sóleo de camundongo

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os músculos EDL e Sóleo foram isolados e montados verticalmente em cuba para órgão isolado, contendo 10 mL de solução Ringer, constantemente borbulhada com carbogênio (95 % O₂ e 5 % CO₂) e mantida na temperatura de 28 ± 2 °C. Uma das extremidades do músculo EDL e Sóleo foi conectada a um suporte de vidro em forma de L e a outra a um transdutor de tensão isométrica (Grass, FT03). O transdutor foi conectado a um amplificador de sinal (Gould Systems, 13-6615-50) e os registros miográficos *in vitro* foram efetuados em um computador, através de um sistema de aquisição de dados (Gould Systems, Summit ACQuire e Summit DataViewer).

Registro das contrações musculares evocadas diretamente

Os músculos EDL e Sóleo foram posicionados entre os polos de um eletrodo bipolar de platina, e este acoplado a um estimulador elétrico (Grass-S88K). A tensão de base de cada uma das preparações foi estabelecida individualmente, de modo a fornecer a tensão máxima em resposta à aplicação de pulsos elétricos retangulares (5 milissegundos de duração, intensidade supra-máxima e 0,2 Hz de frequência). Os estímulos foram mantidos durante o período de estabilização de 30 minutos, ocorrendo a troca do líquido nutriente a cada 10 minutos. Em seguida, a D-tubocurarina (0,025 mM) foi adicionada ao banho para evitar qualquer interferência dos estímulos evocados indiretamente no músculo através do nervo.

Após o período de estabilização, as preparações foram submetidas a estímulos tetânicos sucessivos com frequência crescente (10, 30, 50, 80, 100, 120, 150 e 180 Hz), duração de 500 milissegundos e aplicados a cada 5 minutos. Após este procedimento, a amplificação máxima do músculo EDL (100 Hz) e Sóleo (80 Hz) foram estabelecidas e posteriormente utilizadas no protocolo de Fadiga Muscular.

Protocolo Experimental do Teste de Fadiga Muscular

Os músculos EDL e Sóleo foram submetidos a um período de 10 minutos de estímulos tetânicos sucessivos. Cada tétano foi deflagrado na frequência de 100 Hz (EDL) e 80 Hz (Sóleo), apresentando duração de 500 milissegundos e com intervalo entre eles de 1500

milissegundos. A resistência a fadiga foi definida como a amplitude da contração inicial (tempo 0) em relação ao decréscimo percentual da amplitude das contrações a cada 1 minuto.

3.13. Microscopia Eletrônica de Transmissão dos músculos EDL e Sóleo dos animais VACHT KD^{HOM}

Os músculos EDL e Sóleos foram coletados e processados para MET conforme protocolo descrito no item 3.9. Foram realizadas análises qualitativas de cortes longitudinais das miofibrilas do EDL e Sóleo. Foram avaliados detalhes relacionados à organização miofibrilar, preservação dos sarcômeros, aspectos das tríades (TT e RS), preservação e localização das mitocôndrias. Foram avaliadas pelo menos 15 imagens para cada animal/genótipo.

3.14. Análise molecular por qPCR de genes musculares e mitocondriais dos músculos EDL e Sóleo dos animais VACHT KD^{HOM}

Os músculos EDL e Sóleo foram rapidamente dissecados e imersos em solução de preservação do RNA (RNA lysis-Sigma-Aldrich) e armazenados por 24 horas em geladeira a 4°C e depois a -20°C até o processamento. O RNA total foi extraído utilizando reagente de TRIzol (Thermo-Fisher Scientific) e tratado com DNase (RNase-free- Sigma-Aldrich AMP-D1). A enzima M-MLV (Promega, M1705), foi utilizada para transcrição reversa, e dessa reação, 40ng de cDNA foi gerada e utilizada para qPCR. Os genes relacionados na tabela 4 foram amplificados. O gene endógeno utilizado para normalização das análises foi o GAPDH (controle interno). O reagente SYBR green (SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) foi utilizado em um sistema ViiA™ 7 System (Applied Biosystems) que permite a análise automática da curva de *melting*. Um pico único para cada reação confirmava a identidade do produto gerado na PCR. A comparação dos níveis de expressão gênica entre os grupos foi feita pelo método de comparação relativa dos *Cycle Threshold* (CTs) utilizando a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl 2001). As alterações na expressão dos genes refletem diferenças entre camundongos WT e VACHT KD^{HOM} na ordem de 2X. Os valores da comparação relativa dos CTs, aplicados na fórmula, foram normalizados em 1,0 para os animais controles (WT) e as diferenças encontradas para os animais VACHT KD^{HOM} eram sempre relativas aos animais WT. As sequências no RNA utilizadas estão disponíveis na base de dados no GenBank em: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os dados foram computados, representados em gráficos pelo programa GraphPad Prisma 5.0 e analisados estatisticamente.

Tabela 4: Lista e sequências iniciadoras (primers) utilizadas para amplificação dos genes avaliados.

GENE	SEQUENCIA
GAPDH_FW	TGCGACTTCAACAGCAACTC
GAPDH_RV	ATGTAGGCCATGAGGTCCAC
MyoD_FW	GGCCACTCAGGTCTCAGGTGT
MyoD_RV	TGTTGCACTACACAGCATGCCT
Miogenina_FW	CACTCCCTTACGTCCATCGT
Miogenina_RV	CAGGACAGCCCCACTTAAAA
Pax-7_FW	AAAAGCACCAAGCCAAGACC
Pax-7_RV	GCACACATCCCACTCACACC
PGC1-1α_FW	CCCTGCCATTGTTAAGACC
PGC1-1α_RV	TGCTGCTGTTCCCTGTTTTTC
MTND-1_FW	GTTGGTCCATACGGCATTTTT
MTND-1_RV	TGGGTGTGGTATTGGTAGGG
Atrogina1_FW	GCAGAGAGTCGGCAAGTC
Atrogina1_RV	CAGGTCCGGTGATCGTGAG
MuRF1_FW	TGGAAACGCTATGGAGAACC
MuRF1_RV	ATTCGCAGCCTGGAAGATG

3.15. Avaliação da capacidade aeróbica máxima (Teste de Incremento Máximo- TIM) dos animais VChT KD^{HOM} ChAT-ChR2-EYFP

Uma esteira elétrica (EP - 132 - INSIGHT, Ribeirão Preto, Brazil), localizada no Laboratório de Endocrinologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, UFMG foi utilizada para avaliação da capacidade aeróbica máxima. A esteira foi angulada em 5%. Inicialmente foi realizada uma habituação dos animais a sala e ao aparato de teste por cinco minutos durante cinco dias. Nesse período, os animais foram colocados sobre a esteira e caminhavam a uma velocidade de 10cm/s. Após esse período, o TIM foi iniciado com a velocidade a 10cm/s com acréscimos de 5cm/s a cada 3 minutos. Um estímulo elétrico de baixa amperagem (0,2mA) era aplicado automaticamente aos animais que saíam da esteira. O

teste finaliza apenas quando o animal parava de correr e entrava em fadiga. A fadiga foi definida pela recusa dos animais em continuar a movimentação na esteira por mais de 10s.

Adicionalmente, nós avaliamos o consumo de oxigênio. Para tanto, os animais foram primeiramente pesados e colocados individualmente em uma câmara de medição gasosa acoplada à esteira. Utilizando um calorímetro indireto de fluxo aberto (LE405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Spain), o consumo de oxigênio (VO₂) foi registrado continuamente. O VO₂ era registrado a cada minuto utilizando um sistema computadorizado (Metabolism, Harvard Apparatus, Spain). Nos primeiros 30 minutos foram registrados o consumo basal de O₂, e logo depois, o TIM era iniciado seguindo protocolo acima. Ao final do teste o pico máximo de O₂ foi selecionado para análise. Nós também avaliamos a trabalho gasto (J), que foi calculado como $J = [\text{peso corporal (Kg)}] \times [\text{tempo para fadiga}] \times [\text{velocidade máxima na esteira (m/min)}] \times [\text{seno (inclinação da esteira)}]$. Os dados foram representados em gráficos gerados pelo programa GraphPad Prisma 5.0 e estatisticamente analisados pelo mesmo.

3.16. Avaliação do comportamento motor e força muscular dos animais ChAT-ChR2-EYFP

Teste do campo aberto (*Open field*)

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora espontânea (FERREIRA-VIEIRA *et al.*, 2014; SOUSA; ALMEIDA; WOTJAK, 2006). O teste foi realizado utilizando uma caixa (50x50cm) com o piso dividido em 16 quadrados iguais. Os camundongos foram colocados individualmente na extremidade esquerda da caixa, e o tempo de exploração definido foi de 300s. Nós medimos a atividade locomotora espontânea contando o número de segmentos cruzados (locomoção horizontal) (VIANNA *et al.*, 2000). Adicionalmente, o teste permitiu avaliar a exploração vertical, quando o animal estica-se verticalmente se apoiando pelas patas traseiras (também chamado de *rearing*). Os dados foram registrados automaticamente pelo sistema do aparato, os quais foram computados em tabelas no Excel, convertidos em representações gráficas e analisados pelo programa GraphPad Prisma 5.0.

Avaliação do aprendizado e coordenação motora (*Rotarod*)

O teste do rotarod foi utilizado para avaliar a coordenação motora no nosso modelo experimental (INGRAM *et al.*, 1981). O aparato consistia de um cilindro giratório. O tempo em que os animais levavam para cair do aparato foi registrado. Nós utilizamos o protocolo descrito por Prado *et al.* (2006). Primeiramente, os camundongos foram aclimados ao aparelho desligado. Os animais foram treinados durante 2 min em cinco ensaios a uma velocidade acelerada (de 4 a 40 RPM em 300s) por três dias consecutivos. No dia do teste, os animais foram avaliados em três ensaios com velocidade acelerada (esperando um intervalo de 10 min entre cada ensaio). O desempenho de cada animal no rotarod representa a média dos três testes independentes. Os dados foram representados em gráficos gerados pelo programa GraphPad Prisma 5.0 e estatisticamente analisados pelo mesmo.

Tempo para queda (*Wire-Hang*)

O teste do Wire-hang é uma ferramenta útil para avaliação da força muscular e resistência do animal. Esses experimentos foram realizados de acordo com Sango *et al.* (1996) e Prado *et al.* (2006). Os camundongos foram familiarizados à sala de comportamento 2 horas antes do teste. Nós posicionamos cada animal individualmente no topo de uma grade metálica com 22x22cm. Aguardava-se a fixação dos animais no topo da grade, e em seguida, a grade era calmamente virada para baixo, de modo que os camundongos ficassem suspensos. As grades eram posicionadas a 20cm do chão, onde uma almofada era posicionada abaixo do animal para evitar ferimentos após a queda. Para cada animal foi realizada triplicatas, onde cada animal deveria permanecer preso à grade por um tempo definido de 60s. Após finalização dos experimentos, era extraída a média das três tentativas. O valor resultante era então utilizado para análise. Os dados foram convertidos em representações gráficas e analisados estatisticamente avaliados pelo programa GraphPad Prisma 5.0.

Registro da força máxima (*Grip force*)

O teste de Grip-force avalia especificamente a força muscular do animal. O teste foi realizado de acordo com Fowler *et al.* (2002). Para esse teste nós utilizamos um aparelho transdutor de força, conectado a uma haste metálica gradeada, onde os animais fixavam as patas dianteiras e/ou traseiras. O transdutor de força continha uma pequena tela onde a força máxima de agarre exercida pelos animais era registrada. Para o teste, os animais foram habituados à sala de comportamento e manipulados por apenas um experimentador. Durante o

teste, os animais eram gentilmente manipulados pela cauda permitindo a aderência dos animais ao aparelho. Os animais foram posicionados, de modo que ficassem paralelos à haste metálica. Logo após a fixação dos camundongos à haste, o experimentador segurando a cauda dos animais, aplicava uma força contínua no sentido contrário da resistência dos animais, até que os mesmos perdessem a aderência. Nesse momento, o aparelho registrava o pico de força máxima, sendo expresso em gramas/força (g/f). Nós realizamos a medição da força máxima exercida utilizando os membros anteriores e anteriores/posteriores. O teste foi realizado em triplicata para cada animal. Os valores médios das triplicatas foram utilizados para análise. Os dados foram representados em gráficos analisados estaticamente pelo programa GraphPad Prisma 5.0.

3.17. Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o Microsoft Excel e GraphPad Prism 5. Os dados histológicos representam a mediana de pelo menos 500 fibras musculares plotados em gráficos de dispersão. Antes de definir os testes estatísticos, os dados foram avaliados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para testar se os dados assumiam ou não uma distribuição Gaussiana. A significância estatística foi avaliada utilizando o teste t de Student não pareado quando os dados apresentavam distribuição normal, ou o teste de Mann-Whitney para a distribuição não Gaussiana. One-Way ANOVA ou Kruskal-Wallis, e um teste de comparação múltipla Newman Kulls ou Dunn foi realizado quando apropriado, conforme descrito no texto. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todos os experimentos comportamentais, moleculares, de microscopia eletrônica e testes de capacidade aeróbia foram conduzidos com os pesquisadores "cegos" aos genótipos dos animais, exceto para análises histológicas e tipos de fibras. Neste trabalho, nós utilizamos entre $n = 5-7$ animais por genótipo para cada conjunto de dados. O n exato para cada procedimento experimental está descrito na legenda das figuras, bem como os valores de "p". Todos os dados fora da distribuição foram tratados como *outliers* e excluídos da análise usando a calculadora QuickCalcs Graph Pad disponível em (<https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

4. RESULTADOS

Na primeira parte deste trabalho serão apresentados os resultados referentes às U.M de três grupos musculares distintos, Diafragma, EDL e Sóleo, provenientes do modelo murino, ChAT-ChR2-EYFP. Posteriormente apresentaremos os dados acerca dos camundongos VACHT KD^{HOM}.

4.1. A exocitose de vesículas sinápticas não está alterada nos animais ChAT-ChR2-EYFP de 3 e 18 meses.

No trabalho de Sugita et al, (2016), nós mostramos que o aumento no número de cópias do VACHT nas vesículas sinápticas induzia aumento na liberação espontânea de ACh (MEPPs). Sendo assim, nós nos perguntamos se esse aumento na expressão do VACHT estaria relacionado a possíveis mudanças na reciclagem de vesículas sinápticas. Essa pergunta se torna importante uma vez que o VACHT é capaz de se ligar à proteínas do complexo SNARE (SANDOVAL et al., 2006). Para responder a essa pergunta, nós realizamos a marcação das terminações nervosas motoras utilizando uma sonda vital clássica para estudos de reciclagem de vesículas sinápticas, o FM1-43. Essa sonda se liga reversivelmente à membrana da terminação, sendo internalizada durante a endocitose compensatória. Uma vez ligada às membranas biológicas, a sonda é 350 vezes mais fluorescente do que no ambiente hidrofílico. Assim, após estímulo e exocitose vesicular, a sonda é novamente liberada para o meio (desmarcação do FM1-43), de acordo com o gradiente de concentração. Portanto, com essa sonda, é possível acompanhar a exocitose vesicular.

Ao avaliarmos as imagens de desmarcação do FM1-43 induzida por KCl (60mM), nos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP em 3 e 18 meses (FIGURA 14 A e B), nós constatamos que a taxa de vesículas sinápticas que sofriam exocitose se mantinha similar entre os genótipos e entre as idades. Como se pode ver nos gráficos da cinética de decaimento da fluorescência do FM1-43 e no gráfico de barras da desmarcação, não percebemos diferenças significativas (FIGURA 14 C e D). As diferenças que vimos foram apenas entre a desmarcação do controle experimental (Fotodesmarcação-PB) e a induzida por KCl 60mM, nos animais de 3 meses. Com relação aos animais de 18 meses, o teste estatístico não pôde ser aplicado, uma vez que o nosso grupo de animais de 18 meses PB, tinham apenas dois animais, o que impossibilitou a realização do teste. A tabela 5 sumariza os resultados encontrados.

Tabela 5: Resultados da fotodesmarcação (PB) e exocitose induzida por KCl (60mM) dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP aos 3 e 18 meses.

Desmarcação por FM1-43	WT-3M	ChAT-3M	WT-18M	ChAT-18M	Estatística
Fotodesmarcação (PB)	23,81±3,28	23,15±9,37	16,49±10,27	29,80±6,42	NS
KCl (60mM)	51,41±6,597 ^{&}	51,91±13,47 [#]	57,52±11,20	54,94±16,14	p<0,05

Os dados representam a Média±DP # diferente de WT-3M; & diferente de PB (***) p=0,0003); # diferente de PB (*p=0,02). Foi aplicado o teste de t-Student não pareado. NS: não significativo.

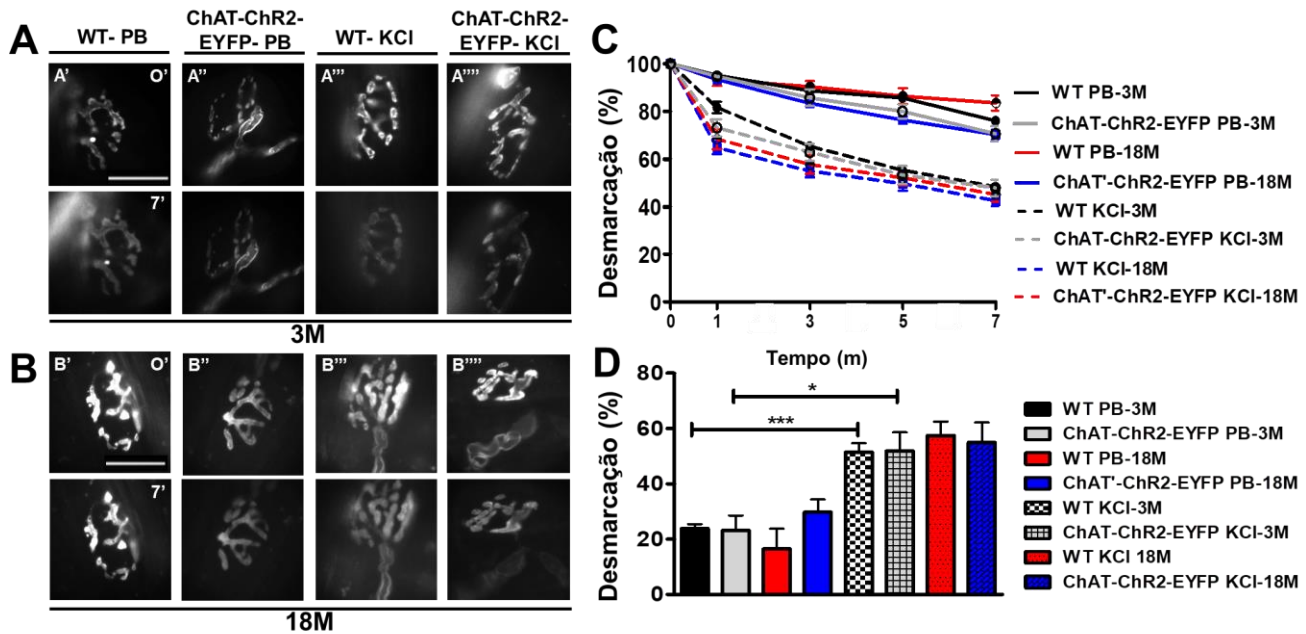


Figura 14: A exocitose de vesículas sinápticas medida pela redução na intensidade de fluorescência das terminações marcadas com FM1-43 não é modificada pela maior expressão do VAcHt nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP nas idades de 3 e 18 meses. A-B. Fotodesmarcação (PB) induzida pela exposição da preparação à luz polarizada nos animais WT (A' e B') e ChAT-ChR2-EYFP (A'' e B'') com 3 e 18 meses, nos minutos 0 e 7. A'''-A'''' e B'''-B'''''. Imagens representativas da desmarcação das terminações nervosas induzida por estímulo despolarizante (KCl- 60mM) nos animais WT (A''' e A''''') e ChAT-ChR2-EYFP (B''' e B''''') com 3 e 18 meses. C. Gráfico de linhas evidenciando a cinética de decaimento do sinal fluorescente (% de desmarcação) tanto para o PB e KCl. D. Gráfico da quantificação da % desmarcação das terminações motoras nas condições PB e KCl nos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP com 3 meses (*, *** p<0,05; teste t-Student). Percebe-se pelos dados que a desmarcação das terminações nervosas marcadas com FM1-43 não difere entre os animais WT e ChAT-ChR2-EYFP em ambas as idades. Foram analisados entre 20 e 25 spots fluorescentes nas terminações para cada animal por genótipo, em um N=4 (PB e KCl) para 3 meses e N=2 (PB) e N=5 (KCl) para 18 meses por genótipo. Os dados expressam a média ± EPM. 3M: três meses; 18M: Dezoito meses.

Dessa forma, esses experimentos de avaliação da reciclagem confirmam que a taxa de vesículas que sofrem exocitose não muda entre os camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP de 3 e 18 meses.

Uma vez que nossos dados acerca da exocitose de vesículas sinápticas não mostraram diferenças entre os grupos (WT e ChAT-ChR2-EYFP) nós nos perguntamos se o processo de endocitose estaria alterado ou não. Para tanto, utilizamos um análogo fixável da sonda fluorescente, o FM1-43 fx para especificamente avaliar a endocitose nesses animais. Nesse experimento, após endocitose compensatória das vesículas contendo o marcador FM1-43 fx aderido à membrana, a preparação é fixada com solução a 4 graus de PFA a 4%, interrompendo a atividade do terminal, o que permite avaliar por intensidade de fluorescência, o quanto de FM1-43 fx que foi endocitado. Além disso, essas preparações foram adicionalmente marcadas com α -bungarotoxina para visualização do componente pós-sináptico (AChRs) a fim de avaliarmos possíveis alterações morfológicas no componente muscular da placa motora desses animais.

4.2. O músculo diafragma dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam JNMs com alterações morfológicas e comprometimento na endocitose vesicular.

Antes de apresentar esses resultados, é importante esclarecer, que os dados que aqui serão apresentados referem-se apenas aos animais de 3 meses, uma vez que priorizamos a utilização do músculo diafragma para realização de experimentos de eletrofisiologia, de modo que a avaliação da endocitose nos camundongos de 18 meses será posteriormente realizada.

Nossos resultados mostram que as JNMs do diafragma dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP aparentemente não apresentam alterações perceptíveis com relação à aposição dos componentes pré-sinápticos e pós-sinápticos (FIGURA 15A). Esse dado pôde ser confirmado uma vez que não constatamos diferenças entre o número de elementos pré e pós-sinápticos (FIGURA 15B), bem como nas áreas pré e pós-sináptica do mesmo animal (FIGURA 15C). No entanto, avaliando a morfologia dos elementos, percebe-se uma redução de 30% e de 25% na área dos elementos pré e pós-sinápticos, respectivamente, dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP em comparação aos WT (FIGURA 15A e C). Além disso, a mensuração da fragmentação indica um maior índice de JNM fragmentadas nos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao WT (FIGURA 15D).

Ao avaliarmos a endocitose, pela medida da intensidade de fluorescência do FM1-43fx, percebemos uma redução de 38% na fluorescência pré-sináptica (FIGURA 15D). A tabela 6 sumariza os resultados encontrados.

Tabela 6: Resultados da análise das JNM do diafragma dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP utilizando o FM1-43 fx e α -bungarotoxina.

FM1-43 fx + α -BTX	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística
Elementos Pré-sinápticos (N°)	167 \pm 59,4	139,8 \pm 31,6	NS
Elementos Pós-sinápticos (N°)	196,8 \pm 62,2	192 \pm 47,1	NS
Área Pré-sináptica (μm^2)	234,2	165,0	p<0,0001
Área Pós-sináptica (μm^2)	257,7	191,3	p<0,0001
Fragmentação (% JNM)	30,8 \pm 11	61,3 \pm 14,3	p=0,04
Fluorescência FM1-43 fx (U.A)	94,5 \pm 11,6	57,8 \pm 18,7	p=0,02
Fluorescência α -BTX (U.A)	102 \pm 19,8	68,9 \pm 25,2	NS

Os dados representam a Média \pm DP (número de elementos) e a mediana dos valores (área e fluorescência). NS: não significativo.

Nossos dados mostram, portanto, que apesar do maior conteúdo vesicular de ACh (SUGITA *et al.*, 2016), a exocitose de vesículas sinápticas não se altera. Contudo, há um possível comprometimento na endocitose nos animais ChAT-ChR2-EYFP, os quais adicionalmente apresentam redução de tamanho dos elementos pré e pós-sinápticos, bem como maior índice de fragmentação.

Nosso grupo publicou um estudo que avaliou a influência do conteúdo vesicular de ACh e a presença do VAcHT, na manutenção da morfologia das vesículas sinápticas. Nesse estudo, ficou demonstrado que os animais VAcHT KD^{HOM}, que apresentam conteúdo reduzido de ACh por redução da expressão do VAcHT, apresentavam nas JNMs do diafragma, vesículas sinápticas com redução de circunferência, bem como alteração do formato, indicando que tanto conteúdo, quanto a presença da proteína nas vesículas, impactam a sua morfologia (RODRIGUES *et al.*, 2013). Dessa forma, sabendo que os animais ChAT-ChR2-EYFP apresentam maior liberação de ACh e aumento do número de cópias da proteína nas vesículas, o próximo experimento foi realizado com o objetivo de verificar a integridade das JNMs do diafragma nesses animais, e principalmente, avaliar se as vesículas sinápticas estariam maiores nesse camundongos em relação aos WT pelo aumento de ACh vesicular.

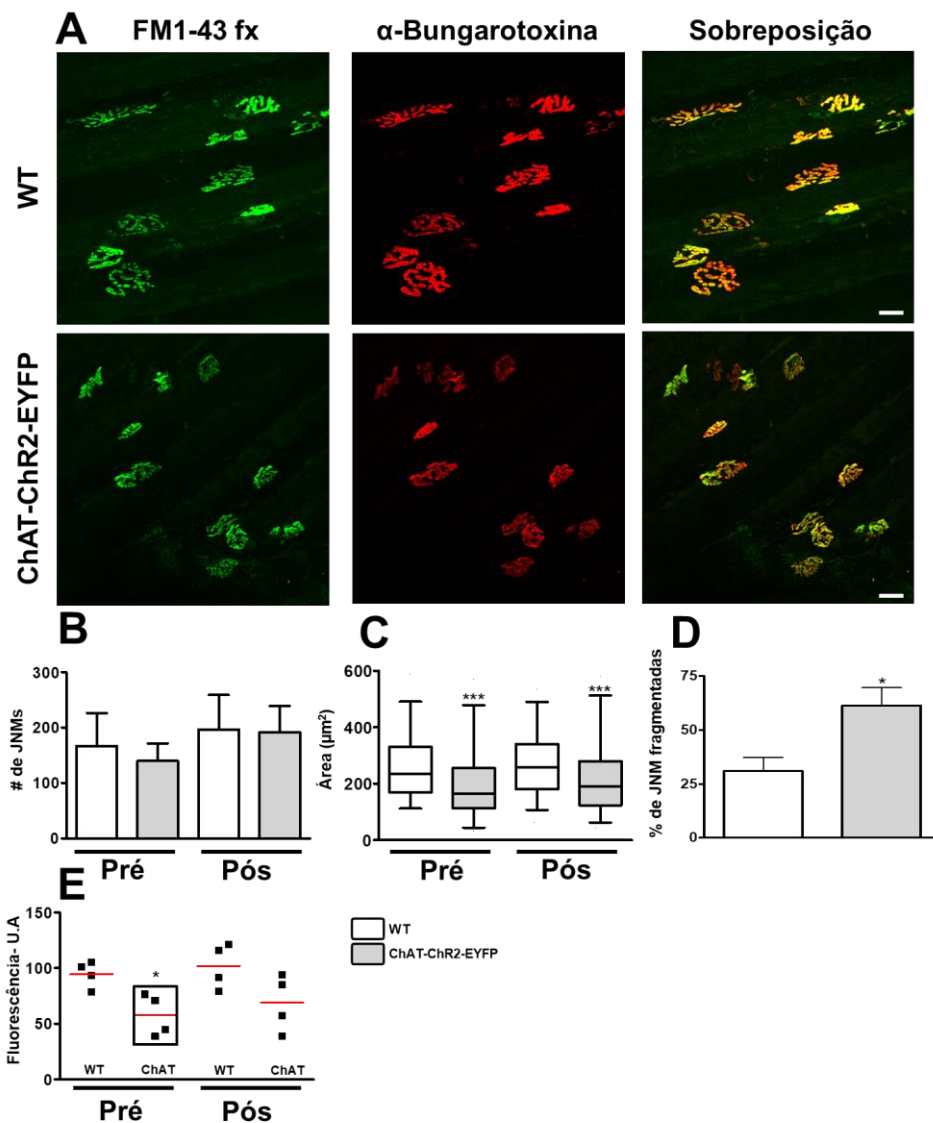


Figura 15. As JNMs dos camundongos ChAT–ChR2–EYFP apresentam alterações estruturais e possível comprometimento da endocitose de vesículas sinápticas. **A.** Imagens representativas dos elementos sinápticos para os animais WT e ChAT–ChR2–EYFP. Na primeira coluna encontram-se os elementos pré-sinápticos marcados com FM1-43 fx, na segunda coluna os elementos pós-sinápticos marcados com a α -bungarotoxina. A terceira coluna evidencia a colocalização pré e pós-sináptica. **B.** Quantificação do número de JNMs. **C.** Mensuração da área dos elementos sinápticos, mostrando redução da mesma no pré e pós-sináptico dos animais ChAT–ChR2–EYFP. **D.** Quantificação da fragmentação das JNMs, indicando um aumento significativo na % de JNM fragmentadas nos animais ChAT–ChR2–EYFP, em relação ao WT. **E.** Quantificação da intensidade de fluorescência dos elementos pré e pós-sinápticos nos animais WT e ChAT–ChR2–EYFP, evidenciando uma redução da intensidade dos elementos pré-sinápticos nos camundongos ChAT–ChR2–EYFP. Para a mensuração da área e intensidade de fluorescência foram analisados 162 elementos pré e pós-sinápticos para WT e 218 para ChAT–ChR2–EYFP. O gráfico de intensidade de fluorescência foi plotado utilizando-se a média de 100 JNMs (25 por animal) com maior intensidade de fluorescência tanto para WT quanto ChAT–ChR2–EYFP. Os dados representam a média \pm DP para o gráfico B e a mediana para o gráfico B. (***) $p < 0,0001$; Man-Whitney; *) $p < 0,05$, Teste t-Student; N=3 a 4 animais por genótipos). Barra de escala: 20µm.

4.3. Análise qualitativa das micrografias eletrônicas das JNMs do músculo diafragma dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP

Os dados apresentados nessa subseção dos resultados referem-se apenas a análises qualitativas que fizemos a partir de micrografias eletrônicas das JNMs do diafragma provenientes dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP. No momento estamos em processo de aquisição de imagens e análises de um grupo preliminar de JNM, onde estamos mensurando a circunferência e formato das vesículas sinápticas.

A análise qualitativa, até o momento, não nos permite afirmar se existem diferenças no tamanho das vesículas entre os animais WT e ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses (FIGURA 16). Dessa forma, é necessária a avaliação quantitativa para que se chegue a um resultado final. No entanto, as vesículas sinápticas de dois animais individuais ChAT-ChR2-EYFP de 18 meses encontram-se visivelmente maiores que as dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses. Não foi possível obter imagens das JNM dos animais WT de 18 meses.

Uma vez demonstrado que apesar dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentarem aumento da liberação de ACh, o que poderá refletir em um incremento na circunferência vesicular, vimos que as JNMs desses animais se encontram reduzidas em área e funcionalmente, apresentam comprometimento da endocitose, que no entanto, parece não refletir na exocitose vesicular. A seguir, o próximo passo foi avaliar a integridade funcional do músculo diafragma nesses animais, em vista das alterações previamente identificadas. Para esse fim, nós realizamos um experimento que avaliou a resposta do músculo (contração) estimulado indiretamente pelo nervo frênico, a concentrações crescentes de drogas ou soluções que levam ao bloqueio neuromuscular (brometo de pacurônio) e Magnésio. Com esse experimento, é possível avaliar a margem de segurança da transmissão neuromuscular.

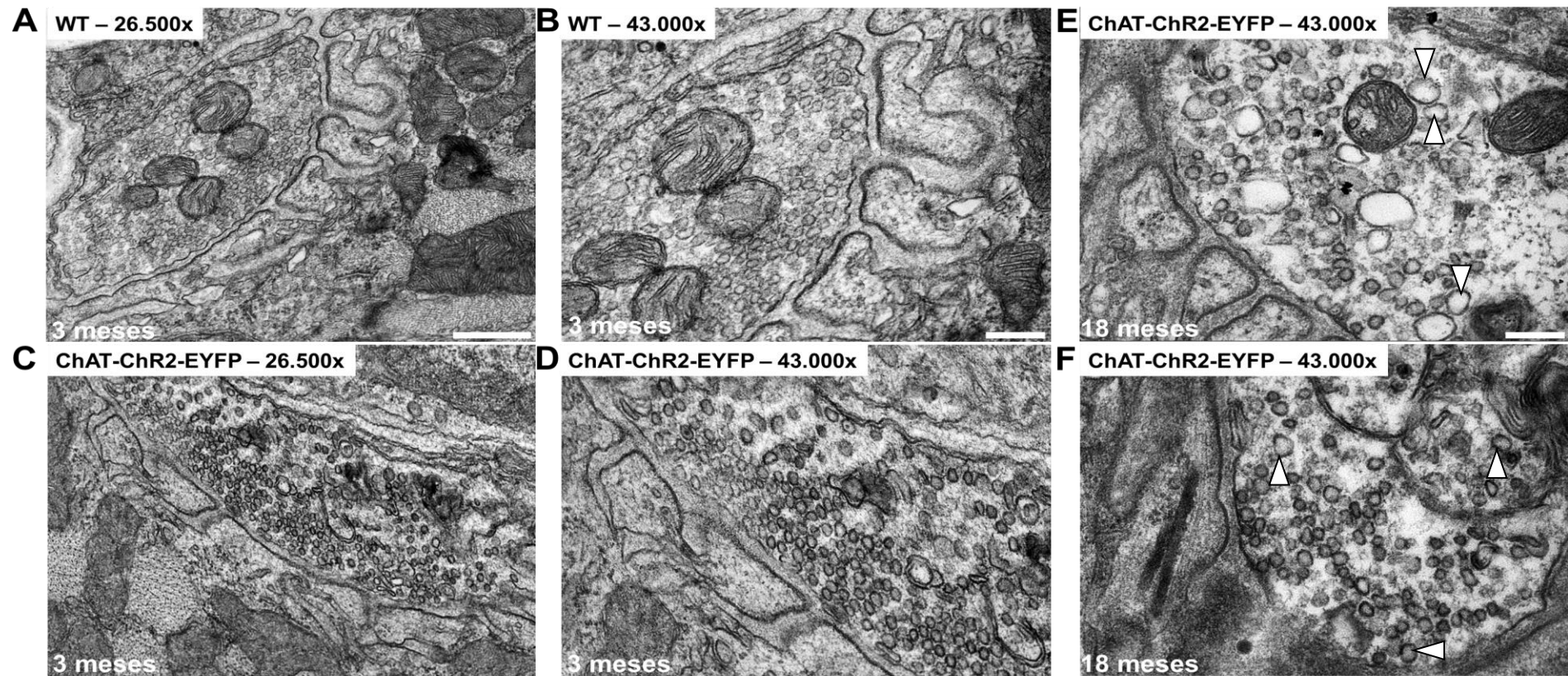


Figura 16. Ultraestrutura das JNM do diafragma proveniente dos animais WT (3 meses) e ChAT-Ch2-EYFP de 3 e 18 meses. A - B. Imagens mostrando um terminal pré-sináptico, composto por elementos típicos como vesículas sinápticas e mitocôndrias, bem como as projeções do sarcolema, formando as invaginações pós-juncionais. C - D. Imagens dos animais ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses, nos mesmos aumentos anteriores Apresentando os mesmos elementos típicos descritos em A e B.. E - F. Imagens representativas de dois perfis de JNM de dois animais individuais ChAT-ChR2-EYFP de 18 meses. Nota-se a presença de vesículas sinápticas maiores quando comparado aos animais de 3 meses. Barra de escala: 200µm.

4.4. A análise da contração muscular indireta evidencia alterações na neurotransmissão dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP

O músculo diafragma é conhecido pela alta margem de segurança da transmissão sináptica muscular, em comparação aos músculos periféricos, como o tibial anterior (WAUD; WAUD, 1972). Tendo isso em mente, nós realizamos uma avaliação da funcionalidade do diafragma, mensurando essa margem de segurança dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP, uma vez que nós mostramos algumas alterações na JNM desses animais.

Inicialmente, nós avaliamos os efeitos da exposição crônica do músculo diafragma dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP a doses crescentes de soluções bloqueadoras da transmissão neuromuscular sobre a contração muscular evocada indiretamente por estímulo do nervo frênico. Nós utilizamos o brometo de pancurônio, um fármaco que tem como mecanismo de ação a ligação competitiva aos AChRs, de modo que a ligação da ACh aos receptores é impedida, resultando no relaxamento e paralisia muscular (BAIRD; REID, 1967). Adicionalmente, a mesma avaliação foi realizada utilizando-se concentrações crescentes de Magnésio, que na JNM, é capaz de reduzir a exocitose de ACh (DEL CASTILLO; ENGBAEK, 1954).

Observa-se que a contração muscular evocada dos animais transgênicos, é completamente bloqueada, próximo a $8 \times 10^{-6} \text{M}$ de pancurônio, enquanto que nos animais WT, isso só ocorre com $11 \times 10^{-6} \text{M}$, uma diferença de 28% (FIGURA 17A). Além disso, os músculos dos animais ChAT-ChR2-EYFP, expostos à concentração de $4 \times 10^{-6} \text{M}$ do brometo de pancurônio, apresentam uma queda de quase 20% na contração muscular evocada, enquanto que a contração dos músculos dos camundongos WT estão próximos a 100% (FIGURA 17A).

A exposição dos músculos a concentrações crescentes de magnésio também revelou o comprometimento da margem de segurança dos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao WT. Na concentração de 6 mM do magnésio a queda da amplitude das contrações foi de 46% no grupo ChAT-ChR2-EYFP e de apenas 20% no WT (FIGURA 17B).

Nossos dados mostram que a neurotransmissão está comprometida nos animais ChAT-ChR2-EYFP, de modo que esses dados complementam às alterações morfofuncionais observada nas JNM desses animais.

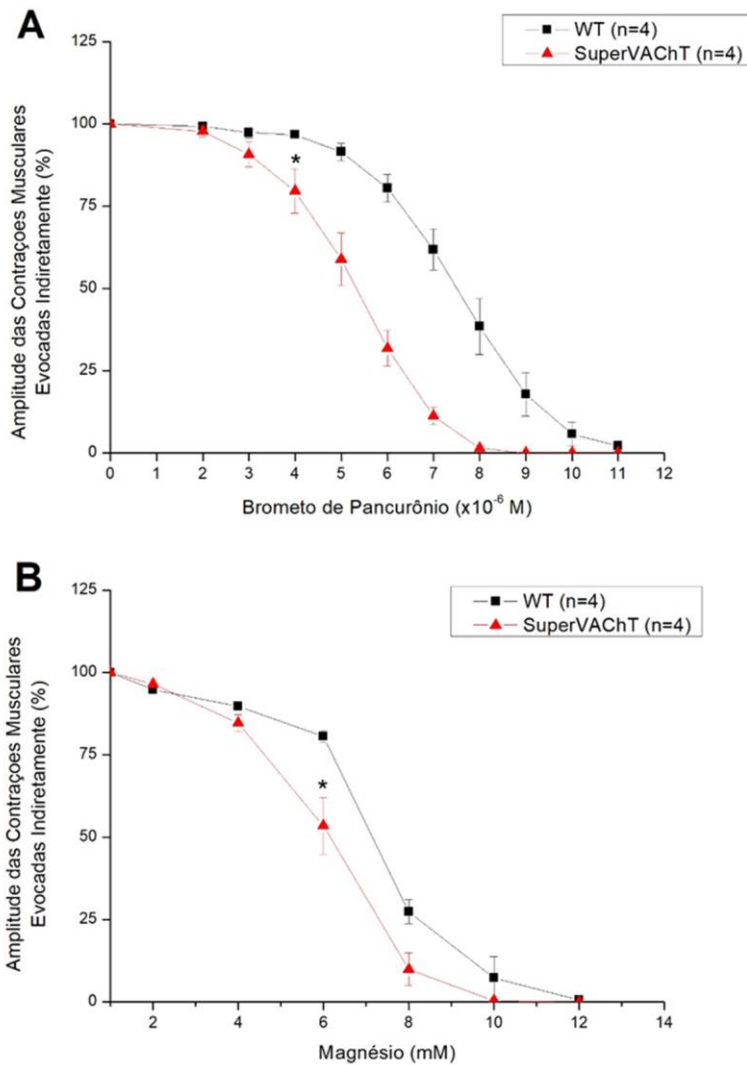


Figura 17. Margem de segurança da transmissão neuromuscular. Avaliação da margem de segurança da transmissão neuromuscular de preparações nervo frênico músculo diafragma de camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP. As preparações foram expostas a concentrações crescentes de brometo de pancurônio (Figura 17A) ou magnésio (Figura 17B). A amplitude das contrações musculares foi expressa como porcentagem em relação à contração inicial (ausência de pancurônio ou magnésio). Os valores foram expressos em Média \pm EPM. * representa diferença significativa em relação ao grupo WT ($p < 0,05$). N= 4 animais por genótipo.

A seguir, apresentaremos os dados acerca da análise das U.M do músculo EDL, bem como resultados específicos acerca da musculatura do Sóleo dos animais ChAT-ChR2-EYFP.

4.5. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações no tamanho dos seus motoneurônios

Nosso primeiro conjunto de resultados refere-se à análise dos motoneurônios do segmento lombar dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP na idade de 3 meses. Inicialmente nós realizamos uma análise histológica geral da medula espinhal desses animais, onde analisamos o diâmetro de ferret e contamos o número de células localizadas em todo o corno anterior da medula lombar. Para a análise quantitativa do tamanho e número dos prováveis motoneurônios α e γ/β , nós utilizamos a classificação de tamanho, onde os neurônios com diâmetro maior que $25\mu\text{m}$ foram considerados α -motoneurônios, e as células com diâmetro menor que $25\mu\text{m}$ foram classificadas como γ/β -motoneurônios (GADAMSKI *et al.*, 2006; TOMLINSON; IRVING; REBEIZ, 1973).

Nossos dados demonstram que, ao se comparar todas as células analisadas, sem classificar por tipo de motoneurônios, não há diferenças no diâmetro de ferret entre os genótipos (FIGURA 18C). No entanto, quando as células são classificadas de acordo com o tamanho, percebemos uma redução do tamanho dos prováveis motoneurônios α e um aumento no tamanho dos prováveis motoneurônios γ/β nos cortes de medula lombar de camundongos ChAT-ChR2-EYFP (FIGURA 18 D). Não observamos diferenças na contagem do número total de células presentes no corno anterior da medula espinhal entre os genótipos (FIGURA 14E). A tabela 7 sumariza os resultados.

Tabela 7: Análise histológica da medula lombar dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP

Diâmetro de Ferret (Mediana)	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística
Provável α -motoneurônio ($>25\mu\text{m}$)	34,33	33,36	p=0,02
Provável γ/β -motoneurônio ($>25\mu\text{m}$)	19,28	19,74	p=0,006
Número total de células (Média \pm DP)	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística
Provável α -motoneurônio ($>25\mu\text{m}$)	354 \pm 82,63	330,7 \pm 51,84	NS
Provável γ/β -motoneurônio ($>25\mu\text{m}$)	313,8 \pm 100,4	307,8 \pm 50,3	NS

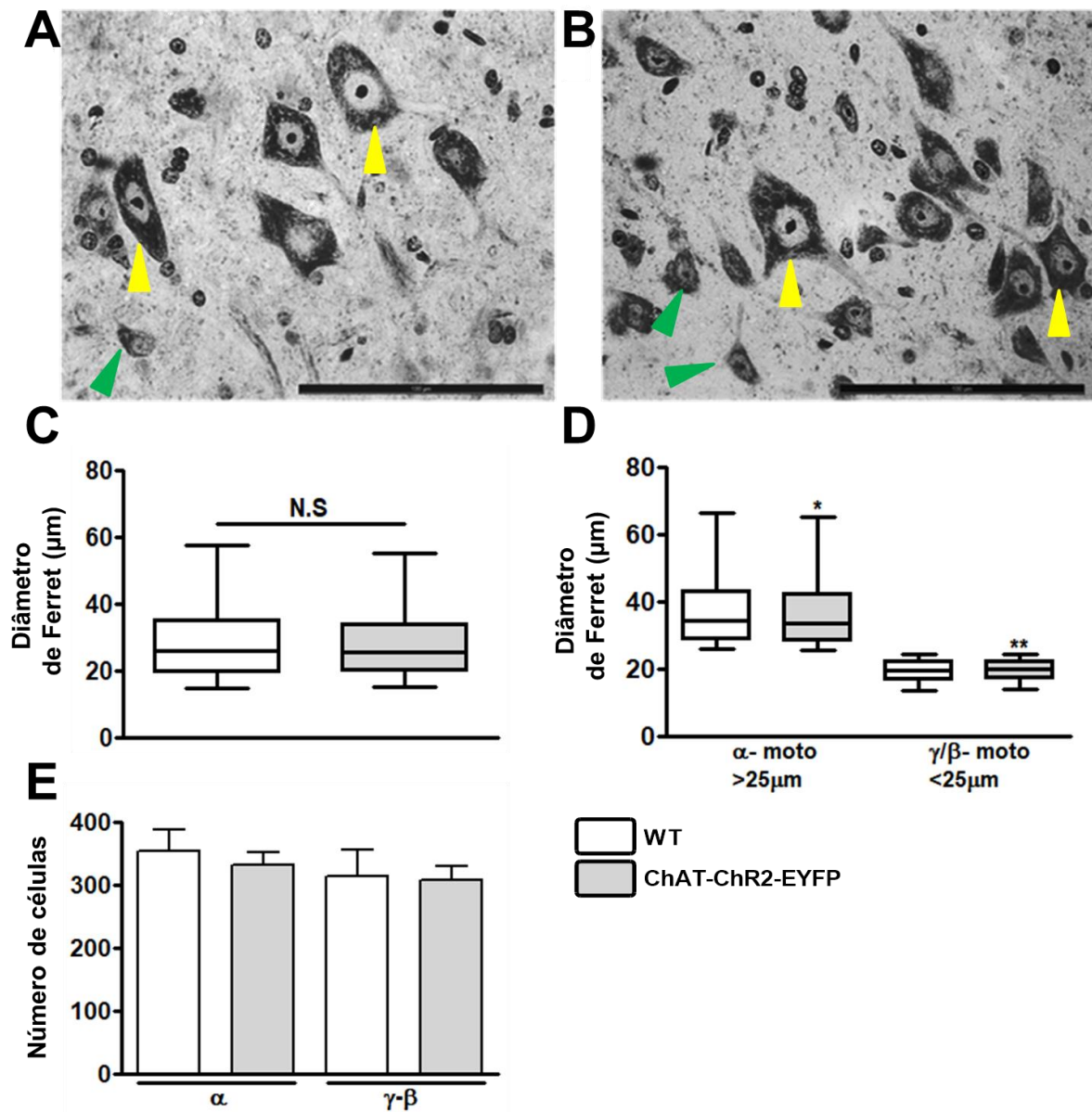


Figura 18: Análise histológica dos prováveis motoneurônios α e γ/β no corno anterior da medula espinal lombar dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP. A-B. Fotomicrografias da medula espinal lombar dos animais WT (A) e ChAT-ChR2-EYFP (B). As setas amarelas indicam prováveis motoneurônios do tipo α e as setas verdes γ/β . Barra de escala: $100\mu\text{m}$. C. A Mensuração do diâmetro de ferret dos prováveis motoneurônios α e γ/β indicam pela análise estatística uma redução no diâmetro dos motoneurônios α dos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação aos animais WT. De forma contrária, os motoneurônios γ/β apresentam aumento do diâmetro nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP, em comparação aos WTs. D. Pela análise histológica, o número total de células não foi diferente entre os genótipos. Foram analisadas 3.831 células em 10 cortes não consecutivos de 6 animais por genótipo. Os dados representam a mediana dos valores (C) e a (Média \pm EPM) (D) (* $p=0,02$; ** $p=0,006$, teste de Mann Whitney).

Em seguida, nós realizamos a marcação de cortes congelados com anticorpos anti-ChAT, que auxilia na identificação de motoneurônios colinérgicos, sendo que nesse grupo se incluem os motoneurônios que inervam exclusivamente as fibras extrafusais (α) e aqueles que inervam as fibras intrafusais (γ - β). Além disso, nós utilizamos um anticorpo (anti-osteopontina-OPN) o qual já foi demonstrado a sua presença apenas em motoneurônios do tipo α (FRIESE *et al.*, 2009). Além disso, essa marcação permite uma identificação mais específica do que a classificação de acordo com o tamanho. Ademais, a classificação por tamanho pode ser contaminada pela presença de interneurônios bem como alterações no tamanho desses motoneurônios causada pelo genótipo.

Nossos resultados mostram que a região da lâmina IX da medula lombar dos animais ChAT-ChR2-EYFP apresentam poucos neurônios marcados com ChAT quando comparado aos animais WT. Qualitativamente os segmentos lombares da medula espinal dos animais transgênicos encontram-se menores em relação aos WT (FIGURA 19AB). Além disso, é possível perceber que os motoneurônios são também menores (FIGURA 19D). A mensuração do diâmetro dos motoneurônios ChAT+ mostra uma atrofia nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP em comparação aos animais WT (FIGURA 19E). O número total de células ChAT+ não é diferente entre os genótipos. No entanto, percebe-se uma tendência a redução. Um aumento do N pode esclarecer essa tendência. Em relação à marcação com o anticorpo anti-OPN (marcador exclusivo para os α -motoneurônios), verificamos uma redução no tamanho dos neurônios α nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP em relação aos WTs (FIGURA 19H-I). O número total de células OPN+ não se mostra diferente entre os genótipos (FIGURA 195J). Dessa forma, nós confirmamos que a atrofia das células ChAT+ relaciona-se aos α -motoneurônios, uma vez que estes são neurônios colinérgicos.

Tabela 8: Imunofluorescência dos neurônios ChAT e OPN+ dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP

Diâmetro de Ferret (Mediana)	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística
Neurônios ChAT+	33	28	p<0.0001
Neurônios OPN+	33	29	p<0.0001
Número total de células (Média±DP)	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística
Neurônios ChAT+	234,0±92,71	166,3±57,24	NS
Neurônios OPN+	183,0±103,3	150,7±61,58	NS

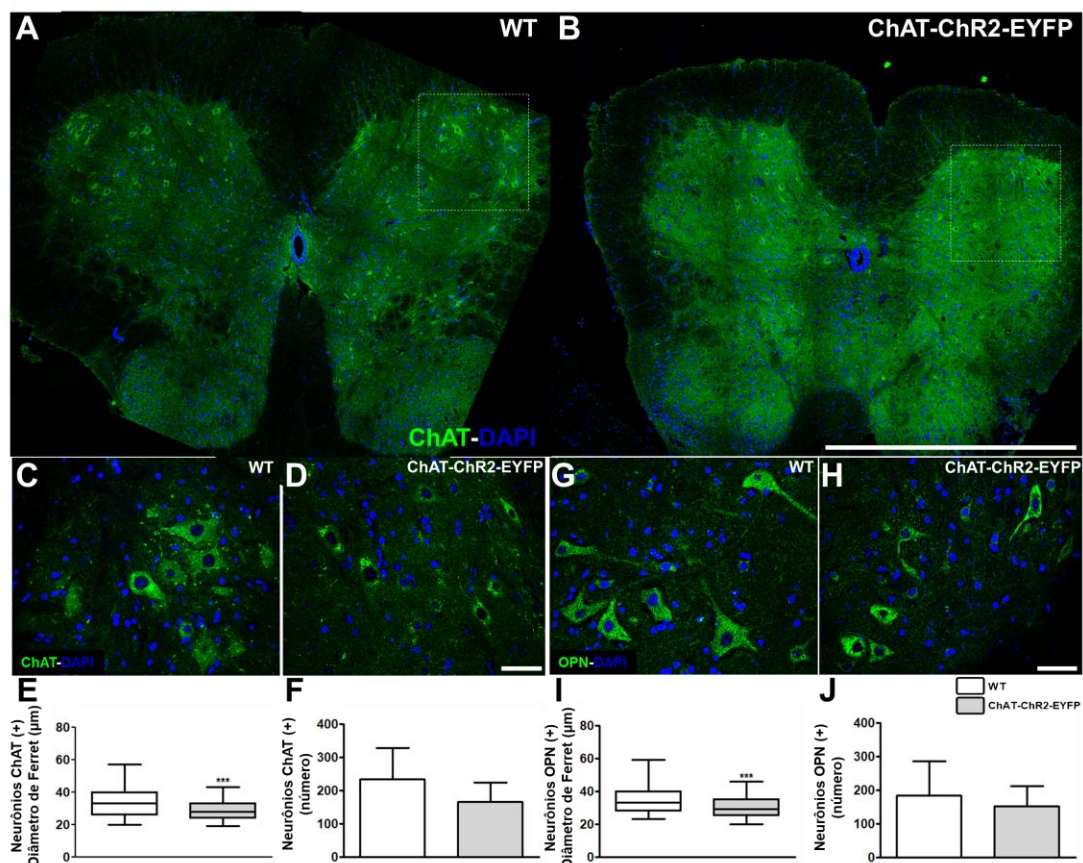


Figura 19: Os motoneurônios α da lâmina IX da medula espinal lombar dos camundongos ChAT-ChR2-EFP estão atrofiados. A. Imagem representativa de um corte de medula lombar dos animais WT, marcado com anticorpo anti-ChAT e DAPI. É possível perceber no corno anterior vários neurônios ChAT +, em ambos os lados. O quadrado pontilhado indica um aglomerado de motoneurônios (Lâmina IX). B. Imagem panorâmica da medula lombar dos animais ChAT-ChR2-EYFP. A medula desses animais aparece menor em relação aos animais WT. Barra de escala: 1mm. C. Imagem representativa do corno anterior da medula dos animais WT, em um aglomerado de neurônios marcados com ChAT e DAPI. D. Percebe-se uma redução no número e tamanho das células marcadas com ChAT nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP. Barra de escala: 50 μ m. E-F. A mensuração do diâmetro (E) dos neurônios ChAT+, evidencia redução de tamanho nos motoneurônios colinérgicos (podendo ser tanto α , quanto γ/β) em comparação aos animais WT. Apesar de visualmente terem menos células marcadas, a quantificação mostrou diferença (F). G-H. Imagens representativas do corno anterior da medula lombar dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP marcados com anticorpo que distingue especificamente os motoneurônios- α (osteopontina-OPN). É possível perceber neurônios menores em H, quando comparado com G. I-J. A análise quantitativa evidencia redução no diâmetro neuronal dos animais ChAT-ChR2-EYFP. O número de células não se altera. Foram analisadas 499 células para ChAT em 4 cortes em um N=3 animais por genótipo. Para a marcação com OPN, foram analisadas 449 células em 4 cortes e um N= 3 animais por genótipo. Os dados representam a mediana dos valores e a (Média \pm DP) (***) $p < 0,0001$, teste de Mann Whitney).

4.6. As JNM do músculo EDL dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações morfológicas

O nosso próximo passo foi avaliar as JNM responsáveis pela inervação do músculo EDL. Será que essa atrofia dos motoneurônios da medula lombar levaria a alterações degenerativas das JNMs desse músculo?

A análise morfológica do componente neuromuscular do EDL revela JNMs com redução de 20% no tamanho, tanto dos elementos pré-sinápticos quanto pós-sinápticos em comparação aos animais ChAT-ChR2-EYFP (FIGURA 20 B e C) e tabela 9. Adicionalmente, é possível perceber nas imagens dos animais ChAT-ChR2-EYFP, maior quantidade de JNM desnervadas, em relação ao controle (FIGURA 20 B), de modo que essa observação é confirmada quantitativamente em um artigo publicado do qual somos co-autores (SUGITA *et al.*, 2016). Dessa maneira, juntamente com os nossos dados acerca da atrofia dos neurônios motores alfa presentes no segmento lombar na medula espinal, responsável pela inervação do músculo EDL, mostramos que o próximo componente dessa U.M, as JNM estão também comprometidas.

De posse desses resultados, a nossa próxima pergunta foi: Será que as fibras musculares esqueléticas do EDL estão alteradas assim como os motoneurônios da medula lombar e as JNMs que inervam esse musculo? A próxima sessão de resultados trará a análise do EDL, bem como de outro músculo inervado pelo segmento lombar da medula, o músculo Sóleo.

Tabela 9: Resultados da análise das JNM do EDL dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP.

EDL - JNM	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística
Área pré-sináptica (μm^2)	553	448*	p<0.0001
Área pós-sináptica (μm^2)	557	450*	p<0.0001

Os dados representam a mediana dos valores. * Diferente em relação ao WT.

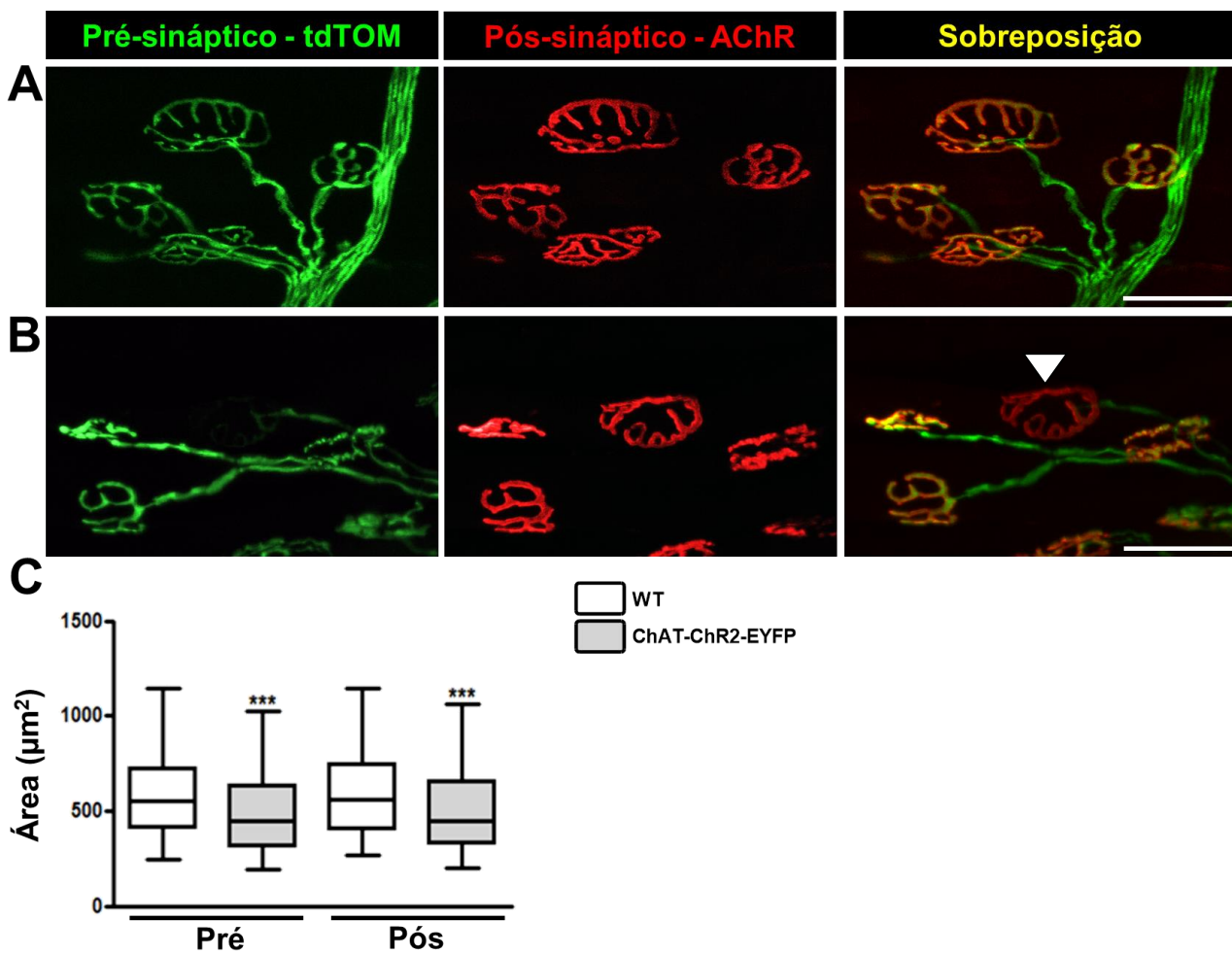


Figura 20. O músculo EDL dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP, apresentam JNM com redução de tamanho. **A.** Imagem representativa de JNMs do EDL dos animais WT evidenciando sobreposição homogênea entre os componentes pré (verde) e pós-sinápticos (AChRs – vermelho). Observe que todas JNMs apresentam completa sobreposição dos elementos, denotado pela cor amarela. **B.** De maneira contrária, as JNM dos animais ChAT-ChR2-EYFP apresentam-se menores em relação ao WT (A), sendo possível visualizar JNMs desnervadas apresentando apenas o componente pós-sináptico (vermelho – cabeça de seta). **C.** Quantificação da área dos elementos pré e pós-sinápticos indicando redução da mesma nos animais ChAT-ChR2-EYFP, em comparação ao WT. (***) $p < 0,0001$; Man-Whitney). Foram analisadas 243 JNMs para os animais WT e 255 para os animais ChAT-ChR2-EYFP. N= 5 WT e 6 ChAT-ChR2-EYFP. Os dados representam a mediana dos valores. Barra de escala: 50 μm .

4.7. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP exibem alterações morfológicas nas fibras musculares do EDL e Sóleo

A seguir, nós avaliamos as possíveis consequências dessa maior liberação de ACh, em músculos de contração rápida e lenta desses animais. Os músculos escolhidos, Sóleo e EDL como dito anteriormente, são músculos de contração lenta e rápida, respectivamente e são inervados por axônios motores derivados dos motoneurônios do segmento lombar da medula espinal. Dessa forma, nós avaliamos o peso dos animais, dos respectivos músculos, o número total de fibras, bem como mensuramos a área de secção transversal (CSA) das fibras musculares nesses músculos, além da avaliação do padrão de expressão das isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC)

Primeiramente nós mensuramos o peso corporal dos animais, de modo que constatamos uma redução de 8% no peso dos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação WT (FIGURA 21 e 22A e tabela 10). Em relação ao EDL, não observamos alterações na massa do músculo, bem como no número total de fibras entre os genótipos (FIGURA 21C e D e tabela 10). No entanto, quando avaliamos a área geral das fibras observamos uma redução de 15% na CSA das mesmas nos animais ChAT-ChR2-EYFP (FIGURA 21E e tabela 10). A fim de se analisar o impacto dessa atrofia em fibras específicas, nós avaliamos a CSA de cada tipo de fibra, de modo que encontramos redução nas fibras do tipo 2X e 2B, em torno de 17 e 12%, respectivamente. Surpreendentemente, as fibras do tipo 2A dos animais ChAT-ChR2-EYFP apresentavam hipertrofia (23%), em relação aos animais WT (FIGURA 21E e tabela 10). Em seguida, nós analisamos a distribuição dos diferentes tipos de fibras no EDL. Nossa análise demonstrou aumento de 13% na expressão da isoforma 2B e redução de 32% na expressão de 2X no EDL dos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao WT (FIGURA 21G e tabela 10). Aparentemente há um aumento do perfil glicolítico desse músculo, no entanto uma redução de 2X parece compensar o aumento de 2B.

Com relação ao músculo lento, Sóleo, constatamos uma redução de 16% no peso do mesmo nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP, em comparação ao WT (FIGURA 22C e tabela 10). O número total de fibras não foi diferente (FIGURA 22D e tabela 10). A análise da CSA geral das fibras evidencia redução de 8% nos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao WT (FIGURA 22E e tabela 10). Essa redução na CSA geral das fibras pode ser explicada pela atrofia das fibras do tipo 1, 2A e 2X nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP, além da observação que as fibras do tipo 2B, de maior tamanho, foram encontradas em maior quantidade no músculo dos animais WT (FIGURA 22F e tabela 10). A análise da proporção

dos diferentes tipos de fibras, não mostrou diferença entre os genótipos (FIGURA 22G e tabela 10).

Tabela 10: Resultados das análises dos músculos EDL e Sóleo.

EDL	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística (p<0.05)
Peso corporal (g)	29,2±2,7	26,8±2,2*	p=0,01
Peso do EDL (g)	0,012±0,002	0,011±0,0005	NS
Número total de fibras	923,3±168,9	906,3±114,4	NS
Área - mediana (µm²)	1650	1388*	p<0,0001 [#]
Tipo 2A - CSA (µm²)	576	711*	p<0,0001 [#]
Tipo 2X - CSA (µm²)	892	733*	p<0,0001 [#]
Tipo 2B - CSA (µm²)	1977	1731*	p<0,0001 [#]
% de tipo 2A	7,5±2,1	4,7±2,8	NS
% de tipo 2X	21,4±5,03	14,5±3,8*	p=0,04
% de tipo 2B	70,8±5,5	80,1±4,5*	p=0,01
Sóleo	WT	ChAT-ChR2-EYFP	Estatística (p<0.05)
Peso do Sóleo (g)	0,0108±0,001	0,009±0,0006*	p=0,0049
Número total de fibras	768,5±142,7	742,0±117,4	NS
Área - mediana (µm²)	1830	1686*	p<0,0001 [#]
Tipo 1 - CSA (µm²)	1857	1717*	p=0,0004 [#]
Tipo 2A - CSA (µm²)	1776	1667*	p=0,0012 [#]
Tipo 2X - CSA (µm²)	2149	1539*	p<0,0001 [#]
% de tipo 1	33,0±3,8	41,6±10,1	NS
% de tipo 2A	54,9±2,4	49,2±11,6	NS
% de tipo 2X	10,0±3,3	8,5±2,9	NS

Os valores expressam a média±SD ou a mediana. Estatística: Teste t-Student não pareado. Para as análises morfológicas do EDL, nós utilizamos 4 WT e 4 ChAT-ChR2-EYFP e para o Sóleo 5 animais para cada genótipo. Para a análise da CSA muscular do EDL, nós avaliamos um total de 2506 fibras: 211 para tipo 2A, 486 para 2X, e 1803 para 2B. Para o Sóleo, nós avaliamos um total de 1865 fibras, sendo 786 tipo 1, 913 tipo 2A e 166 tipo 2X. * Estatisticamente significativo em relação aos camundongos WT. # Teste de Mann-Whitney. NS: Não significativo.

Em conjunto, nossos resultados mostram que os animais ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações nos motoneurônios da medula espinal, nas JNM e nas fibras musculares. Nosso próximo objetivo foi verificar se as mudanças observadas até aqui, seriam suficientes para impactar significativamente a função muscular.

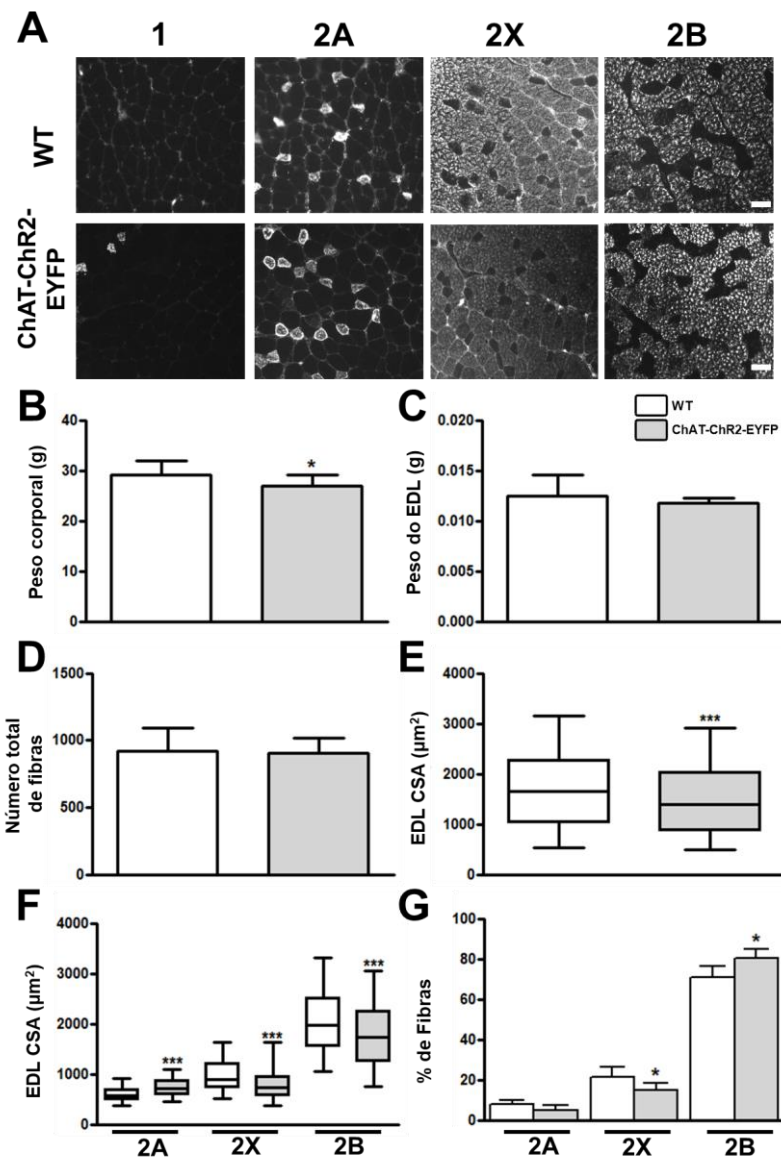


Figura 21. O músculo EDL apresenta alterações morfológicas e na expressão das isoformas da MyHC. **A.** Fotomicrografias de cortes congelados do músculo EDL provenientes dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP, marcados com os anticorpos contra as isoformas da MyHC. Barra de escala: 50 μm . **B.** Quantificação do peso corporal, evidenciando redução nos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao WT (* $p < 0,05$, Teste t-Student, $n = 15$ WT e 17 ChAT-ChR2-EYFP). **C.** A massa do músculo EDL não mostra diferenças entre os genótipos, assim como o número total de fibras do músculo (**D**). **E.** No entanto, a análise morfométrica das fibras evidencia uma redução na CSA do EDL nos animais ChAT-ChR2-EYFP (** $p < 0,0001$, Teste de Mann-Whitney, $n = 4$ animais). **F.** A análise da CSA de cada tipo de fibra mostra uma hipertrofia das fibras 2A, evidenciada pela imagem representativa, e atrofia das fibras 2X e 2B dos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao controle (** $p < 0,0001$, Teste de Mann-Whitney, $n = 4$). **G.** A quantificação dos tipos de fibras, evidencia um aumento na expressão das isoformas do tipo 2B e redução de 2X nos animais ChAT-ChR2-EYFP (* $p < 0,05$; Teste t-Student, $n = 5$ animais). Os dados representam a média \pm DP ou a mediana dos valores.

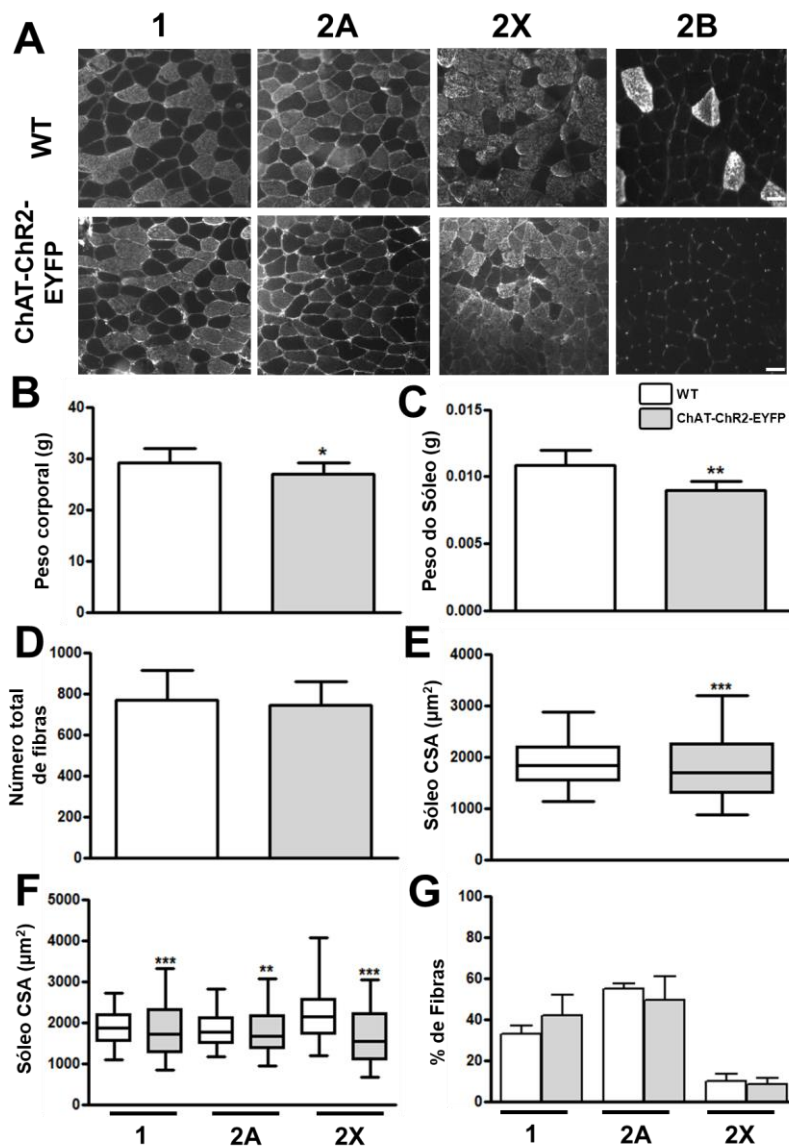


Figura 22. O músculo Sóleo apresenta alterações morfológicas nas fibras musculares dos animais ChAT-ChR2-EYFP. **A.** Fotomicrografias de cortes congelados do músculo Sóleo provenientes dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP, marcados com os anticorpos contra as isoformas da MyHC. Barra de escala: 50μm. **B.** Quantificação do peso corporal, evidenciando redução nos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao WT (*p<0,05, Teste t-Student, n=15 WT e 17 ChAT-ChR2-EYFP). **C.** A massa do músculo Sóleo apresenta-se reduzida nos animais ChAT-ChR2-EYFP, em relação ao controle (**p<0,05, Teste t-Student, n=7 WT e 6 ChAT-ChR2-EYFP). **D.** O número total de fibras não é alterado nos genótipos. **E.** A análise morfométrica das fibras evidencia uma redução na CSA do Sóleo nos animais ChAT-ChR2-EYFP (***p<0,0001, Teste de Mann-Whitney, n= 5 animais). **F.** A análise da CSA de cada tipo de fibra mostra atrofia de todos os tipos nos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação ao controle (** e ***p<0,05, Teste de Mann-Whitney, n=5). **G.** A quantificação dos tipos de fibras não mostra diferenças significativas entre os genótipos. Os dados representam a média ± DP ou a mediana dos valores.

4.8. O músculo Sóleo dos animais ChAT-ChR2-EYFP são menos resistentes à fadiga

Os músculos EDL e Sóleo foram coletados dos camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP, com o objetivo de se avaliar a resistência dos músculos à fadiga.

A análise da fadiga muscular do EDL não exibe alterações significativas entre os camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP, de modo que as alterações morfológicas vistas anteriormente, tanto nos neurônios motores, JNM e fibras musculares não foram suficientes para impactar a resistência desse músculo à fadiga (FIGURA 23A). No entanto, em relação ao Sóleo, os resultados demonstram que os músculos dos animais WT são mais resistentes à fadiga do que os músculos dos animais ChAT-ChR2-EYFP (FIGURA 23B). A partir de 4 minutos de estímulos tetânicos sucessivos, foi observado um maior decréscimo da amplitude das contrações musculares dos animais ChAT-ChR2-EYFP em relação aos WT.

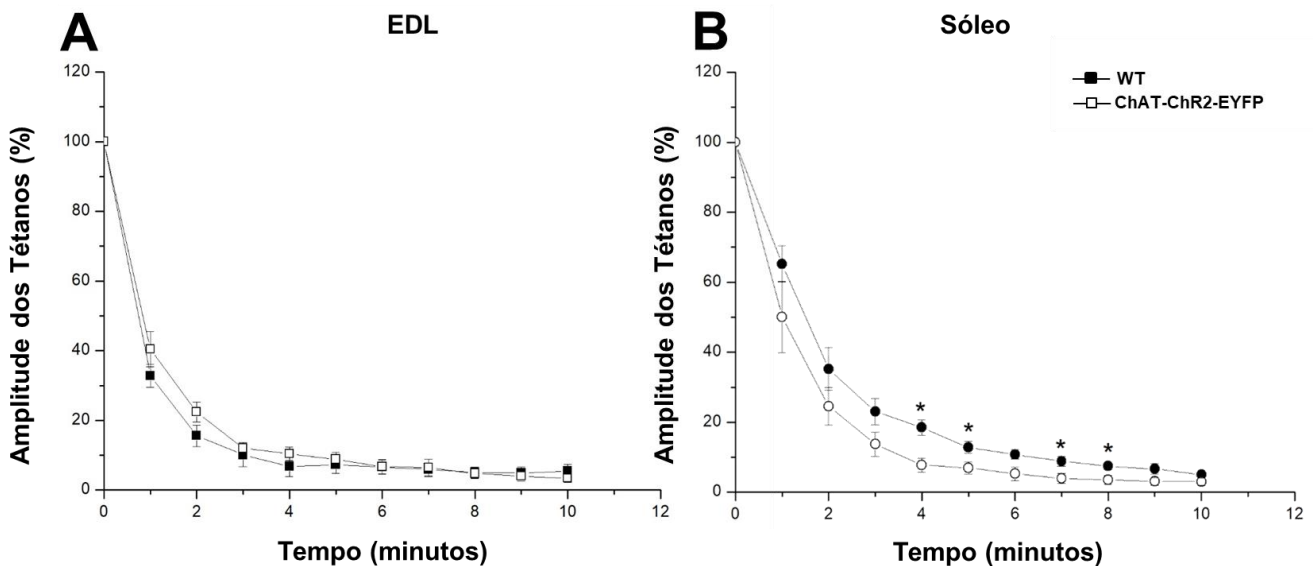


Figura 23. Teste de Fadiga do músculo EDL e Sóleo. Decurso temporal das amplitudes das contrações tetânicas (frequência de 100 Hz, duração de 500 ms, intervalo de 1500 ms) dos músculos EDL (A) de animais WT e ChAT-ChR2-EYFP e Sóleo (B). Não se observa diferenças na fadiga do EDL entre os genótipos, no entanto, o Sóleo dos animais ChAT-ChR2-EYFP, entram em fadiga mais rapidamente em relação ao WT. Os valores foram agrupados em média \pm E.P.M. *Representa os pontos de diferença entre a amplitude das contrações musculares dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP. N= 7 WT e 6 ChAT-ChR2-EYFP.

A seguir, nosso próximo objetivo foi verificar se as mudanças observadas até aqui, seriam suficientes para modificar significativamente a função motora e a resistência física dos animais. Dessa forma, os camundongos WT e ChAT-ChR2-EYFP passaram por uma série de testes de força muscular (força de grip e tempo para queda) e comportamento motor (campo aberto e rotarod), além de testes que avaliaram a resistência na esteira (teste de incremento máximo com medição do consumo basal e máximo de oxigênio).

4.9. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações no comportamento motor e na capacidade física

Nossos dados acerca do comportamento motor desses animais, mostram que os camundongos ChAT-ChR2-EYFP, com 3 meses de idade, apresentam aumento significativo da atividade locomotora, uma vez que a distância total percorrida no campo aberto foi 28% maior quando comparada aos animais WTs (Fig. 24B e tabela 11). Assim como a distância percorrida foi maior, a velocidade média exercida também foi significativamente superior aos controles, em torno de 29% (Fig. 24C e tabela 11). Houve também diferenças no desempenho dos animais ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses com relação aos de 18 meses, onde percebe-se uma redução desses parâmetros, provavelmente devido ao processo de envelhecimento (Fig. 24 B e C e tabela 11). No teste do tempo para a queda (wire hanging) não se evidenciou diferenças entre os genótipos em ambas as idades (Fig. 24D e tabela 11). As diferenças encontradas dizem respeito ao próprio processo de envelhecimentos dos animais WT e ChAT-ChR2-EYFP (Fig. 24D e tabela 11). A mensuração da força de agarre, que está diretamente relacionada à função muscular (grip force) não mostrou diferenças com relação aos genótipos e idades (Fig. 24E e tabela 11). Nesse conjunto de resultados, nós realizamos apenas o teste da esteira giratória (rotarod) nos animais de 18 meses, uma vez que Kolinisky et al (2013) realizaram esse teste com os animais adultos. Esses autores mostraram que, apesar de uma maior disponibilidade de ACh na fenda sináptica nesses animais, essa neurotransmissão colinérgica exacerbada é prejudicial para o aprendizado motor, visto que esses animais não conseguem se manter por mais tempo no aparato, quando comparado aos animais controles. Ao realizarmos esse teste nos animais de 18 meses, ficou constatado que de fato, os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam desempenho 56% pior que os animais WTs de mesma idade.

A tabela 11 apresenta os resultados encontrados para os testes comportamentais motores.

Tabela 11: Resultados das análises do comportamento motor.

Testes	WT-3M	ChAT-3M	WT-18M	ChAT-18M	Estatística
Número de rearings	123±51,4	167±47,3	87,5±42,9	153,6±76,1	NS
Distância percorrida (cm)	3584±704,9	4622±804,8 [#]	2822±796,7	3348±1075 ^{&}	p<0,05
Velocidade média (cm/s)	2,986±0,5	3,85±0,6 [#]	2,356±0,6	2,782±0,8 ^{&}	p<0,05
Tempo para queda (s)	55,3±4,1	47,2±11,3	29,9±11,2 [#]	33,3±15,6 ^{&}	p<0,05
Força de agarre (g/f)	31,0±2,6	30,9±8,3	29,6±8,6	28,7±5,2	NS
Tempo no rotatod (s)	-	-	91,7±40,5	40±27,3 [*]	p=0,03

Os dados representam a média±DP. # diferente de WT-3M; * diferente de WT-18M; & diferente de ChAT-ChR2-EYFP-3M. A comparação entre genótipos foi realizado pela aplicação do teste t-Student, não pareado, enquanto que a avaliação efeito idade foi comparada com o One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Em relação aos testes que avaliaram a capacidade física, nós identificamos que os camundongos ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses apresentam redução de 8% no peso corporal em relação aos WT (FIGURA 25A). Além disso, o trabalho realizado foi 28% menor (FIGURA 25G). Os animais ChAT-ChR2-EYFP de 18 meses apresentaram apenas um aumento no consumo máximo de oxigênio, em torno de 10%, o que pode sugerir que esse oxigênio extra consumido pelos animais ChAT-ChR2-EYFP pode ser um fator que possa levar a uma exaustação precoce, uma vez que estes consomem mais oxigênio para realizar o mesmo trabalho exercido pelos camundongos WT de mesma idade.

Em relação ao envelhecimento, é possível verificar reduções em vários parâmetros analisados, a saber: distância percorrida, velocidade máxima, tempo total e consumo máximo de oxigênio (FIGURA 25 e TABELA 12).

Tabela 12: Resultados das análises do teste de incremento máximo

Testes	WT-3M	ChAT-3M	WT-18M	ChAT-18M	Estatística
Peso corporal (g)	29,1±2,4	26,7±1,9 [#]	32,2±2,1	28,7±5,3	p< 0,05
Distância percorrida (cm)	52762±14818	46608±15501	27425±5063 [#]	27681±5620 ^{&}	p< 0,05
Velocidade máxima (cm/s)	35±3,5	33,1±4,1	24,4±2,0 [#]	24±2,1 ^{&}	p< 0,05
Tempo (min)	34,2±6,8	31,4±7,5	18,7±1,9 [#]	18,2±3,0 ^{&}	p< 0,05
VO ₂ Basal	21,3±4,7	21,4±5,3	16,8±4,6	17,7±3,9	NS
VO ₂ Máximo	40,4±3,0	39,5±3,5	30,3±2,0 [#]	33,6±1,4 ^{*&}	p< 0,05
Trabalho (J)	18±5,1	13,2±3,3 [#]	12,6±1,7 [#]	10,6±2,5	p< 0,05

Os dados representam a média±DP. # diferente de WT-3M; * diferente de WT-18M; & diferente de ChAT-ChR2-EYFP-3M. A comparação entre genótipos foi realizado pela aplicação do teste t-Student, não pareado, enquanto que a avaliação efeito idade foi comparada com o One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

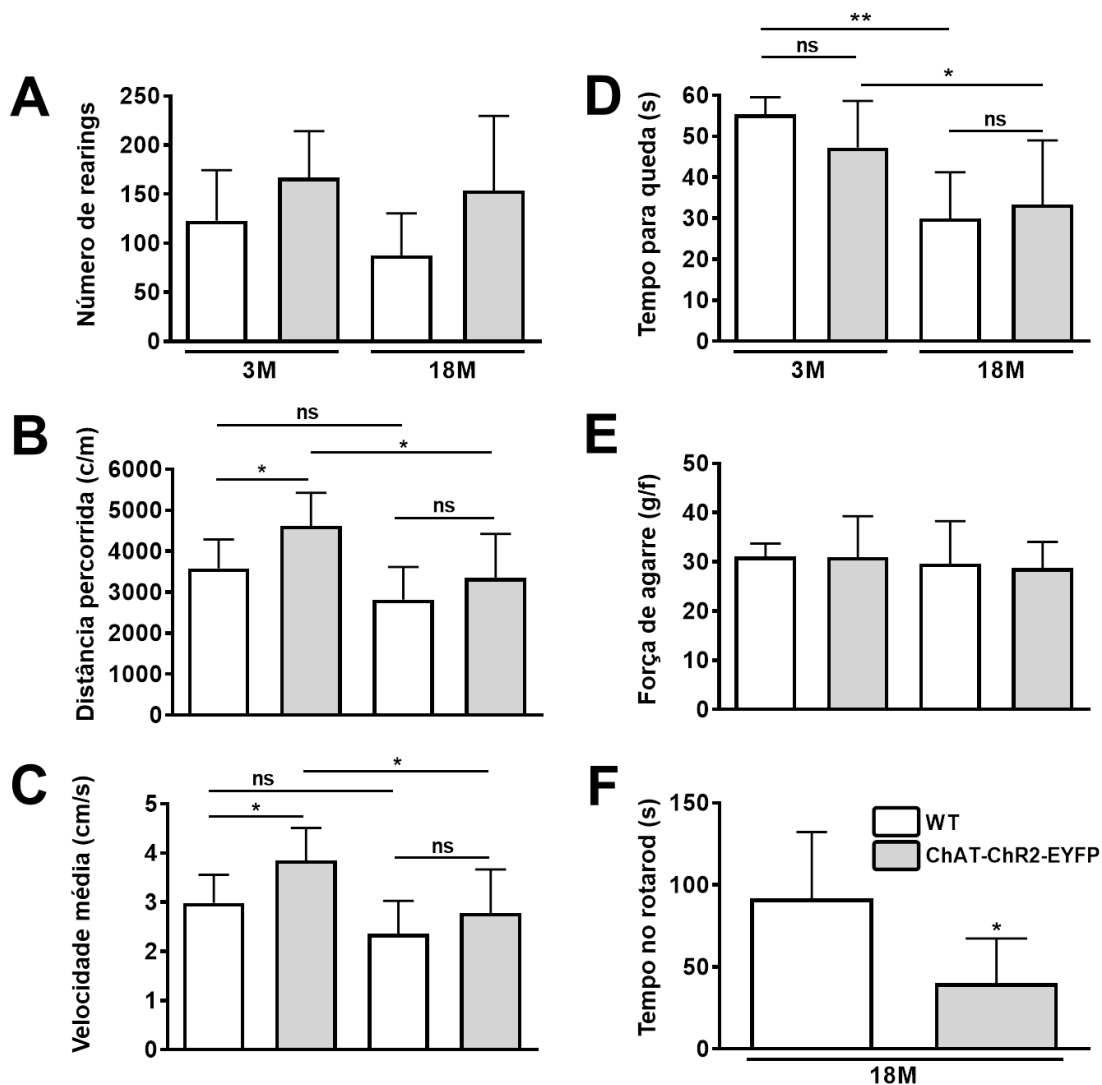


Figura 24. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam maior atividade locomotora aos 3 meses de idade e redução no aprendizado motor aos 18 meses. **A.** Quantificação do número de rearings (atividade exploratória). **B-C.** Distância total percorrida (**B**) e velocidade média (**C**) no open field. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses apresentam maior locomoção e velocidade média percorrida quando comparado aos WT's na mesma idade (* $p < 0,05$; One-way ANOVA, pós teste de Newman-Keuls). **D.** Tempo para queda (wire hanging). **E.** Força de agarre medida nas patas anteriores (grip force). **F.** Tempo no rotarod. Os animais ChAT-ChR2-EYFP de 18 meses apresentam redução significativa no aprendizado motor, uma vez resistem menos no rotarod, quando comparado aos controles de mesma idade (* $p < 0,05$; Teste t-Student). Os dados expressam a média \pm DP em um N= 5 a 7 animais por genótipo e idade. Para maiores detalhes, vide tabela 10.

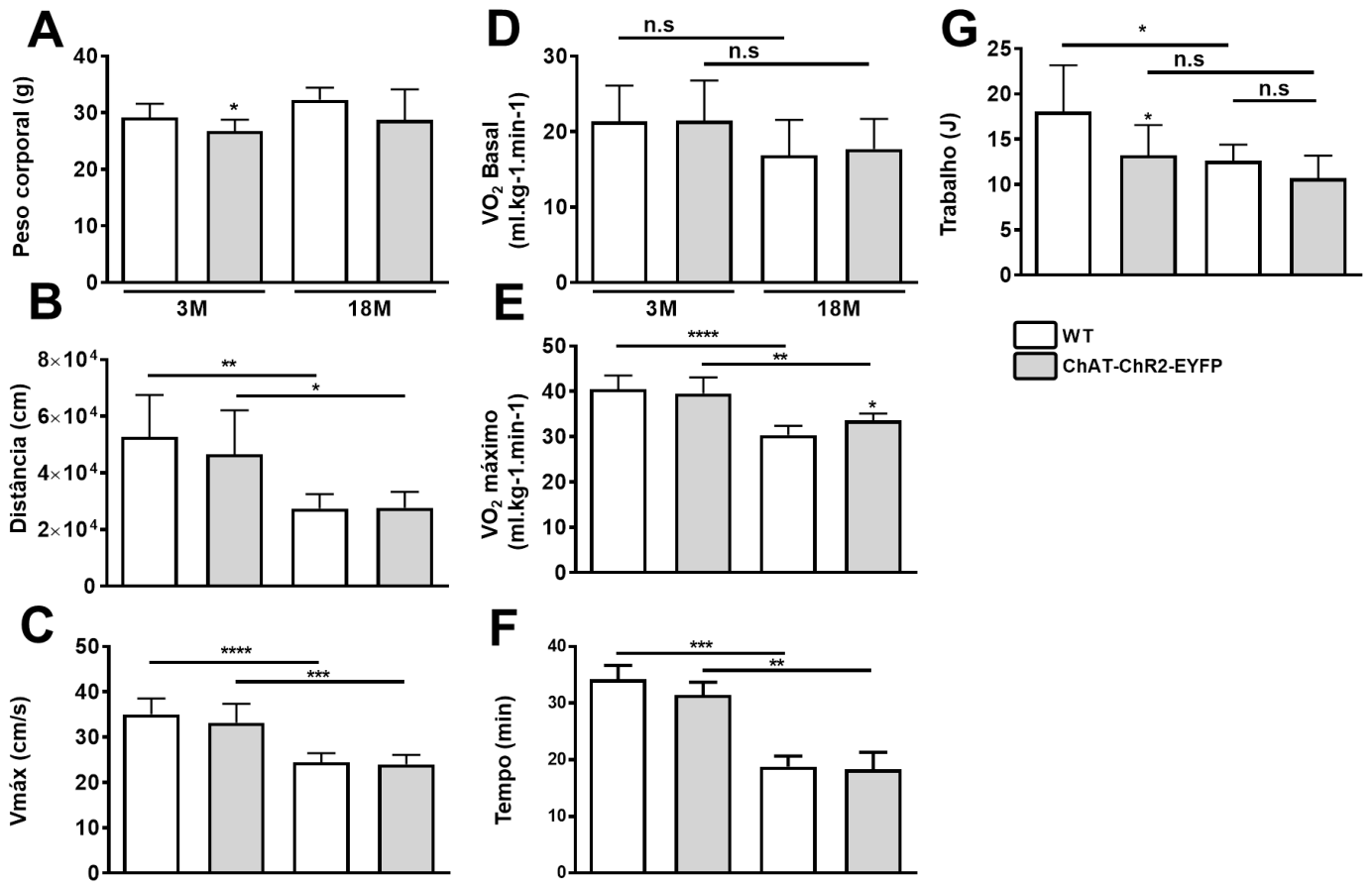


Figura 25. Os camundongos ChAT–ChR2–EYFP apresentam alterações no teste de incremento máximo (M.I.T). **A.** O peso corporal dos camundongos ChAT–ChR2–EYFP de 3 meses é significativamente menor em relação aos WT. Nenhuma alteração foi percebida nos camundongos de 18 meses. **B.** Distância total percorrida (m) na esteira durante o teste máximo. Diferenças significativas em relação à idade. **C.** Velocidade máxima atingida durante o teste, sendo que com o envelhecimento esse parâmetro é reduzido nos camundongos WT e ChAT–ChR2–EYFP. **D-E.** Consumo basal de oxigênio (E) e durante teste máximo (E). Esses dados mostram que os animais ChAT–ChR2–EYFP de 18 meses, diferentemente dos WTs, consomem mais oxigênio durante o teste (* $p < 0,05$; Teste t-Student). Durante teste máximo, camundongos WT e ChAT–ChR2–EYFP de 3 e 18 meses revelam diferenças decorrentes do envelhecimento. **F.** O tempo total gasto não foi diferente entre os genótipos, apenas entre as idades avaliadas. **G.** Cálculo do trabalho (Joules) realizado pelos camundongos WT e ChAT–ChR2–EYFP de 3 e 18 meses. Os animais de 3 meses apresentam redução do trabalho em comparação aos animais WT. Com relação à idade, se percebe o efeito do envelhecimento apenas nos animais WT. Os dados expressam a média \pm EP em um N= 8 a 11 animais para 3 meses e 5 a 7 para os animais de 18 meses. Para maiores detalhes, vide tabela 11.

A próxima subseção trará os resultados referentes às análises primariamente da musculatura estriada esquelética do modelo VAcHT KD^{HOM}, utilizado para o estudo de uma SMC pré-sináptica. Os resultados aqui apresentados compõem o artigo científico, intitulado: ‘Fast and slow-twitching muscles are differentially affected by reduced cholinergic transmission in mice deficient for VAcHT: A mouse model for congenital myasthenia’, relacionado a essa tese, publicado na *Neurochemistry International* (MAGALHÃES-GOMES, M. P., MOTTA-SANTOS, D., SCHETINO, L. P., ANDRADE, J. N., BASTOS, C. P., GUIMARÃES, D. A., ... & COIMBRA, 2018) (ANEXO 1).

Nesse artigo nós avaliamos os efeitos de uma redução na neurotransmissão colinérgica, no MEE de camundongos que apresentam um déficit na expressão do VAcHT. Inicialmente nós avaliamos o músculo Gastrocnêmio, seguido pelo EDL e Sóleo. Nós executamos análises morfológicas, quantificação das isoformas da MyHC e análise de genes específicos da musculatura esquelética e mitocondriais. Adicionalmente, avaliamos a ultraestrutura dos músculos EDL e Sóleo. Para verificar o impacto funcional da redução do VAcHT nesses animais, nós realizamos as análises da capacidade física pelo teste de incremento máximo.

4.10. Os camundongos VAcHT KD^{HOM} apresentam alterações morfológicas no músculo gastrocnêmio.

Nós primeiramente avaliamos os efeitos da redução na liberação de ACh apresentados pelos animais VAcHT KD^{HOM}, na morfologia do músculo gastrocnêmio, que é um complexo muscular composto pelo gastrocnêmio lateral, medial, músculo plantar e o sóleo. Esse músculo é de forma geral de contração rápida, no entanto é considerado um músculo misto por apresentar além de fibras rápidas, 2B e 2X, porcentagens consideráveis das isoformas rápidas, oxidativas-glicolíticas (2A) (BLOEMBERG; QUADRILATERO, 2012).

Dessa forma, ao analisarmos, identificamos uma redução na área das fibras dos animais VAcHT KD^{HOM} em relação ao WT (FIGURA 26B). É possível verificar no histograma de frequência de eventos x área das fibras, um deslocamento da curva à esquerda

(FIGURA 26C) e uma redução de 14% na área das fibras foi observada (FIGURA 26D).

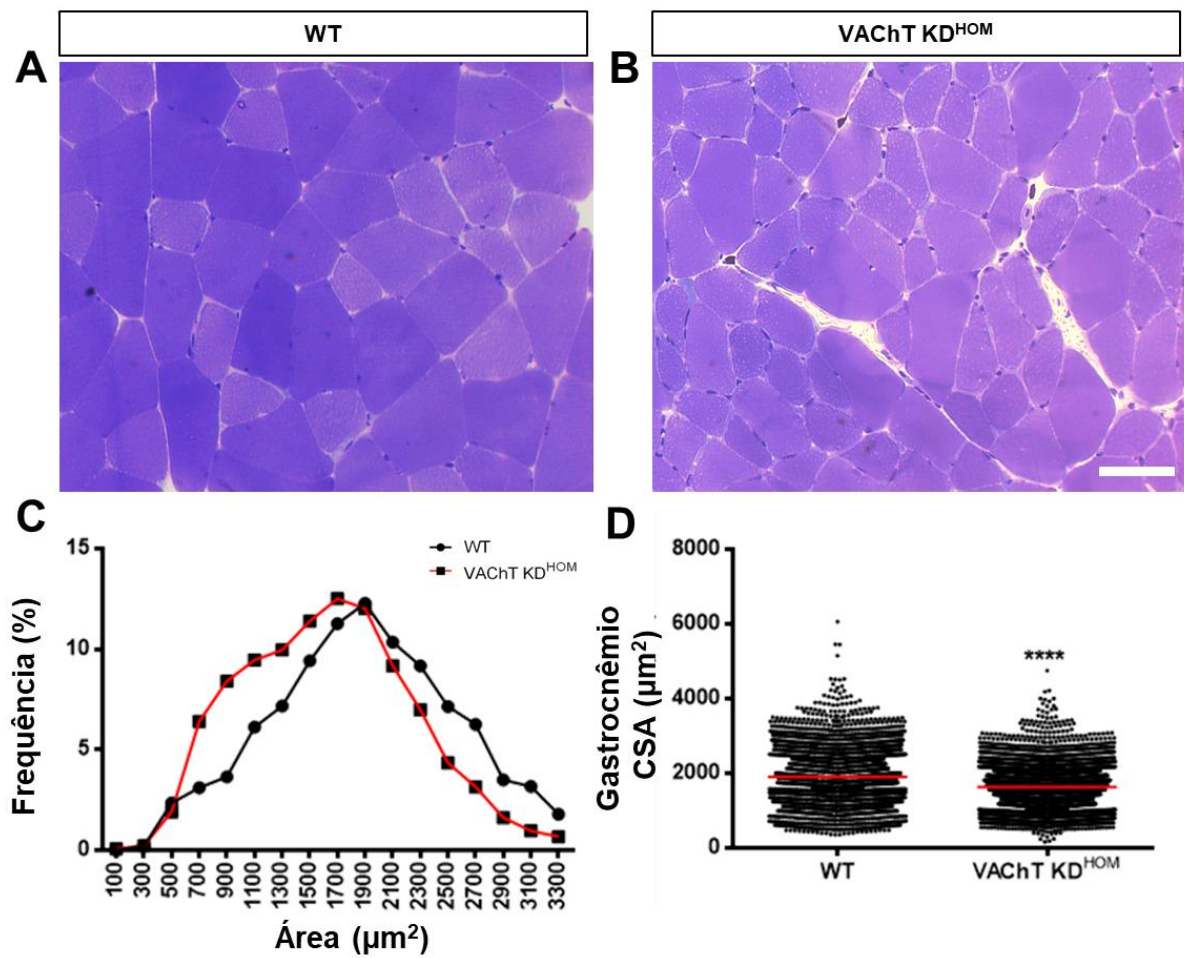


Figura 26. O músculo gastrocnêmio dos camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam fibras em atrofia A-B. Imagem representativa de corte transversal do gastrocnêmio do WT (A) e VACHT KD^{HOM} (B), corados com azul de toluidina. É possível identificar várias fibras de menor diâmetro no corte muscular dos camundongos VACHT KD^{HOM}, em comparação ao WT. Barra de escala: 50 µm. C. Histograma de frequência da CSA das fibras do gastrocnêmio dos animais WT e VACHT KD^{HOM}. É possível identificar um deslocamento da curva dos camundongos VACHT para a esquerda. D. A quantificação de várias fibras musculares, evidencia redução significativa da área nos animais VACHT KD^{HOM} (1638 µm²) em relação ao WT (1905 µm²). Nós analisamos uma secção transversal para cada animal e um total de 3152 fibras foi analisado para cada genótipo (****p < 0.0001 teste de Mann-Whitney, n = 3 animais por genótipo. Os resultados expressam a mediana da CSA).

4.11. Os camundongos VChT KD^{HOM} apresentam alterações morfológicas no músculo EDL associadas a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica.

O gastrocnêmio, um músculo rápido de fibras mistas, apresenta atrofia muscular nos animais VChT KD^{HOM} em comparação aos animais WT. Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar um músculo puro em fibras rápidas, para verificar o grau de comprometimento dessas fibras em relação às fibras lentas/oxidativas, uma vez que o gastrocnêmio apresenta uma pequena porcentagem de fibras oxidativas.

Para esse fim, nós escolhemos como músculo puro em fibras rápidas, o EDL, que apresenta em sua grande maioria fibras dos tipos 2X e 2B (BLOEMBERG; QUADRILATERO, 2012). Ao avaliarmos o EDL, dos camundongos VChT KD^{HOM}, percebemos claramente uma redução da área total do músculo em relação aos controles (FIGURA 27A). Ao realizarmos os cortes histológicos, constatamos também fibras musculares em possível processo atrofico, nesses animais (FIGURA 27B).

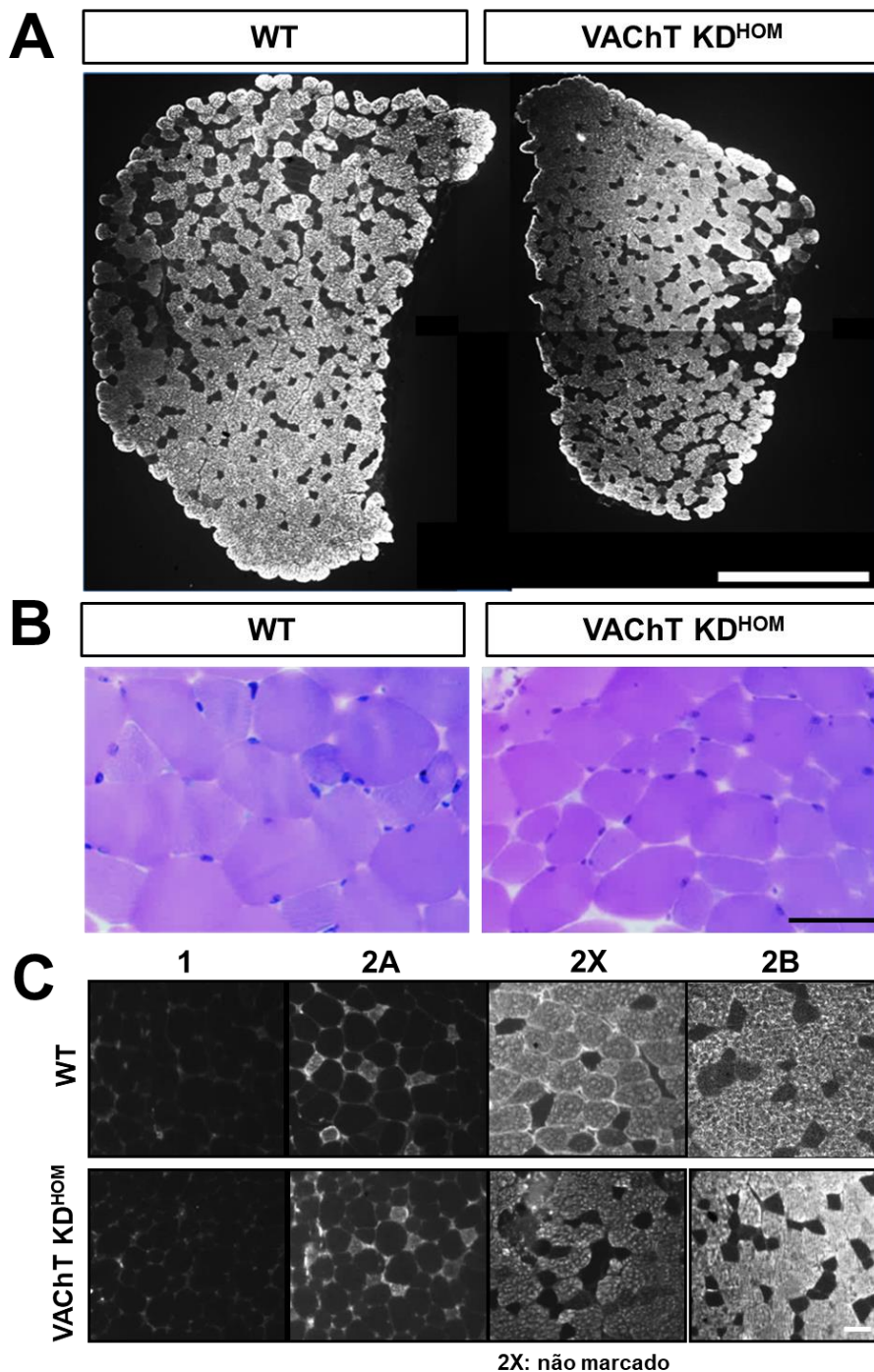


Figura 27. Imagens representativas da morfologia do músculo EDL e tipos de fibras musculares.
A. Imagem representativa da área de secção transversal total do músculo EDL de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} marcados com o anticorpo anti-isoforma 2B. É possível visualizar a área reduzida do músculo dos animais VACHT KD^{HOM} em relação ao WT. Barra de escala: 0,5 mm². **B.** Corte transversal do EDL evidenciando fibras em atrofia nos animais VACHT KD^{HOM}. Barra de escala: 50 µm. **C.** Imagens de cortes transversais do EDL de camundongos WT e VACHT KD^{HOM}, marcados com diferentes anticorpos contra as isoformas da MyHC. Barra de escala: 50 µm.

A seguir, nós quantificamos o que foi observado nas imagens e de fato, constatamos que a área total do EDL estava reduzida 21% em relação ao WT (FIGURA 28A e TABELA 13). Essa redução pôde ser explicada, uma vez que o músculo apresentava redução de 20% no número total de fibras e 16% na área média das mesmas (FIGURA 28B-D e TABELA 13). Para determinar especificamente, o grau de acometimento dos diferentes tipos de fibras, nós medimos a área de cada tipo muscular, e encontramos que todos os tipos de fibras do EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM}, estavam em atrofia, confirmando que a atrofia observada ocorria por redução da área nas fibras expressando as isoformas 2A, 2X e 2B (FIGURA 28E e TABELA 13).

Para verificar se a atrofia muscular vista nas fibras rápidas, estavam relacionadas a mudanças na expressão das isoformas da MyHC, nós quantificamos as imagens e identificamos redução de 10% na expressão da isoforma 2B nos animais VACHT KD^{HOM}, em comparação ao WT (FIGURA 28F e TABELA 13). Adicionalmente, possivelmente como um efeito compensatório, vimos um aumento de 30% na expressão da isoforma 2X nos camundongos VACHT KD^{HOM} (FIGURA 28F e TABELA 13). Assim, a redução na expressão de 2B pode também explicar a atrofia muscular nesses animais, uma vez que essa fibra é a que apresenta a maior área entre todas as fibras.

Para melhor compreender, a atrofia muscular observada no EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM}, nós analisamos por qPCR a expressão do RNA mensageiro de genes envolvidos na ativação do sistema ubiquitina-proteassoma, que como visto na introdução dessa tese, promove a degradação proteica. Para tanto, nós avaliamos as E3-ubiquitina ligases, Atrogina-1 e MuRF1. No entanto, de forma inesperada, nossos resultados mostraram que Atrogina-1 estava 55% reduzida no músculo EDL dos animais VACHT KD^{HOM}, em comparação ao WT, enquanto que os níveis de MuRF1 permaneceram inalterados (FIGURA 28G e TABELA 13). Nós também analisamos genes relevantes para a biogênese e manutenção muscular, a saber: Pax-7, Miogenina e MyOD. Alinhado à atrofia identificada, constatamos reduções significativas na expressão de MyOD e Miogenina no EDL dos animais VACHT KD^{HOM}, em relação ao WT (FIGURA 28G e TABELA 13). Os níveis de Pax-7 não estavam diferentes.

A seguir, nós avaliamos os níveis de dois genes relacionados à mitocôndria, importantes para o músculo esquelético. Assim, analisamos o PGC1- α , marcador clássico para a biogênese mitocondrial (YOON *et al.*, 2001), e MTND-1, um DNA mitocondrial que apresenta os genes associados ao complexo I da cadeia respiratória (MIMAKI *et al.*, 2012).

Nenhuma diferença foi visualizada na expressão de PGC1- α entre os genótipos, no entanto, MTDN-1 estava 36% reduzido nos animais VACHT KD^{HOM} em comparação ao WT, indicando um comprometimento mitocondrial.

Dessa forma, esse conjunto de resultados relacionados ao EDL, mostram que, de fato, esse músculo nos camundongos VACHT KD^{HOM}, é seriamente comprometido e que as fibras de contração rápida apresentam alto grau de sensibilidade à fatores indutores de atrofia, como a redução da atividade colinérgica, apresentada pelos animais VACHT KD^{HOM}.

Tabela 13: Resultados das análises do músculo EDL dos animais VACHT KD^{HOM}

EDL	WT	VACHT KD^{HOM}	Estatística (p<0.05)
Área total do músculo (mm²)	1.8±0.14	1.4±0.16*	p= 0.0016
Número total de fibras	979±167	778±60*	p= 0.0140
Área média (µm²)	1725±859.4	1443±717*	P< 0.0001#
Tipo 2A - CSA (µm²)	653±176.4	554±165*	P< 0.0001#
Tipo 2X - CSA (µm²)	863.1±346.2	714±275*	P< 0.0001#
Tipo 2B - CSA (µm²)	2148±672	1817±564*	P< 0.0001#
% de tipo 2A	5.6±1.6	8.4±2.7	NS
% de tipo 2X	16.3±3.3	24.6±2.7*	p= 0.0008
% de tipo 2B	74±5.8	66.6±5.1*	p= 0.04
Marcadores moleculares (2^AΔCT)	WT	VACHT KD^{HOM}	Estatística (p<0.05)
Atrogina-1	0.009±0.002	0.004±0.002*	p= 0.02
MuRF-1	0.013±0.003	0.011±0.005	NS
Pax-7	0.0004±0.00005	0.0003±0.00007	NS
MyoD	0.001±0.0004	0.0002±0.00007*	p= 0.0005
Miogenina	0.0004±0.00004	0.0002±0.00003*	p= 0.0003
PGC1-α	0.003±0.0003	0.002±0.0004	NS (p=0.06)
MTND1	4.9±1.3	3.14±0.9*	p= 0.047

Os valores expressam a média±SD. Estatística: Teste t-Student não pareado. Para as análises morfológicas, nós utilizamos 5 WT e 7 VACHT KD^{HOM}. Para a análise da CSA muscular, nós avaliamos um total de 2767 fibras: 316 para tipo 2A, 544 para 2X, e 1907 para 2B. A análise molecular foi realizada utilizando-se 3 WT e 6 VACHT KD^{HOM}. * Estatisticamente significativo em relação aos camundongos WT. # Teste de Mann-Whitney. NS: Não significativo.

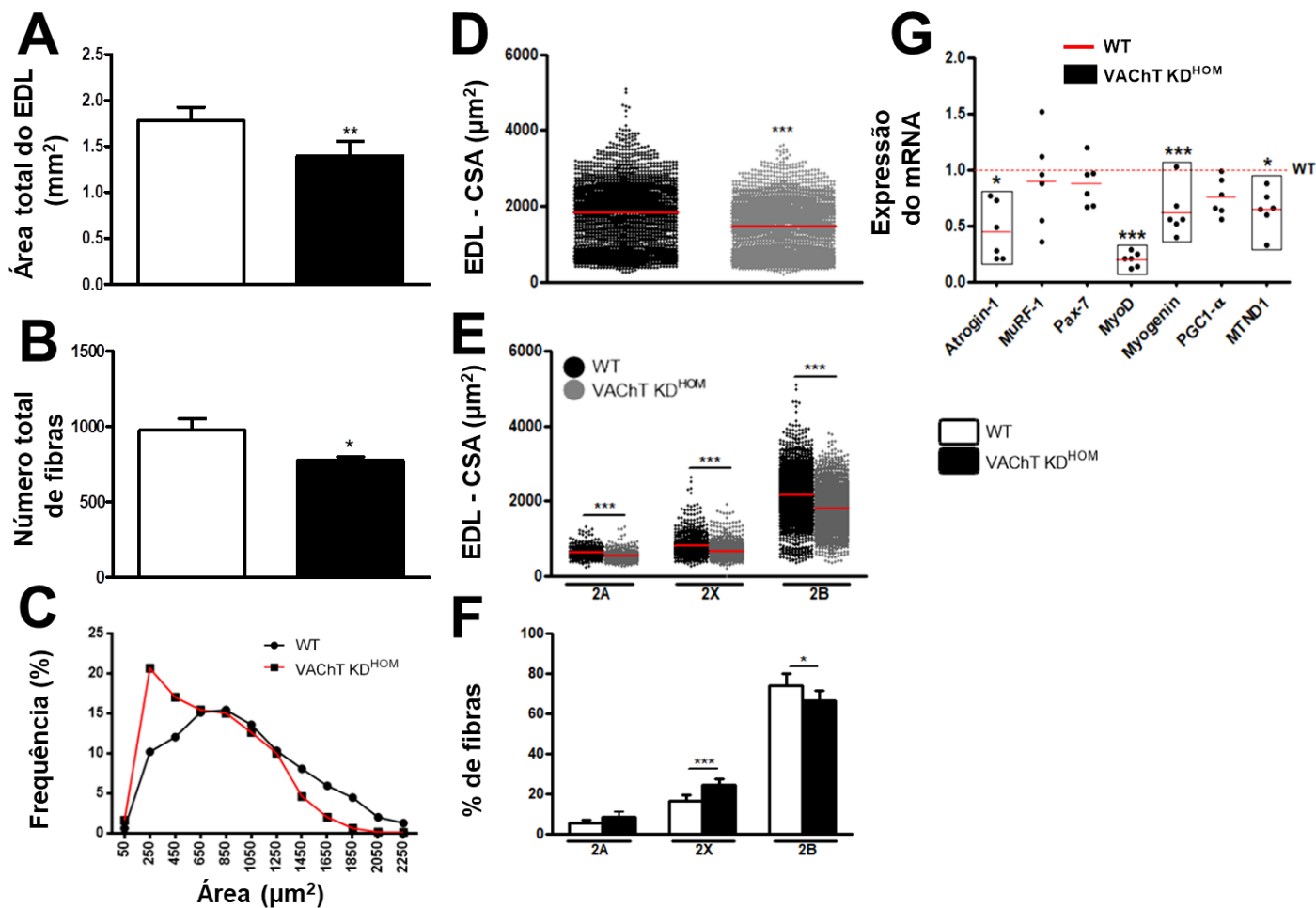


Figura 28. O músculo EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM}, apresenta atrofia muscular em fibras rápidas, associado a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica. **A.** Quantificação da área total do EDL, evidenciando redução significativa nos animais VACHT KD^{HOM} (**p = 0,0016 Teste t-Student, n = 5 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). **B.** O número total de fibras também está reduzido nesses animais (* p= 0.0014 Teste t-Student, n = 5 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). **C-D.** O músculo EDL apresenta atrofia muscular geral (***) p< 0.0001 Teste de Mann-Whitney test, n = 5 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). **E.** A atrofia generalizada é devido à redução da área de todos os tipos de fibras musculares (***) p < 0.0001 Teste de Mann-Whitney test, n = 5 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). **F.** Os camundongos VACHT KD^{HOM}, apresentam redução na expressão da isoforma 2B e aumento de 2X. **G.** A avaliação de genes de atrofia, evidencia redução de atrogina-1 (*p = 0.02), associado a regulação negativa de genes músculo-específicos, como MyoD (***) p = 0.0005) e Miogenina (***) p = 0.0003), bem como redução do DNA mitocondrial, MTND-1 (*p = 0.047) no EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM}, em relação ao WT.

4.12. Os camundongos VAcHt KD^{HOM} apresentam alterações morfológicas no músculo Sóleo associadas a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica.

Uma vez demonstrado que um músculo exclusivo de contração rápida, o EDL, se apresenta significativamente comprometido, nós avaliamos, em seguida, o impacto da redução da transmissão colinérgica em fibras de contração lenta. Dessa forma, nós escolhemos o Sóleo, por sua grande porcentagem de fibras lentas, 1 (oxidativas) e 2A (oxiativas-glicolíticas) (BLOEMBERG; QUADRILATERO, 2012) e por sua característica fisiológica principal, por se manter constantemente ativado para manter a postura corporal (DI GIULIO *et al.*, 2009).

As imagens representativas de secções transversais do Sóleo de camundongos WT e VAcHt KD^{HOM}, mostram que aparentemente, diferentemente do EDL, o Sóleo não apresenta redução global da área muscular total nos VAcHt KD^{HOM} (FIGURA 29A). No entanto, ao avaliar as imagens dos cortes histológicos, é possível visualizar uma leve hipertrofia das fibras musculares do Sóleo dos animais VAcHt KD^{HOM}, em comparação ao WT (FIGURA 29B). Pela marcação dos tipos de fibras, é possível identificar, além do aumento na área de fibras tipo 1 e 2A, um aparente aumento na presença de fibras tipo 1 positivas no Sóleo dos camundongos VAcHt KD^{HOM} (FIGURA 29C). Além disso, visualiza-se redução no número de fibras marcadas com o anticorpo contra a isoforma 2A nos animais VAcHt KD^{HOM} (FIGURA 29C).

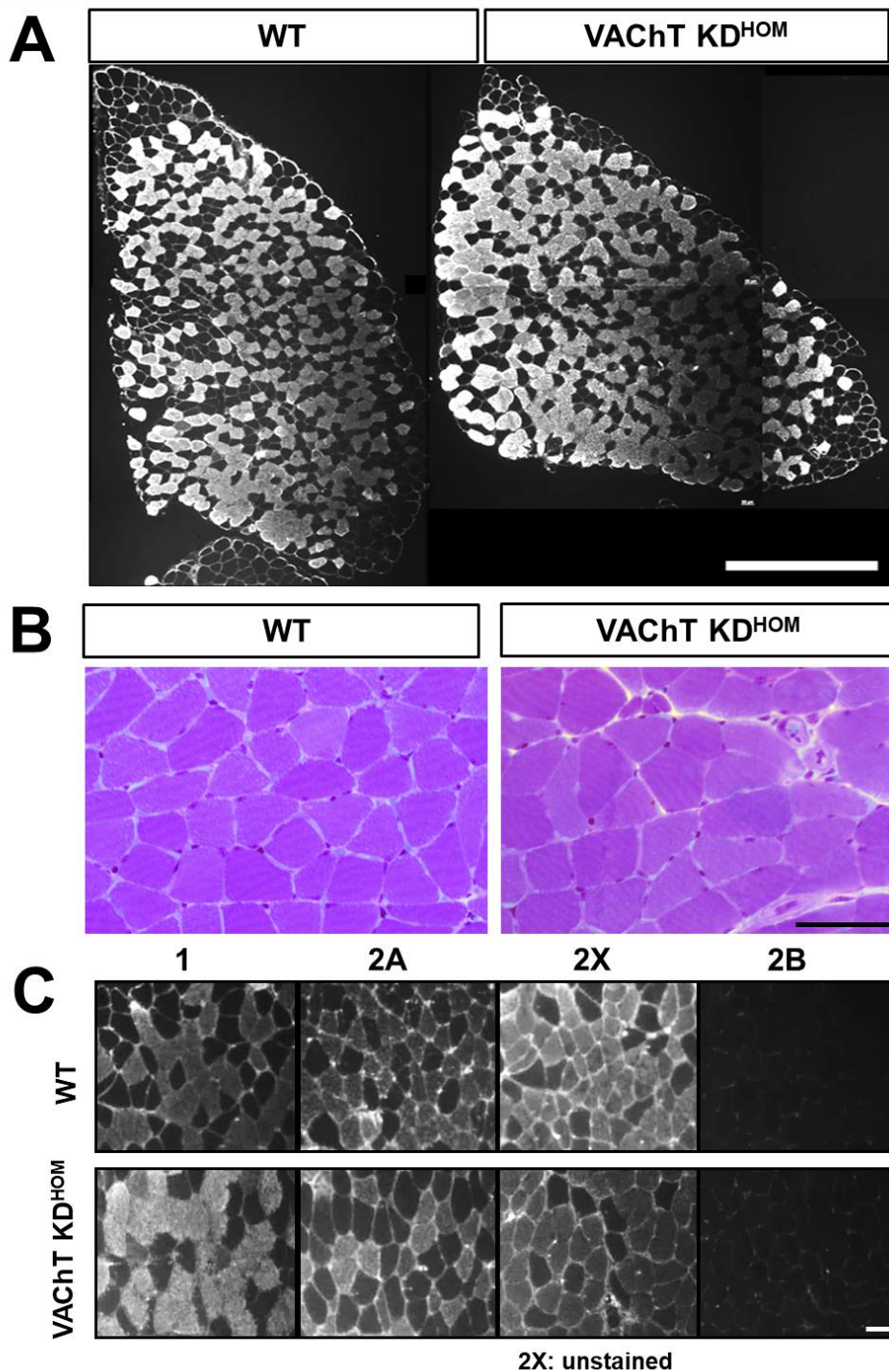


Figura 29. Imagens representativas da morfologia do músculo Sóleo e tipos de fibras musculares. **A.** Imagem representativa da área de secção transversal total do músculo Sóleo de camundongos WT e VACHT KD^{HOM} marcados com o anticorpo anti-isoforma 1. Visualmente, não se percebe diferenças na área total do músculo Sóleo entre os genótipos analisados. Barra de escala: 0,5 mm². **B.** Corte transversal do Sóleo, onde é possível observar fibras levemente hipertróficas. Barra de escala: 50 µm. **C.** Imagens de cortes transversais do Sóleo de camundongos WT e VACHT KD^{HOM}, marcados com diferentes anticorpos contra as isoformas da MyHC. Barra de escala: 50 µm.

Ao quantificarmos as imagens acima, nós confirmamos que a área muscular total do Sóleo não era diferente entre os genótipos analisados (FIGURA 30A e TABELA 14). No entanto, a análise do número total de fibras musculares, evidenciou uma redução de 15% nos camundongos VChT KD^{HOM}, em relação ao WT (FIGURA 30B e TABELA 14). Surpreendentemente, ao realizarmos a análise da área individual de cada fibra, encontramos uma hipertrofia de 12%, nas fibras dos animais VChT KD^{HOM} (FIGURA 30C-D e TABELA 14). Ao analisarmos a área de cada tipo de fibra muscular, constatamos um aumento de 8% e 18% na área das fibras tipo 1 e 2A, respectivamente (FIGURA 30E e TABELA 14).

Ao quantificarmos a proporção dos diferentes tipos de fibras, vimos que a razão de fibras tipo 1 em relação às fibras 2A, estava significativamente aumentada, indicando um aumento do perfil oxidativo do Sóleo nos camundongos VChT KD^{HOM} (FIGURA 30F e TABELA 14).

O impacto da redução do VChT também foi avaliado pelos níveis de expressão dos genes previamente analisados para o EDL. Dessa forma, de forma contrária, ao EDL, nós verificamos que a expressão dos genes de atrofia, Atrogina-1 e MuRF1, estava 41% e 24% maior nos animais VChT KD^{HOM}, em comparação ao controle (FIGURA 30G e TABELA 14). Esse resultado indica que a via de degradação proteica está ativada. Ademais, ao analisarmos os genes músculo-específicos, encontramos regulação positiva para Pax-7 (150%) e MyoD (75%), nos animais VChT KD^{HOM}, em relação ao WT (FIGURA 30G e TABELA 14). Esses dados podem ser associados a presença das fibras musculares em regeneração que identificamos nos cortes do Sóleo dos animais VChT KD^{HOM} (FIGURA 31B). Adicionalmente, os moduladores metabólicos, PGC1- α e MTND-1 estavam ambos aumentados em 114% e 55%, respectivamente, no Sóleo dos camundongos VChT KD^{HOM}. (FIGURA 30G e TABELA 14).

Nossos resultados, portanto, mostram que diferentemente de um músculo exclusivo de contração rápida que sofre impactos negativos pela redução da atividade colinérgica, o músculo Sóleo, de contração lenta, apresenta também uma série de alterações que com certeza são capazes de impactar a função do músculo, no entanto, as mudanças aqui observadas, aparentemente não são tão drásticas às observadas em músculos rápidos. Além disso, não podemos descartar a possibilidade de as alterações apresentadas pelo Sóleo, serem compensatórias por mudanças em músculos do complexo do gastrocnêmio, uma vez que a presença de fibras rápidas nesses músculos é considerável.

Tabela 14: Resultados das análises do músculo Sóleo dos animais VACHT KD^{HOM}

Sóleo	WT	VACHT KD ^{HOM}	Estatística (p<0.05)
Área total do músculo (mm ²)	1.45±0.3	1.5±0.3	NS
Número total de fibras	856.2±51	730.3±75*	p= 0.009
Área média (µm ²)	1541±461	1689±495*	P<0.0001 [#]
Tipo 1 - CSA (µm ²)	1677±453	1800±503*	P<0.0001 [#]
Tipo 2A - CSA (µm ²)	1350±327.3	1621±467*	P<0.0001 [#]
Tipo 2X - CSA (µm ²)	1655±544.2	1619±536	NS [#]
% de tipo 1	34.8±6.7	43.8±2.7*	p= 0.007
% de tipo 2A	54.1±6.1	46.5±4.9*	p= 0.03
% de tipo 2X	11.1±6.0	9.7±5.3	NS
Marcadores moleculares (2 ^{ΔACT})	WT	VACHT KD ^{HOM}	Estatística (p<0.05)
Atrogina-1	0.005±0.002	0.009±0.002*	p= 0.02
MuRF-1	0.01±0.003	0.02±0.003*	p= 0.02
Pax-7	0.0005±0.0002	0.001±0.0004*	p= 0.0008
MyoD	0.0002±0.00005	0.0004±0.00007*	p= 0.001
Miogenina	0.0008±0.0003	0.001±0.0003	NS [#]
PGC1-α	0.003±0.0003	0.002±0.0004*	p=0.004 [#]
MTND1	8.4±1.9	13.04±2.2*	p= 0.003

Os valores expressam a média±SD. Estatística: Teste t-Student não pareado. Para as análises morfológicas, nós utilizamos 6 WT e 7 VACHT KD^{HOM}. Para a análise da CSA muscular, nós avaliamos um total de 2835 fibras: 1104 para tipo 1, 1186 para 2A, e 397 para 2X. A análise molecular foi realizada utilizando-se 6 WT e 6 VACHT KD^{HOM}. * Estatisticamente significativo em relação aos camundongos WT. # Teste de Mann-Whitney. NS: Não significativo.

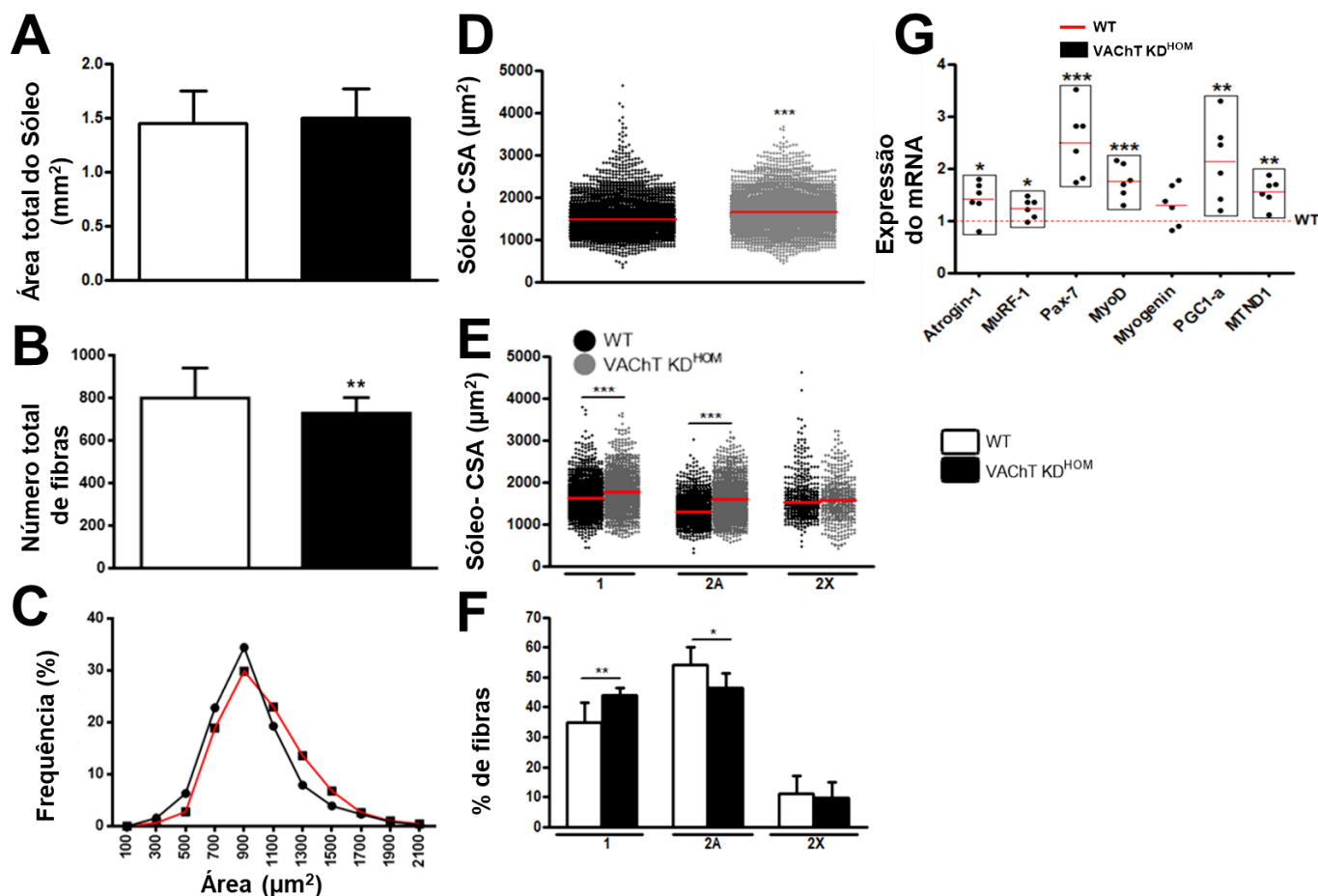


Figura 30. O músculo Sóleo dos camundongos VACHT KD^{HOM}, apresenta fibras lentas em hipertrofia, associado a mudanças nos tipos de fibras e expressão gênica. A. Quantificação da área total do Sóleo, onde não se visualiza alterações significativas na área total dos animais VACHT KD^{HOM}. B. No entanto, o número total de fibras também está reduzido nesses animais (** p= 0.009 Teste t-Student, n = 6 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). C-D. O músculo Sóleo apresenta hipertrofia muscular geral (**p < 0.0001 Teste de Mann-Whitney test, n = 6 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). E. A hipertrofia identificada ocorre pelo aumento da área dos tipos 1 e 2A (**p < 0.0001 Teste de Mann-Whitney test, n = 6 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). F. Os camundongos VACHT KD^{HOM}, apresentam aumento na expressão da isoforma lenta, 1 e redução da isoforma rápida-intermediária, 2A (**p = 0.007 e *p = 0.03 Teste t-Student, n = 6 WT e 7 VACHT KD^{HOM}). G. A avaliação de genes de atrofia, evidencia aumento de atrogina-1 e MuRF1 (*p = 0.02), associado a regulação positiva de genes músculo-específicos, como Pax-7 (**p= 0.0008) e MyoD, bem como aumento de PGC1-α (**p= 0.004) e do MTND-1 (**p = 0.003) no Sóleo dos camundongos VACHT KD^{HOM}, em relação ao WT.

4.13. O músculo EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam sinais degenerativos associados à atrofia muscular.

A seguir, para visualizar a atrofia muscular do EDL sob um diferente ângulo, nós realizamos experimentos de MET, para analisar a ultraestrutura das fibras musculares do EDL em busca de sinais degenerativos que pudessem indicar a atrofia do EDL dos animais VACHT KD^{HOM}. Nós também analisamos o músculo Sóleo dos animais WT e VACHT KD^{HOM}.

Como esperado, as fibras musculares do EDL dos animais WT apresentavam miofibrilas com aspectos normais, ou seja, discos Z (setas brancas – FIGURA 31A), tríades (cabeças de setas brancas- FIGURA 31B), mitocôndrias (cabeças de setas vermelhas- FIGURA 31B) e sarcômeros (asterisco vermelho- FIGURA 31B). Contrariamente, o EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM}, apresentava descontinuidade dos discos Z (setas brancas- FIGURA 31C) e ruptura dos miofilamentos e alguns sarcômeros (asterisco vermelho- FIGURA 31D). Essas miofibrilas também apresentavam túbulos-T anormais, que estavam mais alongados, e ausência de tríades típicas (cabeças de setas brancas- FIGURA 31D). O retículo sarcoplasmático (RS), também se apresentavam anormais, inchados e fora de lugar, com aspectos vacuolares (cabeças de setas amarelas- FIGURA 31D). Além disso, detectamos perfis de mitocôndrias alongadas, especialmente nas regiões onde a degradação de miofibrilas ocorreu (cabeças de setas vermelhas- FIGURA 31D).

Diferentemente do EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM}, o músculo Sóleo de ambos os genótipos, apresentam alinhamento e continuidade usual dos discos Z (setas brancas-FIGURA 31E-G) e sarcômeros normais (asterisco vermelho- FIGURA 31F-H). No entanto, a frequência de perfis mitocondriais parece estar maior nos VACHT KD^{HOM}, em relação ao WT (cabeça de seta vermelha- FIGURA 31G-H).

Dessa forma, fica evidente que a atrofia muscular identificada no EDL dos animais VACHT KD^{HOM}, no nível óptico, é confirmada pela ultraestrutura, uma vez que vimos claros sinais de degeneração miofibrilar.

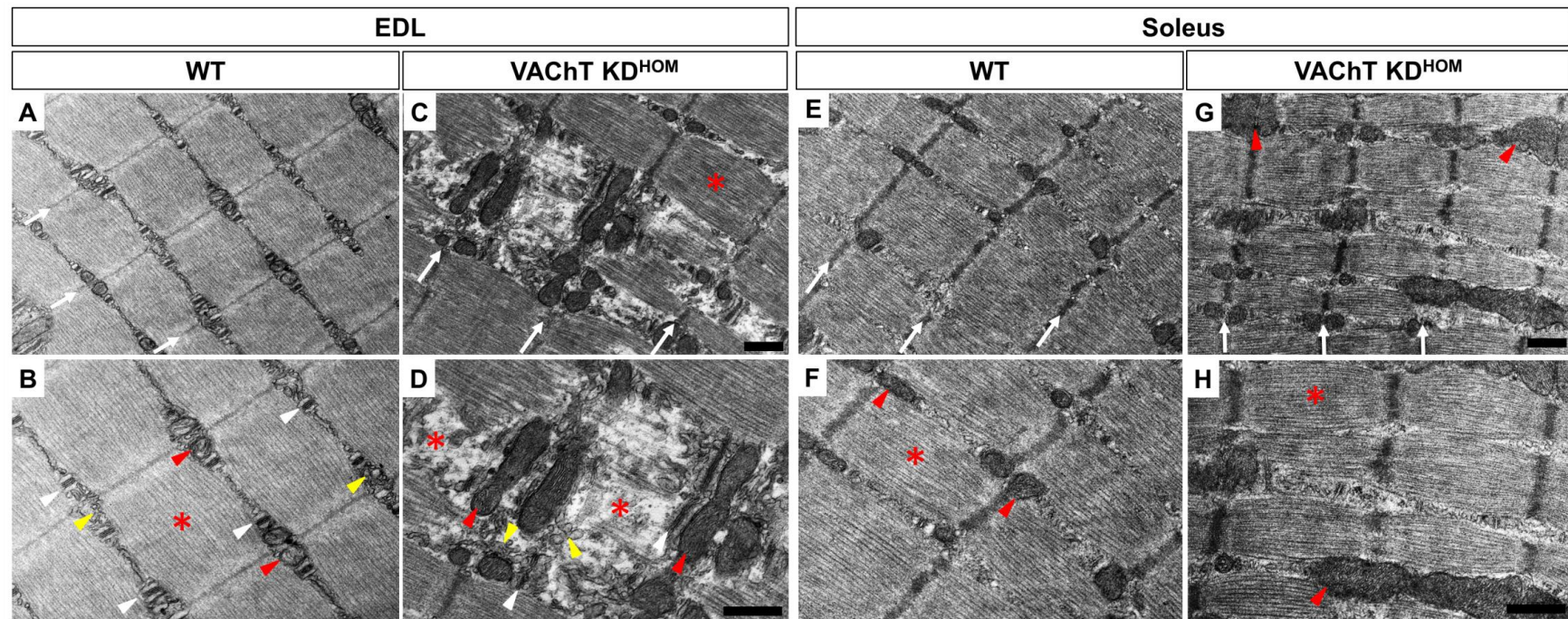


Figura 31. As miofibrilas do músculo EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM} exibem sinais degenerativos enquanto que o Sóleo está preservado. A- B. Imagens representativas de cortes longitudinais de miofibrilas do EDL e sóleo dos camundongos WT e VACHT KD^{HOM}. As imagens do painel superior e inferior foram adquiridas nos aumentos de 16,500x e 26,500x, respectivamente. **A.** Imagens representativas do EDL do WT mostrando os componentes típicos das fibras musculares, como alinhamento correto dos discos Z (setas brancas) (A), tríades normais (cabeças de setas brancas) (B), mitocôndrias de formato regular (cabeças de setas vermelhas) (B), RS normais entre as miofibrilas (cabeças de setas amarelas) e sarcômeros preservados (asteriscos vermelhos) (B). **C- D.** Imagens representativas do EDL dos camundongos VACHT KD^{HOM}, apontando ruptura das miofibrilas (asterisco vermelho) (D), Túbulos-T alongados (cabeças de setas brancas). Repare um sarcômero normal em C. **E – F.** Imagens representativas do Sóleo dos animais WT onde se observa miofibrilas preservadas. Alinhamento dos discos Z (E) (setas brancas), perfis de mitocôndrias normais (F) (cabeças de setas vermelhas), e sarcômeros regulares (F) (asterisco vermelho). **G – H.** Imagens do Sóleo dos camundongos VACHT KD^{HOM}, mostrando sarcômeros preservados (asterisco vermelho) (H). Os perfis de mitocôndrias no Sóleo dos animais VACHT KD^{HOM} são mais frequentes (H) (cabeças de setas vermelhas). Nós analisamos pelo menos 15 imagens de três animais para cada genótipo. Barra de escala = 500 nm.

4.14. Os camundongos VACHT KD^{HOM} apresentam redução da capacidade física

Considerando que o gastrocnêmio, sóleo e EDL são músculos do membro traieiro, essenciais para o movimento, nós realizamos em seguida, testes de avaliação da capacidade física e consumo de oxigênio nos animais WT e VACHT KD^{HOM}. O consumo de oxigênio basal e sob teste máximo foram avaliados utilizando o teste de incremento máximo. Nesse teste, nós avaliamos a duração, a distância percorrida, a velocidade máxima, o trabalho gasto e parâmetros relacionados ao manejo do oxigênio.

Nossos resultados mostraram que os camundongos VACHT KD^{HOM}, apresentavam redução significativa na duração e distância percorrida (60% e 74%, respectivamente), em relação ao WT (FIGURA 32B-C e TABELA 15). A velocidade máxima atingida foi 50% menor que a dos animais WT (FIGURA 32D e TABELA 15). Além disso, ao calcularmos o trabalho gasto, que leva em consideração, além da gravidade e seno de inclinação da esteira, o peso, o tempo e a velocidade, percebemos um comprometimento ainda maior, em torno de 84%, em comparação ao controle (FIGURA 32E e TABELA 15). Apesar dessas diferenças, o oxigênio consumido no basal e sob exercício máximo (FIGURA 32F-G e TABELA 15), não era diferente, o que é ainda mais surpreendente uma vez que os animais VACHT KD^{HOM} pesavam significativamente menos que os WTs (FIGURA 32A e TABELA 15).

Tabela 15: Resultados das análises do teste de incremento máximo dos animais VACHT KD^{HOM}

Testes	WT	VACHT KD ^{HOM}	Estatística
Peso corporal (g)	28,61±2,7	24,25±2,6	p = 0,03
Distância percorrida (m)	417,3±132,6	105,4±37,6*	p = 0,0004
Velocidade máxima (cm/s)	31,2±4,02	15,5±2,2*	p < 0,0001
Tempo (min)	26,8±4,4	10,6±2,4*	p < 0,0001
VO ₂ Basal	15,1±6,15	13,4±4,3	NS
VO ₂ Máximo	29,9±5,4	25,8±4,2	NS
Trabalho (J)	21,1±7,5	3,3±0,7*	p = 0,0003

Os valores expressam a média±SD. Estatística: Teste t-Student não pareado. * Estatisticamente significativo em relação aos camundongos WT. N = 5 WT e 6 VACHT KD^{HOM}.

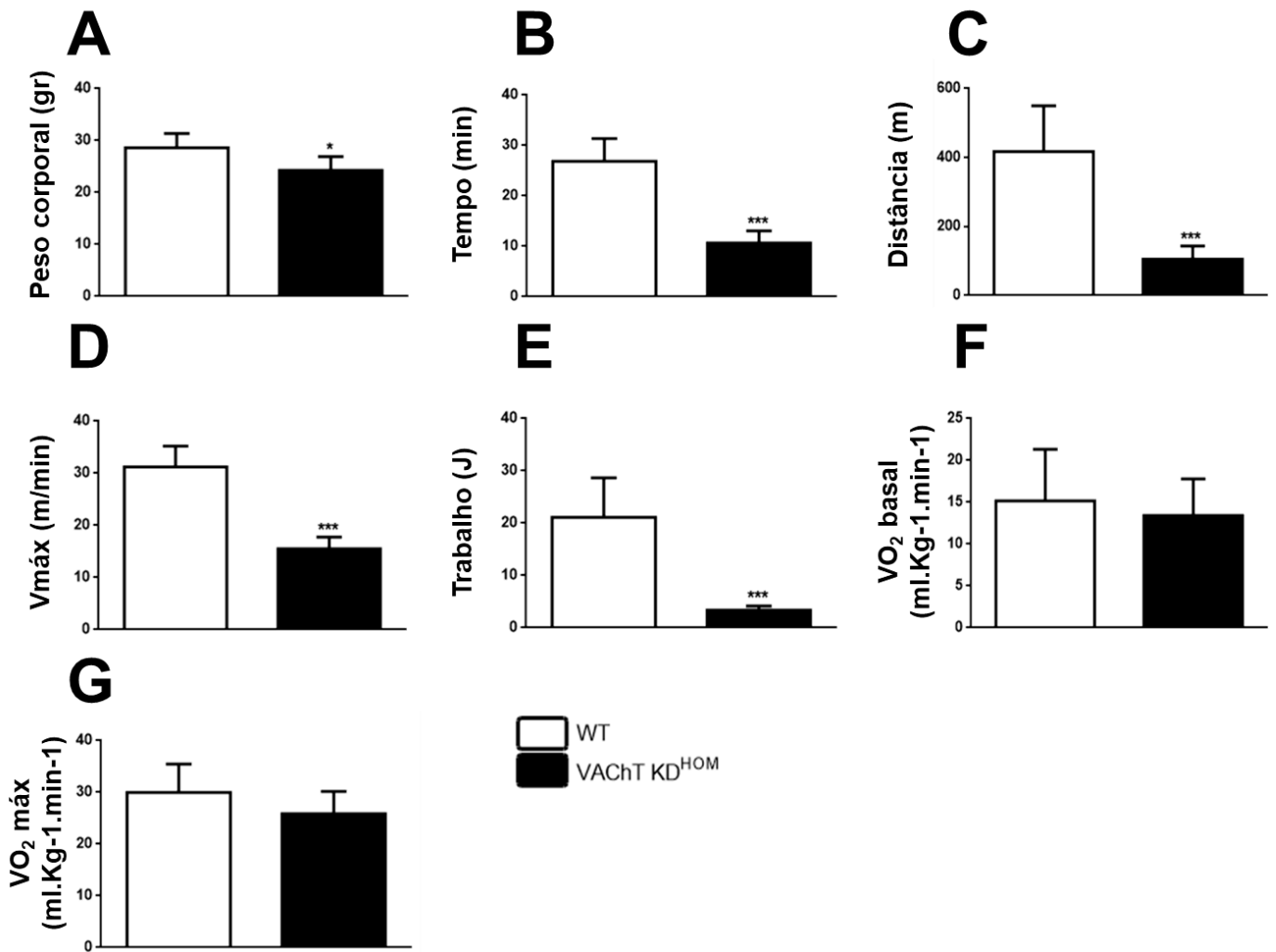


Figura 32. Os camundongos VACHT KD^{HOM} exibem comprometimento na capacidade física no TIM e falha no controle do consumo de oxigênio. A. O peso corporal dos camundongos VACHT KD^{HOM} é significativamente menor que do WT (* $p = 0.03$ Teste t-Student, $n = 5$ WT e 6 VACHT KD^{HOM}). B-E. Desempenho dos animais VACHT KD^{HOM} no TIM é significativamente menor nos parâmetros, duração (B) (** $p < 0.0001$), distância total (C) (** $p = 0.0004$) e velocidade máxima (D) (** $p < 0.0001$), em comparação aos WTs (Teste t-Student, $n = 5$ WT e 6 VACHT KD^{HOM}). E. A capacidade física (Trabalho-Joules) dos animais VACHT KD^{HOM} é drasticamente reduzida, em relação aos controles (** $p = 0.0003$). F-G. O consumo de oxigênio no repouso (F) e durante o teste máximo não é diferente entre os genótipos (G) (Teste t-Student, $n = 5$ WT e 6 VACHT KD^{HOM}, os resultados expressam a média \pm SD).

Diante ao exposto, nossos dados reforçam a hipótese de que a atividade colinérgica se mostra importante na manutenção da estrutura muscular, bem como a resposta ao déficit colinérgico compromete de forma diferente os músculos que expressam as diferentes isoformas da MyHC. Além disso, as alterações musculares, principalmente em músculos rápidos, são capazes de comprometer aspectos funcionais motores desses animais. No artigo, nós adicionalmente mostramos que o tratamento crônico com inibidores da AChE, é capaz de reverter parcialmente às alterações musculares observadas, bem como restaura parcialmente aspectos funcionais motores (vide artigo anexo).

5. DISCUSSÃO

5.1. Os camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentam alterações degenerativas em componentes das U.M

Neste trabalho nós utilizamos como modelo animal os camundongos ChAT-ChR2-EYFP, um modelo animal desenvolvido em 2011 com o objetivo de dissecar, utilizando a técnica de optogenética, os circuitos cerebrais, mais especificamente investigar a co-transmissão de ACh e glutamato em neurônios conhecidos como estritamente colinérgicos (ZHAO *et al.*, 2011). Para tanto, esses pesquisadores desenvolveram um camundongo em que a proteína ChR2, um canal iônico sensível à luz azul (470nm), foi colocada sob controle do promotor da ChAT, de modo que todas as células colinérgicas expressariam esse constructo, o qual foi em seguida introduzido em cromossomos artificiais bacterianos (BAC), e inseridos no genoma dos camundongos.

Uma característica importante desse modelo, é que inserido no locus do gene da ChAT, está também localizada a sequência completa de codificação do VAcHT, dessa maneira, o BAC contendo o gene da ChAT utilizado na geração desse modelo, também carrega o gene do VAcHT (KOLISNYK *et al.*, 2013). Ficou demonstrado que esse modelo apresentava expressão do RNAm do VAcHT 20x acima do fisiológico no estriado, quando comparado ao controle e os níveis da proteína estavam 550x e 350x maiores no hipocampo e tronco encefálico, respectivamente (KOLISNYK *et al.*, 2013). Em relação à medula espinal, nós mostramos que a expressão do RNAm do VAcHT está significativamente aumentada em relação ao controle (SUGITA *et al.*, 2016). Adicionalmente, a expressão proteica do VAcHT nas JNM estava aumentada mais de 3x em relação ao controle e a liberação espontânea de ACh, medida pela amplitude dos MEPPs, encontrava-se 65% maior em relação ao WT, evidenciando que a superexpressão do VAcHT aumentava a quantidade de ACh internalizada e liberada pelas VS nas JNM (SUGITA *et al.*, 2016). Além disso, a liberação de ACh também se mostrava significativamente maior em fatias de hipocampo marcadas com [³H] metilcolina, e expostas a solução despolarizante de KCl (KOLISNYK *et al.*, 2013).

Esse modelo animal, portanto, torna-se uma importante ferramenta para melhor compreender o sistema colinérgico, e para nós representou a possibilidade de se modular a neurotransmissão colinérgica, de fundamental importância para as funções centrais e periféricas, e que está comprometida de maneira importante, em doenças neurodegenerativas como a Alzheimer, ELA, AME e as SMCs. A nossa expectativa em torno desse modelo era

que esse tônus colinérgico aumentado se refletisse em melhores funções, principalmente motoras. Um resultado extremamente animador foi que o cruzamento dos animais ChAT-ChR2-EYFP com os animais heterozigotos VAcHT-KO, revelou o nascimento de animais viáveis e que atingiam a idade adulta, recuperando a letalidade pós natal dos camundongos knockouts para o VAcHT (DE CASTRO *et al.*, 2009; KOLISNYK *et al.*, 2013).

Dessa forma, funcionalmente, quais seriam os impactos neuromusculares e comportamentais desse elevado tônus colinérgico? Ficou demonstrado que os animais ChAT-ChR2-EYFP não apresentavam alterações da força muscular (Grip Force) (KOLISNYK *et al.*, 2013), o que nós confirmamos nesse trabalho, tanto para os animais de 3 e 18 meses de idade em relação ao controle (Figura 24E).

Modelos animais de hiperfunção colinérgica por superexpressão do gene do CHT, também não demonstram alterações de força muscular e resistência (wire hang) (HOLMSTRAND *et al.*, 2014; LUND *et al.*, 2010), semelhante ao demonstrado nessa tese em ambas as idades (Figura 24D). Entretanto, Sugita et al, (2016) mostram redução da força no teste do wire hanging para os camundongos ChAT-ChR2-EYFP de 13 meses.

No trabalho de Kolisnyk et al, (2013) foi mostrado que os animais ChAT-ChR2-EYFP apresentavam maior resistência física na esteira (distância percorrida) em velocidade contínua por longos períodos, quando comparado ao controle, o mesmo resultado encontrado por Holmstrand et al, (2014) (velocidade máxima) e Lund et al, (2010) (tempo na esteira) com os animais super-CHT. No entanto, nessa tese, nossos resultados para os animais ChAT-ChR2-EYFP de 3 e 18 meses não mostraram diferença no tempo, velocidade máxima e distância percorrida (Figura 25). Quando calculamos o trabalho realizado vimos que o mesmo estava reduzido para os animais ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses, mas sem alteração aos 18 meses, em relação ao WT. Esse resultado é intrigante, uma vez que o único parâmetro alterado que entra na fórmula para o cálculo do trabalho é o peso dos animais, que se mostrou diferente aos animais WT (Figura 25A). Kolisnyk et al, (2013) e Sugita et al, (2016), bem como Holmstrand et al, (2014) e Lund et al, (2010), não relatam diferenças no peso dos animais. É importante ressaltar que constatamos redução do mesmo em dois grupos diferentes de animais, utilizados em 2015 e 2017.

Com relação à atividade exploratória no ambiente do teste de campo aberto (open field) nós demonstramos aumento da distância percorrida e velocidade média pelos animais ChAT-ChR2-EYFP de 3 meses, sem alterações aos 18 meses (Figura 24 B e C). Esses resultados não foram diferentes em Kolisnyk et al, (2013), no entanto, incremento da

performance no open field foi demonstrado nos animais BAC-CHT (super-CHT) (HOLMSTRAND *et al.*, 2014). Em relação ao aprendizado motor medido através do teste de esteira giratória (rotarod) viu-se que os animais ChAT-ChR2-EYFP adultos, apesar do maior tônus colinérgico, apresentavam comprometida a sua performance no rotarod (KOLISNYK *et al.*, 2013). Nessa tese nós observamos o mesmo padrão nos animais de 18 meses (Figura 24F), o que não foi verificado em Sugita *et al.*, (2016).

Esse conjunto de dados funcionais sugere uma variabilidade entre os animais ChAT-ChR2-EYFP, de modo que reproduzir os mesmos resultados reportados por outros autores é um problema. É possível que o número de cópias do VChT inseridas no genoma apresente grande variabilidade o que poderia explicar resultados discordantes encontrados.

A seguir, nós avaliamos aspectos morfofuncionais das JNM do músculo diafragma, onde nós não identificamos alterações na exocitose de VS identificadas pela marcação com a sonda vital FM1-43. No entanto, a avaliação específica da endocitose com a variável fixável da sonda FM1-43, demonstrou redução significativa na fluorescência dos terminais motores dos animais ChAT-ChR2-EYFP marcados com essa sonda (Figura 15). A análise morfológica dessas JNM mostrou redução na área pré-sináptica, bem como na pós-sináptica marcadas com a α -BTX (Figura 15). Além disso, essas JNM apresentavam elevada fragmentação, um padrão encontrado em JNM em envelhecimento ou em doenças neurodegenerativas (VALDEZ *et al.*, 2012).

No trabalho de Sugita *et al.*, (2016), ficou demonstrado que os animais ChAT-ChR2-EYFP adultos exibiam JNM com alterações degenerativas (JNM fragmentadas, desnervadas e inervadas por mais de um ramo do axônio motor), que ocorreriam apenas em animais idosos. Nessa tese nós mostramos as JNM do músculo EDL, inervado por axônios motores da medula lombar, significativamente atrofiadas nesses animais em relação ao WT (Figura 20). O modelo de superexpressão do CHT, ao contrário, não demonstrou qualquer alteração nas JNM (LUND *et al.*, 2010).

Nosso próximo passo foi avaliar funcionalmente a neurotransmissão no músculo diafragma. Para esse fim, nós avaliamos a resposta contrátil do músculo por estímulo do nervo frênico quando exposto a concentrações crescentes de drogas (brometo de pancurônio) e soluções (magnésio) bloqueadoras da neurotransmissão muscular. Nossos resultados mostram comprometimento significativo da neurotransmissão dos camundongos ChAT-ChR2-EYFP em comparação ao WT (Figura 17), sugerindo redução da margem de segurança neuromuscular. O que poderia levar a esse comprometimento? É possível que uma redução na

expressão proteica dos AChRs na placa motora seja uma explicação plausível, embora não identificamos redução significativa na intensidade de fluorescência da α -BTX. Uma evidência que fala a favor dessa possibilidade reside no fato da ACh promover a dispersão dos AChRs induzindo modificações pós-translacionais que levarão à endocitose dos AChRs pelo músculo (ST JOHN; GORDON, 2001). Será importante a quantificação por western blot da expressão desses receptores no diafragma. O comprometimento da neurotransmissão nesses animais induzida pelo magnésio, sugere alterações pré-sinápticas, será que o número de vesículas está reduzido no terminal? O Magnésio compete com o cálcio, reduzindo a liberação pré-sináptica de ACh. Essa é uma importante pergunta que será respondida em breve ao fim das análises das micrografias eletrônicas das JNM.

Alterações funcionais do músculo diafragma foram observadas em um modelo animal que superexpressa a variante sináptica da AChE (AChE-S). Foi observado que o diafragma desses animais entrava rapidamente em fadiga quando o nervo frênico era estimulado, ou mesmo por estímulo direto ao músculo (FARCHI; SOREQ; HOCHNER, 2003).

Nesse trabalho nós avaliamos alguns aspectos morfofuncionais de componentes das U.M. O primeiro deles, os neurônios motores do tipo α (responsáveis pela inervação das fibras musculares extrafusais), da medula espinal lombar, estavam significativamente atrofiados nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP em comparação aos animais WT, bem como há uma aparente redução no número dessas células, no entanto sem significância estatística (Figura 19). Esse tipo de alteração ocorre em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Huntington (VALADÃO *et al.*, 2017) e aquelas relacionadas ao neurônio motor como ELA (ROWLAND; SHNEIDER, 2001; SHARMA *et al.*, 2016) e AME (LUNN; WANG, 2008b).

Por fim, ao avaliarmos o componente final das U.M, os músculos estriados esqueléticos do membro inferior, os quais são diretamente inervados por axônios derivados dos neurônios motores da medula lombar, os quais já se mostram atrofiados nos animais ChAT-ChR2-EYFP. Nossos resultados mostram que o músculo rápido, EDL apresentava atrofia geral das fibras de modo que as fibras 2X e 2B nos camundongos ChAT-ChR2-EYFP apresentavam-se reduzidas em área em comparação ao WT, no entanto as fibras do tipo 2A estavam significativamente maiores (Figura 21). Além disso, observamos maior expressão da isoforma rápida 2B e redução de 2X. Em relação ao músculo lento, Sóleo, constatamos redução significativa no peso do mesmo nos animais ChAT-ChR2-EYFP, sendo que esse resultado se correlaciona à redução na área das fibras desse músculo nos animais ChAT-ChR2-EYFP (Figura 22). No entanto, não houve alterações na expressão das isoformas da

MyHC entre os genótipos. Sugita et al, (2016), mostrou atrofia das fibras do músculo tibial anterior aos 19 meses de idade, no entanto nenhuma alteração nas isoformas da MyHC foi observada. No modelo de hiperfunção colinérgica derivado da superexpressão do CHT, não foram observadas diferenças em relação à morfologia das fibras musculares, nem aos tipos de fibras (LUND *et al.*, 2010). Entretanto, nos animais que superexpressam a AChE, foi observado atrofia das fibras musculares do diafragma, refletida na desorganização miofibrilar e inchaço mitocondrial visualizado na MET (ANDRES *et al.*, 1997).

Uma vez que o EDL e Sóleo apresentam atrofia das fibras, e o sóleo, adicionalmente apresentava redução do peso do músculo, nós nos perguntamos se os mesmo estariam funcionalmente comprometidos. Dessa forma, nós realizamos testes de fadiga para responder essa pergunta. Nossos dados demonstram que apesar das alterações morfológicas apresentadas, as mesmas não foram capazes de provocar alterações na resistência à fadiga induzida por contrações tetânicas no músculo EDL, no entanto, a redução no peso do sóleo, associada à atrofia de suas fibras, resultam em um músculo menos resistente à fadiga em relação ao WT (Figura 23).

Dessa forma, o conjunto de resultados relacionados aos animais ChAT-ChR2-EYFP, indicam que a expressão aumentada do VAcHT, induzida pela inserção do constructo no genoma dos camundongos, não promove efeitos benéficos para o animal, de modo que a atividade colinérgica acima do fisiológico, parece exercer efeitos deletérios em componentes das U.M interferindo também em aspectos funcionais dos animais. Além disso, o cruzamento desses animais com o modelo para o estudo da ELA, os camundongos SOD1G93A, resultou em animais com piora dos sintomas motores, aumento da desnervação e por fim redução da sobrevivência geral (SUGITA *et al.*, 2016).

5.2. Os camundongos VAcHT KD^{HOM}, modelo de estudo para uma SMC exibem alterações em músculos de contração rápida e lenta

A maioria dos casos de SMC estão relacionados a mutações em proteínas pós-sinápticas, de modo que os diagnósticos de SMCs por mutações pré-sinápticas são raros, e até o momento restringiam-se às proteínas, SNAP25B (SHEN *et al.*, 2014), Sinaptotagmina-2 (HERRMANN *et al.*, 2014), Sinaptobrevina-1 (SHEN *et al.*, 2017), MUNC13-1 (ENGEL *et al.*, 2016), ChaAT (BYRING *et al.*, 2002; OHNO *et al.*, 2001) e CHT-1 (BAUCHÉ *et al.*, 2016). Entretanto, publicações recentes revelaram os primeiros indivíduos com diagnóstico de miastenia congênita ocasionada por mutações no gene do VAcHT (ARAN *et al.*, 2017;

O'GRADY *et al.*, 2016; SCHWARTZ *et al.*, 2018). Utilizando os camundongos VAcHT (VAcHT KD^{HOM} e VAcHT-Knockout), como modelos para o estudo das SMCs, nosso grupo demonstrou alterações motoras (PRADO *et al.*, 2006), cardíacas (LARA *et al.*, 2010) e sinápticas (LIMA *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2013), que se assemelhavam a características apresentadas pelos pacientes com mutações no VAcHT. Entretanto, até o momento, não estava claro quais seriam os impactos dessa redução a longo prazo na atividade colinérgica ocasionada por deficiência na expressão do VAcHT, na estrutura e função dos músculos esqueléticos. Dessa forma, nessa parte da tese, nós investigamos as consequências de uma redução na liberação de ACh no músculo de contração rápida do EDL e no músculo lento, Sóleo.

Nossos resultados mostraram que as fibras musculares do gastrocnêmio, em relação ao WT estavam atrofiadas, de modo que resultados similares foram reportados em outros modelos animais, como o camundongo deficiente para a agrina (BOGDANIK; BURGESS, 2011) ou em doenças do neurônio motor, como a ELA (DOBROWOLNY *et al.*, 2008; HARANDI *et al.*, 2014). Assim, a redução de ACh nesses animais resulta na atrofia das fibras desse músculo. No entanto, uma vez que não realizamos a tipagem de fibras nesse músculo, não podemos determinar se essa atrofia acomete de igual maneira as fibras rápidas e lentas.

Entretanto, é importante mencionar que diferentes modelos animais para doenças neuromusculares apresentam maior susceptibilidade à atrofia em fibras de contração rápida, do que em lentas (BIRAL *et al.*, 1989; HARANDI *et al.*, 2014; WANG; PESSIN, 2013). Além disso, a desnervação ou o bloqueio nervoso por tetrodotoxina (TTX) resulta na atrofia de fibras rápidas em músculos mistos, como o diafragma e gastrocnêmio (ARAVAMUDAN *et al.*, 2006; ZHAN; SIECK, 1992). Aqui, nós mostramos o músculo rápido EDL dos animais VAcHT KD^{HOM} apresentava atrofia de todos os tipos de fibras (2B, 2X e 2A), em comparação aos camundongos WT. Os dados de MET corroboram essa atrofia detectada na microscopia óptica, uma vez que encontramos grandes áreas com miofibrilas degradadas nos animais VAcHT KD^{HOM}.

A atrofia nas fibras musculares, associada à redução do número total de fibras, representou uma redução na área muscular total do EDL nos camundongos VAcHT KD^{HOM}. Além disso, nós constatamos redução na expressão da isoforma 2B, acompanhada por um aumento de 2X, provavelmente para compensar a perda e atrofia das fibras 2B, em maior quantidade nesse músculo. Esse padrão de alteração nos tipos de fibras foi observado in músculos rápidos sob envelhecimento (LARSSON *et al.*, 1993; LARSSON; ANSVED,

1995). Assim, a transmissão colinérgica mediada pelo VAcHT se mostra importante para a manutenção do tamanho e quantidade de fibras no EDL.

Em relação às análises moleculares, de maneira inesperada, nós vimos que o músculo atrofico EDL dos animais VAcHT KD^{HOM}, apresentavam o gene da atrogina-1 negativamente regulado e nenhuma alteração com MuRF-1, em um momento que esperava-se um aumento dos mesmos, uma vez que estes são ativados na atrofia. Dessa forma, a nossa hipótese para explicar esse fato é que a ativação positiva dessa via provavelmente ocorreu em um estágio precoce do desenvolvimento animal, quando a atrofia ocorreu de maneira mais expressiva, e nesse momento do desenvolvimento, a via se mantém inibida na tentativa de prevenir maior perda muscular. Além disso, é possível que outros mecanismos ainda desconhecidos possam atuar na manutenção do tamanho das fibras musculares rápidas, e que a ACh possa de alguma maneira regular a expressão desses genes. Dessa forma, abrem-se novas frentes de investigação para testar essas hipóteses.

As análises do padrão de expressão dos genes pró-miogênicos, não mostraram diferenças na expressão de Pax-7, no entanto, constatamos redução de MyoD e miogenina no EDL dos camundongos VAcHT KD^{HOM}, indicando que juntamente com a atrofia das fibras rápidas, o EDL mostrou comprometida a sua capacidade regenerativa. A literatura mostra que miogenina e MyoD são fatores de transcrição conhecidos por regular a expressão das ubiquitinas ligases E3, atrogina-1 e MuRF1, que participam da via proteolítica resultando em uma atrofia muscular neurogênica (BONALDO; SANDRI, 2013; HYATT *et al.*, 2003; MORESI *et al.*, 2010). Camundongos knockout para a miogenina são protegidos contra a perda muscular causada pela desnervação (MORESI *et al.*, 2010). A redução de miogenina, MyoD e atrogina-1 no EDL dos camundongos VAcHT KD^{HOM} sugere mais um vez que a via molecular para atrofia está inibida nesse músculo, ao menos na idade aqui avaliada. Entretanto, nós não podemos excluir a possibilidade dessas vias estarem positivamente reguladas mais cedo no desenvolvimento do animal. Nossos dados ainda suportam um papel duplo para esses fatores pró-miogênicos, que podem atuar tanto na diferenciação muscular, quanto em vias de degradação proteica (HYATT *et al.*, 2003; MORESI *et al.*, 2010). Como conclusão, esses achados indicam que o comprometimento na determinação miogênica, diferenciação e fusão impactam negativamente a manutenção das fibras musculares do EDL nos camundongos VAcHT KD^{HOM}.

Diferentemente do EDL, nós observamos que as fibras musculares do Sóleo estavam hipertrofiadas, um achado inesperado para um modelo de redução de atividade. Essa

hipertrofia provavelmente ocorreu, pela atrofia do gastrocnêmio, uma vez que o Sóleo é parte desse complexo muscular. Possivelmente, uma vez que o gastrocnêmio estava sob atrofia, a carga muscular sobre o Sóleo foi aumentada, o que levou a uma hipertrofia compensatória. Esse dado está de acordo com outros estudos que mostram hipertrofia compensatória no Sóleo nas seguintes condições: i) deleção do gene *MYH4*, responsável pela expressão da isoforma 2B em músculos rápidos, incluindo o gastrocnêmio (ALLEN *et al.*, 2001); e ii) aumento de carga funcional sobre o Sóleo causada pela remoção do gastrocnêmio ou o seu tendão (HANZLÍKOVÁ; MACKOVÁ; HNÍK, 1975; MINDERIS *et al.*, 2016). Outra possibilidade é que as fibras do tipo 1 que compõem uma grande parte do Sóleo, resistem à degeneração e ao contrário do EDL, hipertrofiam quando a transmissão colinérgica é reduzida.

Nesse músculo, nós observamos que a expressão aumentada de atrogina-1 e MuRF-1 nos animais VChT KD^{HOM} sugere que, uma vez que esse músculo está sob atrofia, essa via de degradação proteica pode estar regulada positivamente, na tentativa de reestabelecer o tamanho normal das fibras. O perfil oxidativo do Sóleo estava aumentado nos camundongos VChT KD^{HOM}, uma vez que observamos aumento na quantidade de fibras do tipo 1 e aumento na expressão de PGC1- α , e MTND-1. Essas alterações foram acompanhadas pela perda de fibras 2A. Esses resultados sugerem tanto a diferenciação das fibras 2A em tipo 1, quanto a perda de 2A, resultante da redução na transmissão colinérgica. Esse aumento no perfil oxidativo foi observado durante o envelhecimento natural, quando há uma mudança de fibras rápidas para lentas (HOLLOSZY *et al.*, 1991; LARSSON; ANSVED, 1995; MILJKOVIC; LIM; MILJKOVIC, 2015; THOMPSON, 1994), o que sugere que o sóleo dos camundongos VChT KD^{HOM} estão adquirindo um fenótipo precoce de envelhecimento.

A literatura, entretanto, mostra que existe um paradoxo entre os tipos de fibras e tamanho das mesmas (VAN WESSEL *et al.*, 2010). Fibras com alta capacidade oxidativa, como as do Sóleo, possuem maior potencial transcricional, associado a um maior conteúdo ribossômico, comparado as fibras de baixo poder oxidativo, como as do EDL (VAN WESSEL *et al.*, 2010). Dessa forma, esses dados mostram que essas fibras possuem maior capacidade de síntese proteica, o que cria um paradoxo, uma vez que as fibras oxidativas são relativamente menores. Essa observação sugere que, uma vez que essas fibras não apresentam comprometida a síntese proteica, então a taxa de síntese nas fibras oxidativas provavelmente é regulada por uma alta taxa de degradação proteica. Nesse sentido, a literatura já mostrou que o níveis de Atrogina e MuRF estavam 1,8 e 2,1x aumentados no sóleo, comparado ao EDL (VAN WESSEL *et al.*, 2010). Esses dados sugerem que fibras altamente oxidativas possuem

uma taxa relativamente alta de turnover proteico, o que pode limitar a hipertrofia. Esses dados, portanto, estão de acordo com os resultados que nós encontramos para o sóleo dos animais VACHT KD^{HOM}, que apresentaram elevada capacidade oxidativa associado a um aumento dos níveis de Atrogina e MuRF.

A hipertrofia apresentada pelo sóleo dos animais VACHT KD^{HOM} foi acompanhada por um aumento na expressão de Pax-7 e MyoD, indicando a ativação de via molecular pró-miogênica. Esse aumento de carga sob o sóleo pode promover a proliferação de células satélites expressando Pax-7, e assim levando ao aumento na expressão desses fatores miogênicos.

Em trabalhos anteriores, nosso grupo mostrou que os camundongos com expressão reduzida do VACHT apresentavam pior desempenho em testes de esteira em comparação ao WT (PRADO *et al.*, 2006). Nesse trabalho, além dos testes na esteira, nós mensuramos o consumo de oxigênio, padrão ouro na avaliação da capacidade aeróbica (PETROSINO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016; SPEAKMAN, 2013). De maneira interessante, apesar da redução na duração, distância e Vmáxima, os camundongos WT e VACHT KD^{HOM} consumiram quantidades semelhantes de oxigênio durante os testes. Esses resultado pode estar relacionado à baixa eficiência mecânica dos animais VACHT KD^{HOM} resultante da disfunção cardíaca constatada (LARA *et al.*, 2010).

Finalmente, no artigo anexado a esse tese, um dado adicional mostrou que o aumento na disponibilidade de ACh na fenda sináptica causado pelo tratamento com piridostigmina foi capaz de reverter parcialmente a atrofia e hipertrofia do EDL e sóleo, respectivamente, nos camundongos VACHT KD^{HOM}. Além disso, mostramos um aumento parcial do desempenho dos animais VACHT KD^{HOM} nos testes do campo aberto, rotarod e wire hang. Uma vez que essa droga age preferencialmente no sistema nervoso periférico, o desempenho reduzido dos animais VACHT KD^{HOM} nesses testes ocorreu provavelmente por alterações nos músculos do membro posterior incluindo aqueles analisados neste estudo. De maneira importante, a reversão bem sucedida das alterações musculares e motoras obtidas com esse tratamento trás implicações interessantes para as doenças neuromusculares incluindo as SMCs. Não obstante, a literatura mostra que os pacientes diagnosticados com a variante bialélica do gene do VACHT tratados com a piridostigmina apresentaram melhora moderada dos sintomas (O'GRADY *et al.*, 2016).

6. CONCLUSÃO

Em conjunto, esses dados enfatizam a importância da atividade colinérgica para a manutenção da função motora e estrutura das fibras musculares, e que músculos rápidos e lentos respondem diferentemente quando expostos a baixos níveis de ACh. Além disso, mostramos que a hiperfunção colinérgica, no caso dos animais ChAT-ChR2-EYFP, é deletéria para o organismo, de modo que estratégias que buscam a modulação genética do sistema colinérgico como formas de experimentais de tratamento, devem ser criteriosamente avaliadas. Esse trabalho com modelos animais estudando a sinalização colinérgica tem o potencial de avançar o conhecimento acerca do papel da ACh na manutenção dos componentes das unidades motoras e aspectos funcionais. Além disso, nós também propomos que o tratamento crônico com piridostigmina ou outros inibidores da AChE podem reverter parcialmente alterações neuromusculares e serem utilizados no tratamento de pacientes com SMCs, especificamente na tentativa de melhorar a função motora, o que é de interesse clínico. Nesse sentido, nós realizamos um tratamento crônico com piridostigmina nos animais VACHT KD^{HOM}, o qual se mostrou positivo na reversão de alterações neuromotoras (vide ANEXO 1 e a tese de Luana Pereira Leite Schetino: Avaliação Morfofuncional de Junções Neuromusculares e Músculos Estriados Esqueleticos de Camundongos Com Disfunção Colinérgica A Longo Prazo)

7. REFERÊNCIAS

ALLEN, D L *et al.* Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 280, n. 3, p. C637–C645, 2001. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/280/3/C637.short>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

Anatomy Atlases: Atlas of Microscopic Anatomy: Section 1 - Cells. Disponível em: <<http://www.anatomyatlases.org/MicroscopicAnatomy/Section05/Plate0566.shtml>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

ANDRES, Christian *et al.* Acetylcholinesterase-transgenic mice display embryonic modulations in spinal cord choline acetyltransferase and neurexin Ibeta gene expression followed by late-onset neuromotor deterioration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 15, p. 8173–8, 1997. Disponível em: <<http://www.pnas.org.ez27.periodicos.capes.gov.br/content/pnas/94/15/8173.full.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

ANIS, N.A.; ROBBINS, N. General and strain-specific age changes at mouse limb neuromuscular junctions. *Neurobiology of Aging*, v. 8, n. 4, p. 309–318, 1 jul. 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0197458087900698>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

ARAN, Adi *et al.* Vesicular acetylcholine transporter defect underlies devastating congenital myasthenia syndrome. *Neurology*, v. 88, n. 11, p. 1021–1028, 2017.

ARAVAMUDAN, Bharathi *et al.* Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *Journal of Applied Physiology*, v. 100, n. 5, 2006. Disponível em: <<http://jap.physiology.org/content/100/5/1617.short>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

BAI, Hua *et al.* Different states of synaptotagmin regulate evoked versus spontaneous release. *Nature Communications*, v. 7, p. 10971, 22 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms10971>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

BAIRD, W. L M; REID, A. M. The neuromuscular blocking properties of a new steroid compound, pancuronium bromide: A pilot study in man. *British Journal of Anaesthesia*, v. 39, n. 10, p. 775–780, 1 out. 1967. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007091217436919>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

BALICE-GORDON, R J; LICHTMAN, J W. In vivo visualization of the growth of pre- and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 10, n. 3, p. 894–908, 1 mar. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156964>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

BAUCHÉ, Stéphanie *et al.* Impaired Presynaptic High-Affinity Choline Transporter Causes a Congenital Myasthenic Syndrome with Episodic Apnea. *American Journal of Human Genetics*, v. 99, n. 3, p. 753–761, 2016.

BIRAL, Donatella *et al.* Myosin heavy chain composition of muscle fibers in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve*, v. 12, n. 1, p. 43–51, 1 jan. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mus.880120109>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

BIRKS, By R; HUXLEY, H E; KATZ, B. THE FINE STRUCTURE OF THE NEUROMUSCULAR JUNCTION OF THE FROG From the Department of Biophysics , University College London In recent years fairly detailed information has been obtained on the physio- logical events which occur at the vertebrate neuromuscu. *October*, p. 134–144, 1960.

BIRKS, R.; HUXLEY, H. E.; KATZ, B. The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. *The Journal of Physiology*, v. 150, n. 1, p. 134–144, jan. 1960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13800900>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

BLOEMBERG, D; QUADRILATERO, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e35273, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035273>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

BODINE, Sue C.; BAEHR, Leslie M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 307, n. 6, p. E469–E484, 15 set. 2014. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00204.2014>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

BOGDANIK, Laurent P; BURGESS, Robert W. A valid mouse model of AGRIN-associated

congenital myasthenic syndrome. *Human Molecular Genetics*, v. 20, n. 23, p. 4617–4633, 1 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890498>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

BONALDO, Paolo; SANDRI, Marco. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms*, v. 6, n. 1, p. 25–39, 1 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268536>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

BUCHTHAL, F; SCHMALBRUCH, H. Motor unit of mammalian muscle. *Physiological Reviews*, v. 60, n. 1, p. 90 LP-142, 1980. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/content/60/1/90.abstract>>.

BUCKINGHAM, Margaret *et al.* *The formation of skeletal muscle: From somite to limb. Journal of Anatomy*. [S.l.]: Blackwell Science Ltd. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-7580.2003.00139.x>>. Acesso em: 28 dez. 2017. , 1 jan. 2003

BYRING, R F *et al.* Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscular Disorders*, v. 12, n. 6, p. 548–553, 2002.

CECCARELLI, B; HURLBUT, W P; MAURO, A. Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology*, v. 57, n. 2, p. 499–524, 1 maio 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4348791>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

CHAKKALAKAL, Joe V *et al.* Retrograde influence of muscle fibers on their innervation revealed by a novel marker for slow motoneurons. *Development*, v. 137, n. 20, p. 3489–3499, 2010. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/content/137/20/3489.short>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

DALE, Hh; FELDBERG, W; VOGT, M. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *The Journal of physiology*, p. 353–380, 1936. Disponível em: <<http://jp.physoc.org/content/86/4/353.full.pdf>>.

DE CASTRO, B. 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, 1 out. 2009. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00245->

09>. Acesso em: 29 jul. 2017.

DEL CASTILLO, J.; ENGBAEK, Lise. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *The Journal of Physiology*, v. 124, n. 2, p. 370–384, 28 maio 1954. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1954.sp005114>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

DI GIULIO, Irene *et al.* The proprioceptive and agonist roles of gastrocnemius, soleus and tibialis anterior muscles in maintaining human upright posture. *The Journal of Physiology*, v. 587, n. 10, p. 2399–2416, 15 maio 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2009.168690>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

DOBROWOLNY, Gabriella *et al.* Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1G93A-Mediated Toxicity. *Cell Metabolism*, v. 8, n. 5, p. 425–436, nov. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413108002866>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

DUCLERT, Aymeric; CHANGEUX, Jean-Pierre. Acetylcholine Receptor Gene Expression at the Developing Neuromuscular Junction. *Physiological Reviews*, v. 75, n. 2, p. 339–68, 1 abr. 1995. Disponível em: <<http://go.galegroup.com/ps/anonymou?id=GALE%7CA16871739&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=fulltext&issn=00319333&p=AONE&sw=w&authCount=1&isAnonymousEntry=true>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

EDSTROM, Lars; KUGELBERG, Eric. Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units Anterior tibial muscle of the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat*, v. 31, p. 424–433, 1968.

EGERMAN, Marc A; GLASS, David J. *Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. [S.l.]: Informa Healthcare. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24237131>>. Acesso em: 3 jan. 2018. , 2014

ENGEL, Andrew G. *et al.* Loss of MUNC13-1 function causes microcephaly, cortical hyperexcitability, and fatal myasthenia. *Neurology Genetics*, v. 2, n. 5, p. e105, 2016. Disponível em: <<http://ng.neurology.org/lookup/doi/10.1212/NXG.000000000000105>>.

FARCHI, Noa; SOREQ, Hermona; HOCHNER, Binyamin. *Chronic acetylcholinesterase overexpression induces multilevelled aberrations in mouse neuromuscular physiology*.

Journal of Physiology. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2002.030841>>. Acesso em: 24 mar. 2018. , jan. 2003

FERREIRA-VIEIRA, Talita H. *et al.* A role for the endocannabinoid system in exercise-induced spatial memory enhancement in mice. *Hippocampus*, v. 24, n. 1, p. 79–88, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hipo.22206/full>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

FINKEL, Richard S. *et al.* Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *New England Journal of Medicine*, v. 377, n. 18, p. 1723–1732, 2 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1702752>>. Acesso em: 31 dez. 2017.

Formation and Elimination of Synapses | Principles of Neural Science, Fifth Edition | AccessNeurology | McGraw-Hill Medical. Disponível em: <<http://neurology.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1049§ionid=59138689>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

FRIESE, Andreas *et al.* Gamma and alpha motor neurons distinguished by expression of transcription factor *Err3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 32, p. 13588–93, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2716387&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GADAMSKI, Roman *et al.* *Morphological changes and selective loss of motoneurons in the lumbar part of the spinal cord in a rat model of familial amyotrophic lateral sclerosis (fALS)*. [S.l.]: Termedia, 2006. v. 44. Disponível em: <<https://www.termedia.pl/Journal/-20/Artykul-6762>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 13. ed. [S.l.]: Saunders, 2011. v. 53. Disponível em: <<https://www.us.elsevierhealth.com/guyton-and-hall-textbook-of-medical-physiology-9781455770052.html>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

HANZLÍKOVÁ, Věra; MACKOVÁ, Eva V.; HNÍK, P. Satellite cells of the rat soleus muscle in the process of compensatory hypertrophy combined with denervation. *Cell and Tissue Research*, v. 160, n. 3, p. 411–421, 1975. Disponível em:

<<http://www.springerlink.com/index/Q538Q34K7Q6X773W.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

HARANDI, Vahid M. *et al.* Analysis of neurotrophic factors in limb and extraocular muscles of mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, p. e109833, 15 out. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109833>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

HERRMANN, David N. *et al.* Synaptotagmin 2 mutations cause an autosomal-dominant form of lambert-eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy. *American Journal of Human Genetics*, v. 95, n. 3, p. 332–339, 2014.

HOLLOSZY, JO *et al.* Skeletal muscle atrophy in old rats: Differential changes in the three fiber types. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 60, n. 2, p. 199–213, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004763749190131I>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

HOLMSTRAND, Ericka C. *et al.* Transgenic overexpression of the presynaptic choline transporter elevates acetylcholine levels and augments motor endurance. *Neurochemistry International*, v. 73, n. 1, p. 217–228, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018613002994>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

HYATT, Jon-Philippe K *et al.* Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 285, n. 5, p. C1161–C1173, 2003. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/285/5/C1161.short>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

INGRAM, D K *et al.* Differential effects of age on motor performance in two mouse strains. *Neurobiol Aging*, v. 2, n. 3, p. 221–227, 1981. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0197458081900257>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

JOHNSON, I A N P. A quantitative ultrastructural comparison of alpha and gamma motoneurons in the thoracic region of the spinal cord of the adult cat. *Journal of Anatomy*, v. 147, p. 55–72, 1986.

JONES, Ross A. *et al.* Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular

Junction. *Cell Reports*, v. 21, n. 9, p. 2348–2356, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.008>>.

KATZ, Bernard. *Nerve, muscle, and synapse*. [S.l.]: McGraw-Hill Book Company, 1966.

KELLY, Douglas E. The fine structure of skeletal muscle triad junctions. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 29, n. 1–2, p. 37–49, 1 out. 1969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022532069800547>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

KERNELL, Daniel. *The Motoneurone and its Muscle Fibres*. [S.l.]: Oxford University Press, 2006. v. 50. Disponível em: <<http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780198526551.001.0001/acprof-9780198526551>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

KOLISNYK, Benjamin *et al.* ChAT-ChR2-EYFP Mice Have Enhanced Motor Endurance But Show Deficits in Attention and Several Additional Cognitive Domains. *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 25, p. 10427–10438, 19 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23785154>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

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, 1 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438805001856>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

LARA, Aline *et al.* Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Molecular and cellular biology*, v. 30, n. 7, p. 1746–1756, 1 abr. 2010. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00996-09>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

LARSSON, L. *et al.* An age-related type IIB to IIX myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 147, n. 2, p. 227–234, 1993. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09493.x/full>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

LARSSON, Lars; ANSVED, Tor. *Effects of ageing on the motor unit*. *Progress in*

Neurobiology. [S.l.: s.n.], 1995

LIDDELL, E. G. T.; SHERRINGTON, C. S. Recruitment and some other Features of Reflex Inhibition. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 97, n. 686, p. 488–518, 1 abr. 1925. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.1925.0016>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202084>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

LOEWI, O. Über humerole Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I. Mitteilung. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, v. 189, n. 1, p. 239–242, 1921. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF01738910.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

LUND, D *et al.* Motor neuron-specific overexpression of the presynaptic choline transporter: Impact on motor endurance and evoked muscle activity. *Neuroscience*, v. 171, n. 4, p. 1041–1053, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452210013059>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

LUNN, Mitchell R; WANG, Ching H. Spinal muscular atrophy. *The Lancet*, v. 371, n. 9630, p. 2120–2133, 21 jun. 2008a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez27.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0140673608609216>>. Acesso em: 31 dez. 2017.

LUNN, Mitchell R; WANG, Ching H. *Spinal muscular atrophy. The Lancet*. [S.l.]: Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673608609216>>. Acesso em: 24 mar. 2018b. , 21 jun. 2008

MAGALHÃES-GOMES, M. P., MOTTA-SANTOS, D., SCHETINO, L. P., ANDRADE, J. N., BASTOS, C. P., GUIMARÃES, D. A., ... & COIMBRA, C. C. 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, 2018.

MANTILLA, Carlos B.; SIECK, Gary C. Invited Review: Mechanisms underlying motor unit plasticity in the respiratory system. *Journal of Applied Physiology*, v. 94, n. 3, p. 1230–1241, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.01120.2002>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

MANUEL, MARIN; ZYTNICKI, DANIEL. ALPHA, BETA AND GAMMA MOTONEURONS: FUNCTIONAL DIVERSITY IN THE MOTOR SYSTEM'S FINAL PATHWAY. *Journal of Integrative Neuroscience*, v. 10, n. 03, p. 243–276, 2011. Disponível em: <<http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0219635211002786>>.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Cell Biology*, v. 9, n. 2, p. 493–495, fev. 1961. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13768451>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

MCMACKEN, Grace *et al.* The Increasing Genetic and Phenotypical Diversity of Congenital Myasthenic Syndromes. *Neuropediatrics*, v. 48, n. 4, p. 294–308, 15 ago. 2017a. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1602832>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

MCMACKEN, Grace *et al.* The Increasing Genetic and Phenotypical Diversity of Congenital Myasthenic Syndromes. *Neuropediatrics*, v. 48, n. 04, p. 294–308, 15 ago. 2017b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28505670>>. Acesso em: 31 dez. 2017.

MCPHEDRAN, A M; WUERKER, R B; HENNEMAN, E. PROPERTIES OF MOTOR UNITS IN A HOMOGENEOUS RED MUSCLE (SOLEUS) OF THE CAT. *Journal of neurophysiology*, v. 28, n. 1, p. 71–84, 1 jan. 1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14244797>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

MILJKOVIC, N; LIM, JY; MILJKOVIC, I. Aging of skeletal muscle fibers. *Annals of rehabilitation*, 2015. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/search.php?where=aview&id=10.5535/arm.2015.39.2.155&code=1041ARM&vmode=FULL>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

MIMAKI, Masakazu *et al.* Understanding mitochondrial complex I assembly in health and

disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1817, n. 6, p. 851–862, jun. 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272811002003>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

MINDERIS, P *et al.* Myostatin dysfunction is associated with reduction in overload induced hypertrophy of soleus muscle in mice. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, v. 26, n. 8, p. 894–901, 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sms.12532/full>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

MISAWA, Hidemi *et al.* Osteopontin is an alpha motor neuron marker in the mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience Research*, v. 90, n. 4, p. 732–742, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22420030>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

MORESI, Viviana *et al.* Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell*, v. 143, n. 1, p. 35–45, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410010147>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

MURTHY, Venkatesh N.; CAMILLI, Pietro De. CELL BIOLOGY OF THE PRESYNAPTIC TERMINAL. *Annual Review of Neuroscience*, v. 26, n. 1, p. 701–728, 28 mar. 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131445>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

NICOLE, Sophie *et al.* Congenital Myasthenic Syndromes or Inherited Disorders of Neuromuscular Transmission: Recent Discoveries and Open Questions. *Journal of Neuromuscular Diseases*, v. 4, n. 4, p. 269–284, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29125502><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5701762><http://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JND-170257>>.

NOBEL, Alfred *et al.* The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1932 Edgar Adrian - Biographical. 1932. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1932/>. Acesso em: 6 dez. 2017.

NOBELPRIZE.ORG. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1936*. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1936/>. Acesso em: 20 dez. 2017.

NOBELPRIZE.ORG. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1963*. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1963/>. Acesso em: 6 dez. 2017.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27590285>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

OHNO, K. *et al.* Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 4, p. 2017–2022, 13 fev. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172068>>. Acesso em: 24 ago. 2017.

OUSTANINA, Svetlana; HAUSE, Gerd; BRAUN, Thomas. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *The EMBO journal*, v. 23, n. 16, p. 3430–9, 18 ago. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099544>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

PETROSINO, Jennifer M. *et al.* Graded maximal exercise testing to assess mouse cardio-metabolic phenotypes. *PLoS ONE*, v. 11, n. 2, 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0148010>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950158>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

PRADO, Vania F *et al.* Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *The Biochemical journal*, v. 450, n. 2, p. 265–74, 1 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23410039>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

RAHIMOV, Fedik; KUNKEL, Louis M. Cellular and molecular mechanisms underlying

muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology*, v. 201, n. 4, p. 499–510, 13 maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671309>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

REID, B; SLATER, C R; BEWICK, G S. Synaptic vesicle dynamics in rat fast and slow motor nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 19, n. 7, p. 2511–21, 1 abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087065>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

REID, Brian *et al.* Activity-dependent plasticity of transmitter release from nerve terminals in rat fast and slow muscles. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 23, n. 28, p. 9340–8, 15 out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561861>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

RENDL, Michael. *Stem Cells in Development and Disease*. [S.l.]: Academic Press, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124160224100009>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

REXED, Bror. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 100, n. 2, p. 297–379, abr. 1954. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13163236>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

RICHARDS, D.A.; GUATIMOSIM, C.; BETZ, W.J. Two Endocytic Recycling Routes Selectively Fill Two Vesicle Pools in Frog Motor Nerve Terminals. *Neuron*, v. 27, n. 3, p. 551–559, 1 set. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627300000659>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

RIZZOLI, Silvio O. *Synaptic vesicle recycling: Steps and principles*. *EMBO Journal*. [S.l.]: EMBO Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1935891>>. Acesso em: 21 dez. 2017. , 16 abr. 2014

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, 8 nov. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0078342>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

RODRÍGUEZ CRUZ, Pedro M.; PALACE, Jacqueline; BEESON, David. Inherited disorders

of the neuromuscular junction: an update. *Journal of Neurology*, v. 261, n. 11, p. 2234–2243, 11 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25305004>>. Acesso em: 23 ago. 2017.

ROWLAND, Lewis P.; SHNEIDER, Neil A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 22, p. 1688–1700, 31 maio 2001. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200105313442207>>. Acesso em: 31 dez. 2017.

SAHEKI, Yasunori; DE CAMILLI, Pietro. Endoplasmic Reticulum– Plasma Membrane Contact Sites. *Annual Review of Biochemistry*, v. 86, n. 1, p. 659–684, 20 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301744>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

SANES, Joshua R.; LICHTMAN, Jeff W. Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction. *Annual Review of Neuroscience*, v. 22, n. 1, p. 389–442, mar. 1999a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10202544>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

SANES, Joshua R; LICHTMAN, Jeff W. Development of the Vertebrate Neuromuscular Junction. p. 389–442, 1999b.

SANGO, K *et al.* Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nature genetics*, v. 14, n. July 2016, p. 348–352, 1996. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Michael_Mcdonald12/publication/14309567_Mice_lacking_both_subunits_of_lysosomal_hexosaminidase_display_gangliosidosis_and_mucopolysaccharidosis/links/551c25fa0cf2909047ba5b1d/Mice-lacking-both-subunits-of-lysosomal-he>. Acesso em: 29 jul. 2017.

SAWANO, Shoko *et al.* A One-Step Immunostaining Method to Visualize Rodent Muscle Fiber Type within a Single Specimen. *PLOS ONE*, v. 11, n. 11, p. e0166080, 4 nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0166080>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

SCHIAFFINO, Stefano; REGGIANI, Carlo. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*, v. 91, n. 4, p. 1447–531, 2011a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22013216>>.

SCHIAFFINO, Stefano; REGGIANI, Carlo. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles.

Physiological Reviews, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011b. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/content/91/4/1447.short>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

SCHWARTZ, Mathias *et al.* How chromosomal deletions can unmask recessive mutations? Deletions in 10q11.2 associated with CHAT or SLC18A3 mutations lead to congenital myasthenic syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 176, n. 1, p. 151–155, jan. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29130637>>. Acesso em: 31 dez. 2017.

SEALE, P *et al.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, v. 102, n. 6, p. 777–86, 15 set. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030621>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

SHARMA, Aarti *et al.* ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function. *Nature Communications*, v. 7, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncomms10465>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

SHEN, Xin-Ming *et al.* Mutant SNAP25B causes myasthenia, cortical hyperexcitability, ataxia, and intellectual disability. *Neurology*, v. 83, n. 24, p. 2247–55, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4277673&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SHEN, Xin-Ming *et al.* Novel synaptobrevin-1 mutation causes fatal congenital myasthenic syndrome. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, v. 4, n. 2, p. 130–138, 2017. Disponível em: <<https://vpn1.uantwerpen.be/+CSCO+1075676763663A2F2F6A6A6A2E61706F762E61797A2E6176752E746269++/pmc/articles/PMC5288468/pdf/ACN3-4-130.pdf>>.

SILVA, Josiane F. *et al.* Obesity, inflammation, and exercise training: Relative contribution of inos and enos in the modulation of vascular function in the mouse aorta. *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. SEP, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5013134/>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

SOLEIMANI, Vahab D. *et al.* Transcriptional Dominance of Pax7 in Adult Myogenesis Is Due to High-Affinity Recognition of Homeodomain Motifs. *Developmental Cell*, v. 22, n. 6, p. 1208–1220, 12 jun. 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com.ez27.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1534580712001414>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

SOUSA, N; ALMEIDA, O F X; WOTJAK, C T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav*, v. 5 Suppl 2, p. 5–24, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x/full>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

SOYKAN, Tolga; HAUCKE, Volker. Cell biology: Membrane kiss mediates hormone secretion. *Nature*, v. 534, n. 7608, p. 479–480, 15 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature18446>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

SPEAKMAN, J R. Measuring energy metabolism in the mouse - theoretical, practical, and analytical considerations. *Front Physiol*, v. 4, p. 34, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596737/>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

ST JOHN, Paul A.; GORDON, Herman. Agonists cause endocytosis of nicotinic acetylcholine receptors on cultured myotubes. *Journal of Neurobiology*, v. 49, n. 3, p. 212–223, 15 nov. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/neu.1076>>. Acesso em: 24 mar. 2018.

STIFANI, Nicolas. Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 293, 9 out. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00293/abstract>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

SÜDHOF, Thomas C. Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron*, v. 80, n. 3, p. 675–690, 30 out. 2013a. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.ez27.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0896627313009264>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

SÜDHOF, Thomas C. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nature Medicine*, v. 19, n. 10, p. 1227–1231, 7 out. 2013b. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.3338>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

SÜDHOF, Thomas C. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, v. 80, n. 3, p. 675–90, 30 out. 2013c. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24183019>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

SUGITA, Satoshi *et al.* VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions. *Skeletal Muscle*, v. 6, n. 1, p. 31, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27713817>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

TAKEI, Kohji *et al.* The synaptic vesicle cycle: A single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *Journal of Cell Biology*, v. 133, n. 6, p. 1237–1250, 15 jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8682861>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

TALBOT, Jared; MAVES, Lisa. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, v. 5, n. 4, p. 518–534, 1 jul. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/wdev.230>>. Acesso em: 31 dez. 2017.

THOMPSON, L V. Effects of age and training on skeletal muscle physiology and performance. *Physical therapy*, v. 74, n. 1, p. 71–81, 1994. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ptj/article-abstract/74/1/71/2729195>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

TOMLINSON, B E; IRVING, Dorothy; REBEIZ, J J. Total numbers of limb motor neurones in the human lumbosacral cord and an analysis of the accuracy of various sampling procedures. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 20, n. 3, p. 313–327, nov. 1973. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4587145>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

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

VALDEZ, Gregorio *et al.* Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 33, p. 14863–8, 17 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20679195>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

VALDEZ, Gregorio *et al.* Shared resistance to aging and als in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. e34640, 2 abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034640>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

VAN LIEFFERINGE, Joeri *et al.* Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 7, p. 139, 30 ago. 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00139/abstract>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

VAN WESSEL, T. *et al.* The muscle fiber type-fiber size paradox: Hypertrophy or oxidative metabolism? *European Journal of Applied Physiology*, v. 110, n. 4, p. 665–694, 3 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602111>>. Acesso em: 26 mar. 2018.

VIANNA, M R *et al.* Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, v. 7, n. 5, p. 333–40, 2000. Disponível em: <<http://learnmem.cshlp.org/content/7/5/333.short>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

WANG, Yichen; PESSIN, Jeffrey E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, v. 16, n. 3, p. 243–50, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0142699>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

WAUD, B. E.; WAUD, D. R. The Margin of Safety of Neuromuscular Transmission in the Muscle of the Diaphragm. *Anesthesiology*, v. 37, n. 4, p. 417–422, 1 out. 1972. Disponível em: <<https://insightsovid.ez27.periodicos.capes.gov.br/anesthesiology/ Janet/1972/10/000/margin-safety-neuromuscular-transmission-muscle/12/00000542>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

WEBER, A. On the role of calcium in the activity of adenosine 5'-triphosphate hydrolysis by actomyosin. *The Journal of biological chemistry*, v. 234, p. 2764–2769, out. 1959. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13843278>>. Acesso em: 30 dez. 2017.

WILLADT, Silvia; NASH, Mark; SLATER, Clarke R. Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm. *Scientific reports*, v. 6, p. 24849, 20 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27094316>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

YIN, Hang; PRICE, Feodor; RUDNICKI, Michael A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiological Reviews*, v. 93, n. 1, p. 23–67, 2013. Disponível em: <<http://www.physiology.org/ez27.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1152/physrev.00043.2011>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

YOON, J. Cliff *et al.* Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 131–138, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740080611X>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

ZAMMIT, Peter S.; PARTRIDGE, Terence A.; YABLONKA-REUVENI, Zipora. The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 54, n. 11, p. 1177–1191, 24 nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899758>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

ZHAN, WZ; SIECK, GC. Adaptations of diaphragm and medial gastrocnemius muscles to inactivity. *Journal of Applied Physiology*, 1992. Disponível em: <<http://jap.physiology.org/content/72/4/1445.short>>. Acesso em: 29 jul. 2017.

ZHAO, Shengli *et al.* Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nature Methods*, v. 8, n. 9, p. 745–755, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nmeth.1668>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

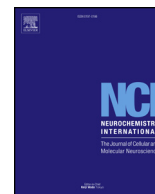
8. ANEXOS

8.1. Artigo 1: Fast and slow-twitching muscles are differentially affected by reduced cholinergic transmission in mice deficient for VACHT: A mouse model for congenital myasthenia

8.2. Artigo 2: VACHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions

8.3. Artigo 3: Neuromuscular synapse degeneration without muscle function loss in the diaphragm of a murine model for Huntington's Disease

8.4. Artigo 4: Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease



Fast and slow-twitching muscles are differentially affected by reduced cholinergic transmission in mice deficient for VACHT: A mouse model for congenital myasthenia

Matheus P.S. Magalhães-Gomes^a, Daisy Motta-Santos^{b,h}, Luana P.L. Schetino^{a,1},
Jéssica N. Andrade^a, Cristiane P. Bastos^b, Diogo A.S. Guimarães^c, Sydney K. Vaughan^{e,f},
Patrícia M. Martinelli^a, Silvia Guatimosim^b, Grace S. Pereira^b, Candido C. Coimbra^b,
Vânia F. Prado^d, Marco A.M. Prado^d, Gregorio Valdez^{e,g}, Cristina Guatimosim^{a,*}

^a Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c IEP-Santa Casa, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Roberts Research Institute and Department of Physiology and Pharmacology and Anatomy & Cell Biology, University of Western Ontario, London, ON, Canada

^e Virginia Tech Carilion Research Institute, Roanoke, VA, USA

^f Graduate Program in Translational Biology, Medicine, and Health, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA

^g Department of Biological Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA

^h Departamento de Esportes, EEFPTO, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Congenital myasthenic syndromes
Acetylcholine
Vesicular acetylcholine transporter skeletal muscle
Cholinergic transmission
Motor function

ABSTRACT

Congenital myasthenic syndromes (CMS) result from reduced cholinergic transmission at neuromuscular junctions (NMJs). While the etiology of CMS varies, the disease is characterized by muscle weakness. To date, it remains unknown if CMS causes long-term and irreversible changes to skeletal muscles. In this study, we examined skeletal muscles in a mouse line with reduced expression of Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT, mouse line herein called VACHT-KD^{HOM}). We examined this mouse line for several reasons. First, VACHT plays a central function in loading acetylcholine (ACh) into synaptic vesicles and releasing it at NMJs, in addition to other cholinergic nerve endings. Second, loss of function mutations in VACHT causes myasthenia in humans. Importantly, VACHT-KD^{HOM} present with reduced ACh and muscle weakness, resembling CMS. We evaluated the morphology, fiber type (myosin heavy chain isoforms), and expression of muscle-related genes in the extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles. This analysis revealed that while muscle fibers atrophy in the EDL, they hypertrophy in the soleus muscle of VACHT-KD^{HOM} mice. Along with these cellular changes, skeletal muscles exhibit altered levels of markers for myogenesis (Pax-7, Myogenin, and MyoD), oxidative metabolism (PGC1- α and MTND1), and protein degradation (Atrogin1 and MuRF1) in VACHT-KD^{HOM} mice. Importantly, we demonstrate that deleterious changes in skeletal muscles and motor deficits can be partially reversed following the administration of the cholinesterase inhibitor, pyridostigmine in VACHT-KD^{HOM} mice. These findings reveal that fast and slow type muscles differentially respond to cholinergic deficits. Additionally, this study shows that the adverse effects of cholinergic transmission, as in the case of CMS, on fast and slow type skeletal muscles are reversible.

1. Introduction

Congenital Myasthenic Syndromes (CMS) are a group of genetic disorders that impair neuromuscular transmission, resulting in muscle

weakness (Aran et al., 2017; O'Neill, 2006). CMS are generally caused by mutations in presynaptic and postsynaptic genes with crucial roles in cholinergic transmission at the neuromuscular junction (NMJ) (Ohno et al., 2017). One of the most relevant proteins for cholinergic

* Corresponding author. LaBNeuro, Bloco H2, sala 210, Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais. Avenida Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, 31.270-901, Brazil.

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

¹ Current address: Faculdade de Medicina, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK, Diamantina, MG, Brasil.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.07.002>

Received 13 February 2018; Received in revised form 27 June 2018; Accepted 7 July 2018

Available online 09 July 2018

0197-0186/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

Abbreviations

ACh	acetylcholine
ALS	amyotrophic lateral sclerosis
ChAT	choline acetyltransferase
CMS	congenital myasthenic syndrome
CSA	cross sectional area
EDL	extensor digitorum longus muscle
MIT	maximal incremental test
MTND1	mitochondrial DNA encoding complex 1
MuRF1	muscle RING-finger protein-1
MyHC	myosin heavy chain
MyoD	myogenic differentiation 1

AChRs	nicotinic receptors
NMJ	neuromuscular junctions
Pax-7	paired box protein 7
PGC1- α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PYR	pyridostigmine
SLC18A3	solute carrier family 18 member A3
SMA	spinal muscular atrophy
SR	sarcoplasmic reticulum
TEM	transmission electron microscopy
TTX	tetrodotoxin
VAcHT KD ^{HOM}	VAcHT knockdown Homozygous mice
VAcHT	vesicular acetylcholine transporter

transmission is Vesicular Acetylcholine Transporter (VAcHT), encoded by the *SLC18A3* gene. Mutations in this gene were recently identified in patients presenting with differing degrees of myasthenia (OMIN number: # 617239) (Aran et al., 2017; O'Grady et al., 2016; Schwartz et al., 2018). VAcHT functions to move acetylcholine (ACh) into synaptic vesicles (Kljakic et al., 2017; Parsons, 2000; Prado et al., 2013) following its synthesis by choline acetyltransferase (ChAT). Under steady-state conditions, VAcHT transports sufficient ACh into synaptic vesicles to activate acetylcholine receptors (AChRs) on the muscle fiber membrane to promote muscle contraction (Katz and Miledi, 1964; Langley, 1907). However, mutations in VAcHT (de Castro et al., 2009; Prado et al., 2006) reduce the amount of ACh loaded into synaptic vesicles, thus impairing AChR activation and muscle contraction.

In addition to causing CMS, loss of ACh affects the formation and development of muscle fibers and their NMJs (Darabid et al., 2014; Gautam et al., 1999; Miner et al., 1998). Highlighting this point, deletion of *ChAT* or *VAcHT* in mice affects the morphology and function of nascent NMJs and muscle fibers, and invariably results in early post-natal death due to lack of cholinergic transmission (Brandon et al., 2003; de Castro et al., 2009; Misgeld et al., 2002). To further assess the contribution of ACh to NMJ and muscle development, transgenic mice with reduced expression of VAcHT were generated and examined in previous published studies. This involved introducing a selection marker cassette within the 5'untranslated region of the VAcHT gene to interfere with VAcHT expression (Prado et al., 2006) using homologous recombination. Transgenic mice with both VAcHT gene locus modified are referred to as VAcHT-KD^{HOM}. These mice present with 65% reduction in VAcHT levels, shown using qPCR and western blot analysis, yet survive and reach adulthood despite having a pronounced deficit in neuromuscular transmission and function (Lima et al., 2010; Prado et al., 2006; Rodrigues et al., 2013). VAcHT-KD^{HOM} also exhibit cardiac dysfunction (Lara et al., 2010), increased inflammatory responses (Leite et al., 2016), and cognitive impairment (Prado et al., 2006). Thus, the phenotypes described in VAcHT deficient mice closely resemble phenotypes found in human patients with VAcHT mutations, suggesting a high degree of functional conservation and further indicating that low levels of ACh causes CMS in VAcHT transgenic mice (Aran et al., 2017; O'Grady et al., 2016).

Although pre-synaptic alterations in adult VAcHT-KD^{HOM} mice have been reported (Lima et al., 2010; Prado et al., 2006; Rodrigues et al., 2013), it is still unknown whether long-term changes in cholinergic activity due to VAcHT deficiency causes long-term changes in the structure and function of skeletal muscles. In most mammals, adult skeletal muscles are populated by four types of muscle fibers, which can be identified based on the expression of Myosin Heavy Chain (MyHC) isoforms. The four types of MyHC are: type 1 or slow-oxidative fibers; 2A or fast oxidative-glycolytic; and 2X and 2B, which are fast-glycolytic fibers. The unique metabolic and contractile properties of these muscle fibers underlie the different functional outputs of skeletal muscles (Bloemberg and Quadrilatero, 2012; Brooke and Kaiser, 1970;

Chakkalakal et al., 2010; Schiaffino et al., 1989; Schiaffino and Reggiani, 2011). These muscle fibers also show different responses to various diseases and aging. Despite this knowledge and obvious effects of CMS on the function of NMJs and whole skeletal muscles, little is known about the specific and long-term changes that suboptimal cholinergic transmission causes on muscle fibers. In this study, we examined skeletal muscles with varying functional demands and different muscle fiber composition in VAcHT-KD^{HOM} mice. We also assessed if pathogenic features resembling CMS are reversible in adult skeletal muscles of VAcHT-KD^{HOM} mice.

2. Materials and methods**2.1. Experimental design**

The generation and genotyping of VAcHT-KD^{HOM} transgenic mice was previously described (Prado et al., 2006). VAcHT-KD^{HOM} mice have a 65% reduction in VAcHT expression. All animals were genotyped 10 days after birth. VAcHT-KD^{HOM} mice were obtained by intercrossing heterozygous animals. Control mice were wild type (WT) age and sex-matched littermates. We only examined male adult (3-6 months-old) mice in this study. Animals were housed in an animal care facility in Department of Physiology and Biophysics, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Animals were grouped with three to five animals into mini-isolator cages (length: 48,3 cm; width: 33,7 cm; height: 21,4 cm- Alesco[®]) in a temperature-controlled room (~24 °C) with a 12:12 light-dark cycles, with food (Nuvilab CR-1) and water provided *ad libitum*. Mice weight was approximately 28.6 \pm 2.8 g for WT and 24.2 \pm 2.7 g for VAcHT-KD^{HOM} mice (see Table 3). The experimental procedures were carried out in accordance with the protocol approved by the UFMG ethics committee (CEUA, protocol 40/2009) and in accordance with NIH and ARRIVE guidelines for the Care and Use of Animals in Research and Teaching. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

All animals used in this study were appropriately identified by numbers according to their genotype (WT or VAcHT-KD^{HOM}). Using the genotyping table, animals were randomly divided into the following groups: Group one, untreated: WT and VAcHT-KD^{HOM}; Group two treated with Pyridostigmine (PYR): WT, WT PYR, VAcHT-KD^{HOM} and VAcHT-KD^{HOM} PYR. Animals were randomly treated and evaluated.

The animals assigned to group one were deeply anesthetized by inhalation of isoflurane in a glass chamber or with ketamine/xylazine (0.1 mL/20g). All procedures were performed in accordance to the CEUA/UFMG protocol. All surgical procedures are described in the appropriated sections. The experimental procedures were mostly performed in the afternoon, and by the end of each surgical procedure animals were euthanized using a super-dosage of anesthetics. The experiments were conducted at the Department of Morphology and Physiology on Federal University of Minas Gerais. The exact numbers for all experiments are provided in the figure legends and results

Table 1
Quantitative analyses of the EDL muscle from WT and VACHT-KD^{HOM} mice.

EDL	WT	VACHT-KD ^{HOM}	Statistics (p < 0.05)
Whole muscle area (mm ²)	1.8 ± 0.06	1.4 ± 0.06*	p = 0.0016
Total number of fibers	979 ± 74.5	778 ± 22.6*	p = 0.0140
Mean fibers CSA (μm ²)	1735 ± 91.2	1429 ± 55.6*	p = 0.016
Type 2A CSA (μm ²)	640.5 ± 35.1	540.3 ± 42.7	NS
Type 2X CSA (μm ²)	892.4 ± 50.9	700.9 ± 47.2*	p = 0.02
Type 2B CSA (μm ²)	2344 ± 67.7	1758 ± 58.8*	p = 0.0002
% of type 2A	5.6 ± 0.7	8.4 ± 1.03	NS
% of Type 2X	16.3 ± 1.4	25.9 ± 1.1*	p = 0.0008
% of Type 2B	74 ± 2.6	64.6 ± 2.06*	p = 0.04
Molecular markers (2 ^{-ΔΔCT})	WT	VACHT-KD ^{HOM}	Statistics (p < 0.05)
Atrogin-1	0.0089 ± 0.0013	0.004 ± 0.0009*	p = 0.02
MuRF-1	0.0128 ± 0.002	0.0114 ± 0.0021	NS
Pax-7	0.0003 ± 0.00002	0.0003 ± 0.00003	NS
MyoD	0.0012 ± 0.0002	0.0002 ± 0.00003*	p = 0.0005
Myogenin	0.00036 ± 0.00002	0.00019 ± 0.00001*	p = 0.0003
PGC1-α	0.0026 ± 0.0001	0.0019 ± 0.0001	NS (p = 0.06)
MTND1	4.88 ± 0.75	3.14 ± 0.36*	p = 0.047

Statistical analysis was deployed to compare morphological differences between 5 WT and 7 VACHT-KD^{HOM} mice. The average whole muscle area and variability was compared between genotypes. For individual muscle fiber cross-sectional area (CSA) analysis, we evaluated a total of 2767 fibers per genotype: 316 for type 2A, 544 for type 2X, and 1907 for type 2B. Molecular analysis was performed in 3 WT and 6 VACHT-KD^{HOM} mice. Values represent Mean ± SEM. Unpaired Student's t-test was applied after the data was analyzed using Kolmogorov-Smirnov normality test. * Statistically different from WT mice. # Mann-Whitney test for non-Gaussian data set. NS: Not Significant.

section. The experimental groups remained constant from the beginning to the end of the study.

2.2. Morphological and morphometrical analyses

Mice were anesthetized with isoflurane, followed by cervical dislocation. The gastrocnemius, extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles were surgically excised, fixed in 4% glutaraldehyde for 24 h, dehydrated in an ascending volumes of alcohol (70%, 80%, 90%, 95% 2X), embedded in glycol methacrylate resin (Leica), and cut in a microtome (Reichert Jung). The mid-belly regions of muscles were cut into 3–5 μm thick sections. Muscle sections were stained with toluidine blue (EMS) for cross-sectional area (CSA) analysis of individual myofibers. Images were acquired using a microscope (Zeiss Axiolab A1) coupled to a CCD camera, visualized in a computer and analyzed using the Axiovision (Zeiss) or Image J (NIH) where a polygon selection tool was used to manually draw a perimeter around muscle fibers to determine the CSA of individual myofibers. The average CSA for gastrocnemius muscle fibers were calculated from at least 500 individual muscle fibers per animal per genotype.

2.3. Myosin heavy chain isoforms staining

Myosin heavy chain isoforms were identified according to the protocol described by Valdez et al. (2012). Mice were sacrificed, and then EDL, gastrocnemius and soleus muscles were collected, immersed in OCT (Easy Path), oriented in freezing molds, and covered with freezing medium. The EDL and Soleus were put in the same mold and freshly

Table 2
Quantitative analyses of the soleus muscle from WT and VACHT-KD^{HOM} mice.

Soleus	WT	VACHT-KD ^{HOM}	Statistics (p < 0.05)
Whole muscle area (mm ²)	1.45 ± 0.12	1.5 ± 0.09	NS
Total number of fibers	856.2 ± 22.8	730.3 ± 28.19*	p = 0.009
Mean fibers CSA (μm ²)	1525 ± 45.4	1777 ± 51.1*	p = 0.005
Type 1 CSA (μm ²)	1691 ± 75.6	1960 ± 92.3*	p = 0.04
Type 2A CSA (μm ²)	1349 ± 11.6	1745 ± 54.4*	P < 0.0001
Type 2X CSA (μm ²)	1652 ± 109.1	1727 ± 55.7	NS
% of type 1	34.8 ± 2.7	43.8 ± 1.03*	p = 0.007
% of Type 2A	54.1 ± 2.4	46.5 ± 1.8*	p = 0.03
% of Type 2X	11.1 ± 2.4	9.7 ± 2.01	NS
Molecular markers (2 ^{-ΔΔCT})	WT	VACHT-KD ^{HOM}	Statistics (p < 0.05)
Atrogin-1	0.0055 ± 0.0009	0.0094 ± 0.0009*	p = 0.02
MuRF-1	0.0122 ± 0.0015	0.0173 ± 0.001*	p = 0.02
Pax-7	0.0005 ± 0.00008	0.00146 ± 0.0001*	p = 0.0008
MyoD	0.0002 ± 0.00002	0.0004 ± 0.00002*	p = 0.001
Myogenin	0.0008 ± 0.0001	0.001 ± 0.0001	NS [#]
PGC1-α	0.0038 ± 0.0003	0.0081 ± 0.001*	p = 0.004 [#]
MTND1	8.39 ± 0.76	13.04 ± 0.89*	p = 0.003

Statistical analysis was deployed to compare morphological differences between 6 WT and 7 VACHT-KD^{HOM} mice. The average whole muscle area and variability was compared between genotypes. For individual muscle fiber cross-sectional area (CSA) analysis, we evaluated a total of 2835 muscle fibers per genotype: 1104 for type 1, 1186 for type 2A, and 397 for type 2X. Values represent Mean ± SEM. Unpaired Student's t-test was applied after the data was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov normality test. Molecular analysis was performed in 6 WT and 6 VACHT-KD^{HOM} mice. * Statistically different from WT mice. # Mann-Whitney test for non-Gaussian data set. NS: Not Significant.

Table 3
Results of the maximal incremental test.

MIT TEST	WT	VACHT-KD ^{HOM}	Statistics
Body weight (g)	28.6 ± 2.7	24.25 ± 2.6*	p = 0.03
Distance (m)	417.3 ± 132.6	105.4 ± 37.6*	p = 0.0004
Vmax (cm/s)	31.2 ± 4.02	15.5 ± 2.2*	p < 0.0001
Duration (min)	26.8 ± 4.4	10.6 ± 2.4*	p < 0.0001
VO ₂ Basal (ml.Kg-1.min-1)	15.1 ± 6.1	13.4 ± 4.3	NS
VO ₂ Max (ml.Kg-1.min-1)	29.9 ± 5.4	25.8 ± 4.2	NS
Work (J)	21.1 ± 7.5	3.3 ± 0.7*	p = 0.0003

Statistical analysis was deployed to compare differences between 5 WT and 6 VACHT-KD^{HOM} mice. The average whole muscle area and variability was compared between genotypes. Values represent Mean ± SEM. *Statistically different from WT mice based on Unpaired Student's t-test. NS: Not Significant.

frozen in isopentane (Sigma-Aldrich), cooled in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. The mid-belly region of muscles was cut on a cryostat (Leica CM3050S), and cross sections (10 μm) were collected on gelatin-coated slides. Muscle sections were blocked 30 min at room temperature (RT) with 3% BSA (Sigma-Aldrich), 5% goat serum (Sigma-Aldrich), and 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) diluted in PBS 1x. Muscle sections were then incubated overnight (ON) at 4 °C with the following primary antibodies (diluted in 3% BSA, 5% goat serum), all raised in mice: type 1 (Leica Microsystems Cat# NCL-MHCs Lot# RRID:AB_563898; 1:250); type 2A (DSHB Cat# SC-71 Lot# RRID:AB_2147165; 1:100), type 2X (DSHB Cat# BF-35 Lot# RRID:AB_2274680, which recognizes all types of muscles fibers except for the 2X; 1:100), and type 2B (DSHB Cat# BF-F3 Lot# RRID:AB_2266724; 1:100). SC-71,

BF-35 and BF-F3 antibodies were deposited to the DSHB by Stefano Schiaffino. Slides were washed three times with PBS 1x and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies: Alexa 488 goat anti-mouse IgG1 (Thermo Fisher Scientific Cat# A-21121 Lot# RRID:AB_2535764. Recognizes the type 1, 2A and 2X antibodies) and Alexa 488 goat anti-mouse IgM (Thermo Fisher Scientific Cat# A-21042 Lot# RRID: AB_2535711. Recognizes type 2B antibody). The slides were washed 3 times again with PBS 1x and mounted using VectaShield anti-fade solution (Vector Laboratories Cat# H-1000 Lot# RRID:AB_2336789). Images were acquired using an air objective (10x, 0.25NA) in a fluorescence microscope (Leica DM2500) coupled to a Leica DFC 345FX camera and visualized in a computer. Excitation light came from a 100W Hg lamp, and an FITC filter was used to collect emitted light. Whole muscle cross sections were imaged for analysis. Each fiber type was expressed as a percentage of the total number of fibers counted in a whole muscle section. Stained sections were also used to analyze the CSA of type identified muscle fibers. Each antibody was validated using appropriate negative controls, which included sections not incubated with primary antibodies (data not shown).

2.4. Reverse transcription and qPCR

The EDL and soleus muscles were rapidly removed from animals, immersed in RNA lysis solution (Sigma-Aldrich) to avoid RNA degradation, and stored for 24 h at 4 °C and at –20 °C until processing. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, San Diego, CA) and treated with DNase Amplification Grade (RNase-free) (Sigma AMP-D1). After reverse transcription (RT-PCR) using the M-MLV enzyme (M-MLV RT, Promega, M1705), 40 ng of the generated cDNA was used for qPCR. The endogenous GAPDH (internal control) Fw: TGCG ACTTCAACAGCAACTC; Rv: ATGTAGGCCATGAGGTCCAC; Myogenin Fw: CACTCCCTTACGTCCATCGT; Rv: CAGGACAGCCCCACTTAAA; MyoD Fw: GGCCACTCAGGTCTCAGGTGT; Rv: TGTTGCACTACACAGCATCCCT; Pax-7 Fw: AAAAGCACCAAGCCAAGACC; Rv: GCACACATCCCCTCACACC; PGC1- α Fw: CCCTGCCATTGTTAAGACC; Rv: TGC TGCTGTCTCTGTTTTC; MTND-1 Fw: GTTGGTCCATACGGCATTTC; Rv: TGGGTGTGGTATTGGTAGGG; Atrogin1 Fw: GCAGAGAGTCGGCAA GTC; Rv: CAGGTCGGTGATCGTGAG and MuRF1 Fw: TGGAAACGCTA TGGAGAACC; Rv: ATTCGCAGCCTGGAAGATG were amplified. SYBR green reagent (SYBR[®] Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) was used in ViiA[™] 7 System (Applied Biosystems) real-time cyler that allows automatic melting curve analysis. A single melt peak for each reaction confirmed the identity of each PCR product. The relative comparative Cycle Threshold (CT) method was applied to compare gene expression levels between groups, using the equation $(2)^{-\Delta\Delta CT}$ (Pcr and Pfaffl, 2001). The expression level of WT and VChT-KD^{HOM} genes were normalized to GAPDH as an internal control and no differences were found in GAPDH CTs between EDLs from WT and VChT-KD^{HOM} mice. Myogenin (WT: 13.2 \pm 0.1 and VChT-KD^{HOM}: 13.2 \pm 0.28). MyoD (WT: 13.1 \pm 0.1 and VChT-KD^{HOM}: 13.1 \pm 0.27). MTND-1 and Pax-7 (WT: 13.4 \pm 0.1 and VChT-KD^{HOM}: 13.9 \pm 0.32). Atrogin-1, MuRF-1 and PGC1- α (WT: 13.4 \pm 0.08 and VChT-KD^{HOM}: 14 \pm 0.38). Soleus: Myogenin (WT: 14.8 \pm 0.3 and VChT-KD^{HOM}: 14.1 \pm 0.2). MyoD (WT: 14.5 \pm 0.3 and VChT-KD^{HOM}: 14 \pm 0.2). MTND-1 and Pax-7 (WT: 14.8 \pm 0.3 and VChT-KD^{HOM}: 14.4 \pm 0.2). Atrogin-1, MuRF-1 and PGC1- α (WT: 14.7 \pm 0.3 and VChT-KD^{HOM}: 14.1 \pm 0.2). Expression changes reflect fold differences between WT mice (control) and VChT-KD^{HOM} mice. RNA sequences are available at GenBank data base in: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.5. Transmission electron microscopy (TEM)

For ultrastructure analyses, we used the protocol described by Rodrigues et al. (2013). Briefly, EDL and soleus muscles from WT and VChT-KD^{HOM} were fixed by ice-cold modified Karnovsky fixative (4%

paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer) and maintained in this solution for at least 24 h at 4 °C. After fixation, samples were washed with cacodylate buffer (0.1 M- EMS), cut into several pieces, post-fixed in reduced osmium (1% osmium tetroxide in cacodylate buffer containing 1.6% potassium ferrocyanide-EMS), contrasted *en bloc* with uranyl acetate (2% uranyl acetate in deionized water- EMS), dehydrated through an ascending series of ethanol solutions followed by acetone and embedded in EPON 812 resin kit (EMS). Blocks were sectioned (50 nm) and collected on 200 or 300 mesh copper grids and contrasted with lead citrate (EMS). Sections were viewed with a Tecnai- G2-Spirit-FEI/Quanta electron microscope (120 kV Philips) located at Microscopy Center – UFMG.

2.6. Behavioral tests

2.6.1. Open field

The open field test was used to analyze spontaneous locomotor activity (Ferreira-Vieira et al., 2014; Sousa et al., 2006). The test was performed in a box (50 \times 50 cm) with the floor divided into 16 equal squares. The mice were individually placed in the back corner of the left side and allowed to explore the open field for 300s. The spontaneous locomotor activity was measured using sensors located at the base of the boxes connected to a computer where a software automatically determined the number of segments crossed, known as *crossing* (horizontal locomotion) (Vianna et al., 2000).

2.6.2. Wire-hang

The wire-hang test is a useful tool to evaluate motor strength in rodents, and the experiments were performed according to Sango et al. (1996) and Prado et al. (2006). Mice were habituated at the behavioral room 2 h before the test. We placed each animal individually in the top of a wire cage lid (22 \times 22 cm) and then the lid was gently turned upside down by the investigator. The latency of mice to lose their grip and fall off the lid was visually evaluated in three trials with a cutoff time of 60s.

2.6.3. Rotarod

The rotarod test was used to assess motor coordination in our experimental model (Ingram et al., 1981). The apparatus consists of a rotating cylinder. The time animals take to fall from the rotating rod is registered automatically. We used the protocol described by Prado et al. (2006) with minor modifications to account for the age of the mice tested in this study. First, mice were acclimated three consecutive days to the rotarod apparatus (Insight Equipments, Ribeirão Preto, Brazil) with the device turned off. Second, each mouse was gently placed on the rod, and the rotation speed was set to 7 rpm. The training session consisted of three trials. Four hours later, animals were tested using a non-accelerating protocol (rotation maintained at 7 rpm). The performance of each animal on the rotarod represents the average of three independent tests.

2.7. Maximal incremental test (M.I.T)

An electric treadmill (EP - 132 - INSIGHT, Ribeirão Preto, Brazil) was used to evaluate mice maximal aerobic capacity. The initial speed was set at 10 cm per seconds (cm/s) for 5 min through five days (Familiarization Period). The Maximal Incremental Test (MIT) starts with the speed at 10 cm/s then increases 5 cm/s every 3 min, at a 5% grade, until the animal stops running and is fatigued. Fatigue is defined by the refusal of the mouse to continue moving on the treadmill belt more than 10 s. A mild electrical stimulus (0.2 mA) was applied to the mice that stepped off the treadmill to keep them exercising. For oxygen consumption mice were weighed and placed individually into the gas chamber coupled to the test treadmill using continuous recorders of oxygen consumption (VO₂) with an open-flow indirect calorimeter (LE405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Spain). VO₂ (mlO₂/

kg/min) was continuously recorded on-line, every minute at rest and during the fatiguing exercise protocol (exercise protocol) and then analyzed using a computerized system (Metabolism V 2.2.01, Harvard Apparatus, Spain). In the first 30 min, the animals were placed in the treadmill coupled to a gas chamber for measurements of the basal VO_2 . Immediately after this time, the treadmill was turned on and mice started to run following the test protocol. At the end of the test the VO_2 peak was selected for analysis. Workload (W) was calculated as $W = [\text{body weight (kg)}] \times [\text{time to fatigue}] \times [\text{treadmill speed (m/min)}] \times [\sin \theta (\text{treadmill inclination})]$.

2.8. Pharmacological treatment

Six month old WT and VACHT-KD^{HOM} mice were treated with the acetylcholinesterase inhibitor pyridostigmine (Sigma-Aldrich) (i.p., 1 mg/kg) for 28 days with two doses per day, according to Prado et al. (2006). At the end of the treatment period, animals were sacrificed, then EDL and soleus muscles were excised for histology analysis as described above.

2.9. Statistical analysis

All data were analyzed using Microsoft Excel and GraphPad Prism 5. The histology data represent the mean \pm SEM of least 500 muscle fibers CSA summarized in tables. Before defining the statistical tests, data was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov normality test to address whether or not the data followed a Gaussian distribution. Statistical significance was evaluated using the unpaired Student's t-test when data was normally distributed or Mann-Whitney test for non-Gaussian

distribution. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis, and a post hoc Newman-Kuls or Dunn's multiple comparison test was performed when appropriate, as described in the text. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant. All behavioral, molecular, electron microscopy and maximal incremental tests experiments were conducted with researchers "blind" to the genotypes of the mice, except for histological and fiber typing analysis. Each genotyped animal was assigned a code that was revealed to the investigator after completing analysis. In this work we used between $n = 3$ –7 animals per genotype for each data set to detect a difference at 95% confidence interval ($\alpha = 0.05$) and 0.8 power. The exact n for each experimental procedure is described in the figure legends, as well as p values. All data points were treated as outliers and excluded from the data analysis using the Graph Pad QuickCalcs outlier calculator available at (<https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>).

3. Results

First, we evaluated the long-term effects of decreased ACh on the morphology of muscle fibers in the gastrocnemius muscle. Gastrocnemius muscle cross-sections from VACHT-KD^{HOM} and wild type (WT) mice were stained with antibodies against different fiber types and with toluidine blue to visualize muscle fiber subtypes and their cross-sectional area (CSA), respectively (Fig. 1A–B). We found that muscle fibers in the gastrocnemius muscle of VACHT-KD^{HOM} are on average 14% smaller compared to WT mice (Fig. 1C–D). We also found fewer type 2B fibers in the gastrocnemius muscles of VACHT-KD mice ($28 \pm 1.46\%$) compared to WT ($48.4 \pm 5.07\%$). Interestingly, we found more type 2X in VACHT-KD^{HOM} mice ($34.7 \pm 5.1\%$) compared

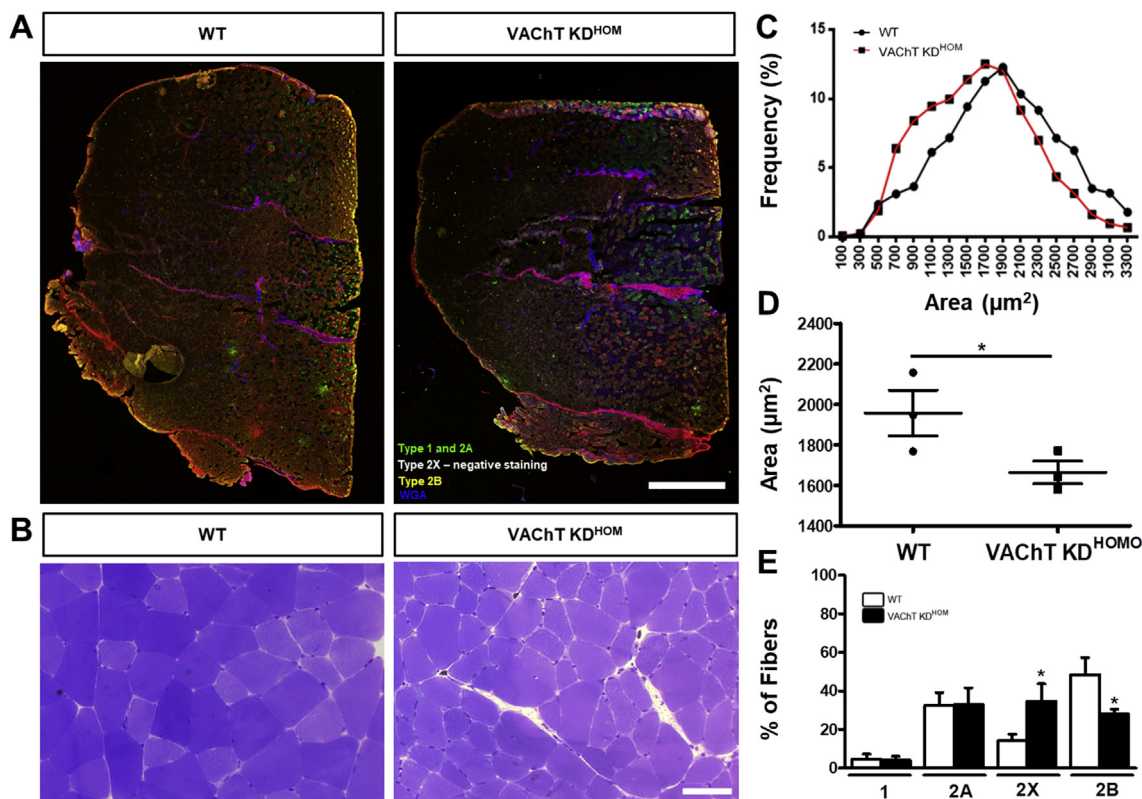


Fig. 1. Gastrocnemius muscle from VACHT-KD^{HOM} mice are atrophied and exhibit fiber type shift. A–B: Representative images of the whole gastrocnemius muscle stained for the different fiber types (A) cross-section of fibers marked with toluidine blue (B), showing smaller muscle fibers in the VACHT-KD^{HOM} mice (B) when compared with WT. Scale bar = 1000 μm (A) 50 μm (B). C: Frequency distribution histogram of gastrocnemius muscle fibers Cross-Sectional-Area (CSA). D: CSA mean values for VACHT-KD^{HOM} mice compared with WT mice ($*p < 0.05$; one-tailed unpaired Student t-test, $n = 3$ animals per genotype). E: Fiber type analysis showing reduced type 2B and increase in type 2X fibers in VACHT-KD^{HOM} mice. We analyzed one muscle cross-section for each animal, and a total of 3152 myofibers were evaluated for both genotypes ($*p < 0.05$; Unpaired Student t-test, $n = 3$ animals per genotype). In D and E, values represent mean \pm SEM. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

to WT ($14.2 \pm 1.91\%$). We next examined muscle fibers in the predominantly fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscle. Muscle fibers in the EDL were on average 22% smaller in VACHT-KD^{HOM} mice compared to WT (Fig. 2A and Table 1). This overall reduction in muscle fiber size was due to decreased CSA in types 2X and 2B fibers in the EDL of VACHT-KD^{HOM} (Fig. 2B–D and Table 1). The EDL muscle is composed mainly of fast-glycolytic muscle fibers (type 2X and 2B) and few fast oxidative-glycolytic muscle fibers (type 2A) (Bloemberg and Quadrilatero, 2012). Interestingly, the EDL muscles in VACHT-KD^{HOM} mice also have fewer muscle fibers (Table 1), suggesting that either muscle fibers failed to form or degenerate postnatally. Based on this observation, we determined the number of each muscle fiber type populating the EDL muscle in VACHT-KD^{HOM} and WT mice. While Type 2B fibers were reduced, type 2X fibers were increased in VACHT-KD^{HOM} mice compared with WT mice (Table 1). This analysis showed similar numbers of type 2A muscle fibers between genotypes demonstrating that these changes were specific to fast glycolytic muscle fibers (2B and 2X). The shifts in type 2X/2B ratio in the gastrocnemius and EDL muscles suggest that reduced cholinergic transmission either causes

type 2B to dedifferentiate into type 2X or slows the differentiation of type 2X into type 2B muscle fibers.

The reduced size and number of muscle fibers in the EDL muscle of VACHT-KD^{HOM} mice also indicates that reduced cholinergic transmission results in the activation of pro-atrophy genes. To look into this possibility, we examined levels of Atrogin-1 and MuRF1, both involved in the activation of the ubiquitin-proteasome system (Sacheck et al., 2004). Unexpectedly, Atrogin-1 is reduced and MuRF-1 remains unchanged in the EDL muscle of VACHT-KD^{HOM} compared with WT mice (Table 1). We then examined levels of Pax-7, Myogenin, and MyoD, three genes important for muscle biogenesis and maintenance. We found MyoD and Myogenin reduced in the EDL muscles of VACHT-KD^{HOM} mice (Table 1). However, levels of Pax-7 remain unchanged in the EDL muscles of VACHT-KD^{HOM} mice (Table 1). Next, we examined levels of two mitochondria-related genes important in skeletal muscles. PGC1- α promotes mitochondrial biogenesis (Yoon et al., 2001) and MTND-1 is a mitochondrial DNA (mtDNA) encoding complex I gene associated with mitochondrial respiratory chain (Mimaki et al., 2012). No significant difference was found in PGC1- α expression between

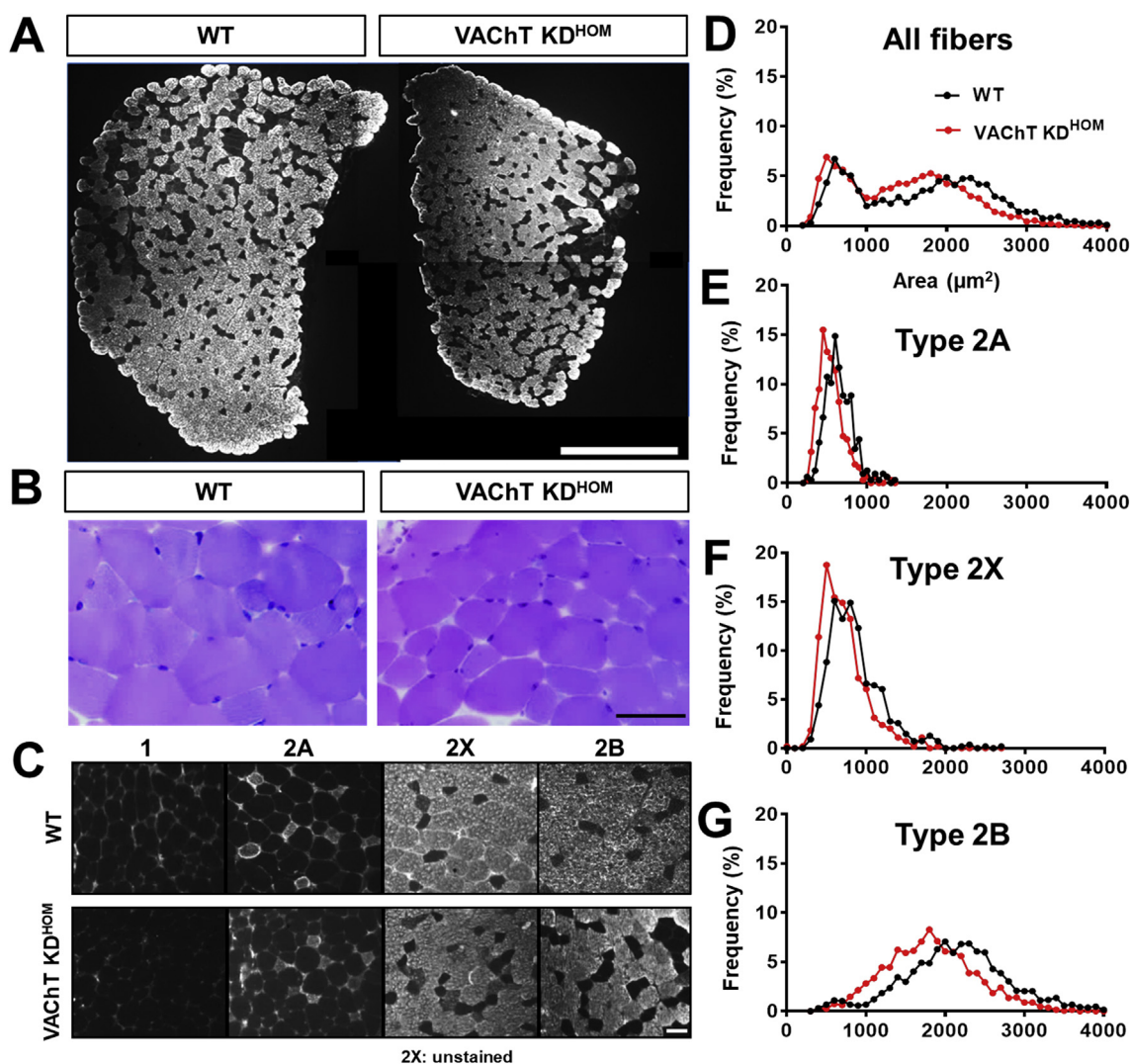


Fig. 2. Fast-twitch EDL from VACHT-KD^{HOM} mice shows reduction of whole muscle area, fiber type atrophy and fiber type shift. **A:** Images of the whole EDL muscle from WT and VACHT-KD^{HOM} mice labeled with type 2B antibody showing reduced CSA. Scale bar = 0.5 mm². **B:** Representative images from sections of EDL from WT and VACHT-KD^{HOM} mice stained with toluidine blue showing increased number of small muscle fibers in the VACHT-KD^{HOM} mice compared with WT. Scale bar = 50 μ m. **C:** Images of the EDL from WT and VACHT-KD^{HOM} mice labeled with antibodies against different fiber types showing reduced type 2B and increased type 2X fibers expression in VACHT-KD^{HOM}. Scale bar = 50 μ m. **D–G:** Histogram of CSA values showing increased number of small muscles fibers in EDL from VACHT-KD^{HOM} mice. For cross-sectional area (CSA) muscle analysis we evaluated a total of 2767 fibers: 316 for type 2A, 544 for type 2X, and 1907 for type 2B n = 5 WT and 7 VACHT-KD^{HOM} mice. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

VACHT-KD^{HOM} mice and WT mice (Table 1). However, MTND-1 was reduced by 36% in VACHT-KD^{HOM} mice (Table 1). These findings show that myogenesis and mitochondria function are impaired, and potentially contribute to the decreased number and size of muscle fibers in the EDL muscles of VACHT-KD^{HOM} mice.

The soleus muscle is quite different from the EDL muscle in several respects. It is primarily composed of slow-twitch muscle fibers, it is tonically active, and functions in maintaining posture (Di Giulio et al., 2009). We thus asked if reducing ACh levels has a similar effect on the soleus as observed above in the EDL muscles. In stark contrast to the EDL muscle, we found that muscle fibers are approximately 11% larger in the soleus muscle of VACHT-KD^{HOM} mice compared to WT mice (Fig. 3D and Table 2). Both type 1 and 2A muscle fibers were enlarged by 8% and 17%, respectively in VACHT-KD^{HOM} mice compared to WT mice (Fig. 3C–G and Table 2). Moreover, the ratio of type 1 to type 2A muscle fiber is higher in the soleus muscle of VACHT-KD^{HOM} compared to WT mice (Table 2). Despite the increased size of muscle fibers, the overall size of the soleus muscle was indistinguishable between VACHT-KD^{HOM} and WT mice (Fig. 3A and Table 2). The overall size of the

soleus muscle remains unchanged because it contains fewer, yet larger, muscle fibers in VACHT-KD^{HOM} compared to WT mice (Table 2).

To further examine the impact of reducing ACh on the soleus muscle, we again assessed expression levels of genes associated with muscle atrophy, biogenesis, and maintenance. In contrast to the EDL muscle, Atrogin-1 and MuRF1 levels are 1.7 and 1.4 fold higher, respectively, in VACHT-KD^{HOM} mice (Table 2). Likewise, Pax-7 and MyoD are 2.9 and 2 fold higher, respectively, in the soleus muscle of VACHT-KD^{HOM} mice (Table 2). Additionally, the metabolic modulators, PGC1- α and MTND-1, are both increased in the soleus muscle of VACHT-KD^{HOM} mice (Table 2). Together, these data show that decreasing ACh levels has a different effect on the soleus muscle, and particularly on type 1 muscle fibers, compared to the EDL muscle and fast type muscle fibers.

We used transmission electron microscopy (TEM) to visualize the subcellular composition of slow and fast-twitch muscles under reduced cholinergic transmission. In the EDL muscle of WT mice, as expected, the Z-line (white arrows) (Fig. 4A), triads (sarcoplasmic reticulum-SR and T-tubules) (white arrows-head) (Fig. 4B), mitochondria (red arrows-head) (Fig. 4B), and sarcomeres (red asterisks) (Fig. 4B) appear

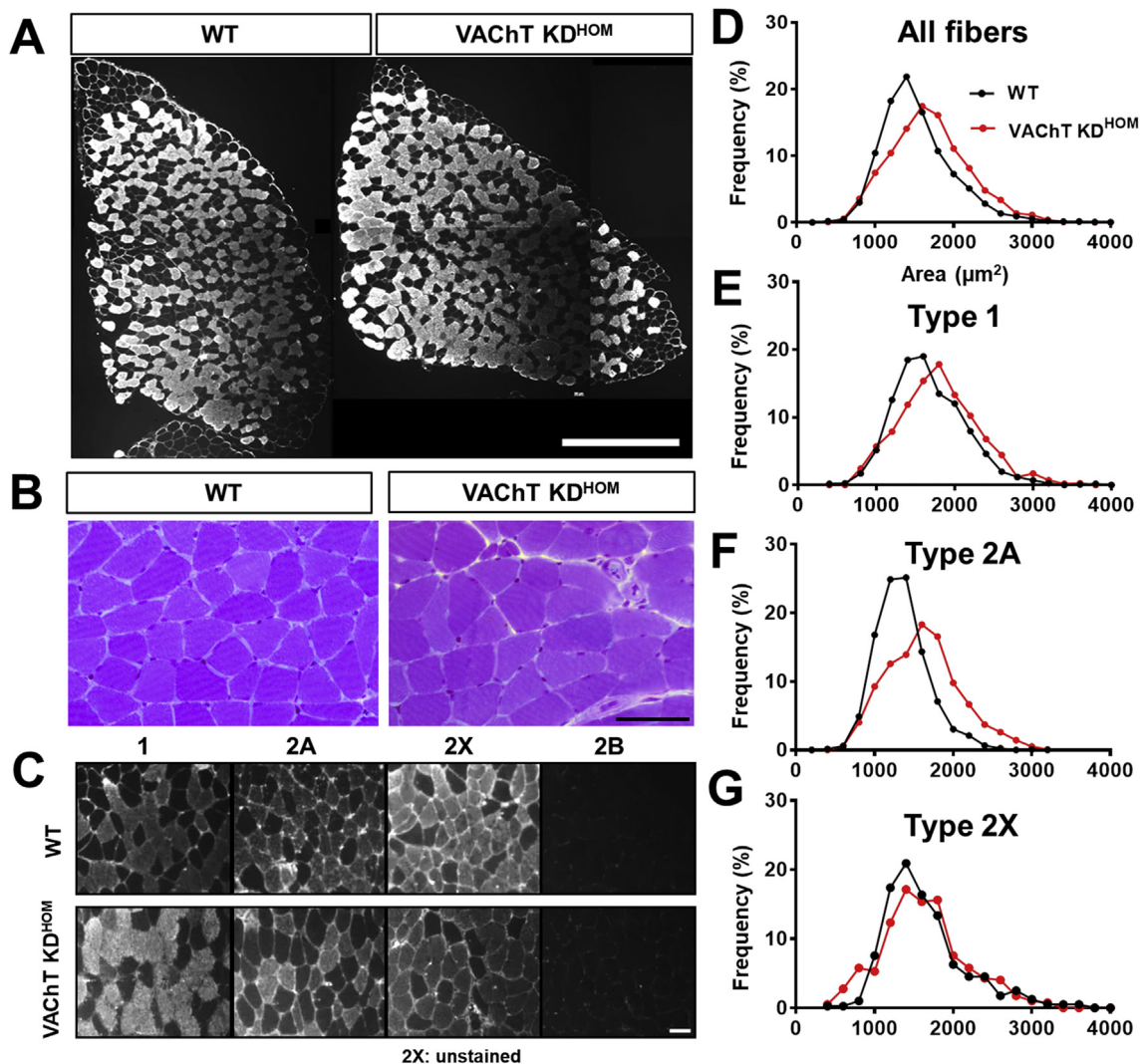


Fig. 3. Slow-twitch soleus from VACHT-KD^{HOM} mice shows muscle fibers hypertrophy and fiber type shift. **A:** Images of the whole soleus muscle from WT and VACHT-KD^{HOM} mice labeled with type 1 antibody. No changes were observed. Scale bar = 0.5 mm². **B:** Representative images from sections of soleus from WT and VACHT-KD^{HOM} mice stained with toluidine blue. Traced rectangle shows newly formed muscle fibers. Scale bar = 50 μ m. **C:** Images of the soleus from WT and VACHT-KD^{HOM} mice labeled with antibodies against different fiber types showing increased type 1 and reduced type 2A fibers expression in VACHT-KD^{HOM}. Scale bar = 50 μ m. **D–G:** Histogram of CSA values showing increased number of muscle fibers with larger CSA in soleus from VACHT-KD^{HOM} mice. For cross-sectional area (CSA) muscle analysis we evaluated a total of 2835 fibers: 1104 for type 1, 1186 for type 2A, and 397 for type 2X n = 6 WT and 7 VACHT-KD^{HOM} mice. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

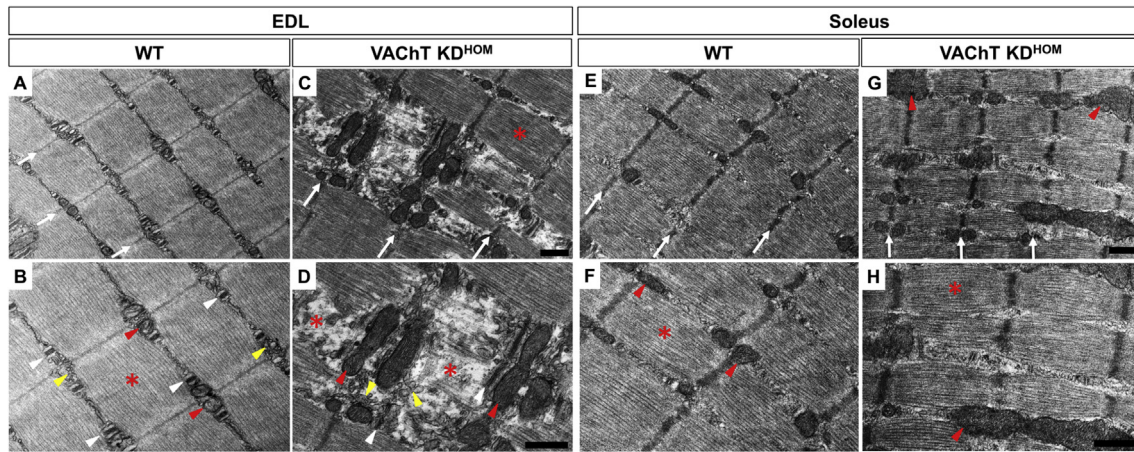


Fig. 4. Myofibrils of the fast-twitch EDL from VAcHT-KD^{HOM} mice show signs of degeneration while slow-twitch soleus is preserved. **A–B:** Images in the upper and lower panels are 16,500x and 26,500x, respectively. **A:** Representative images of the EDL muscle fibers from WT showing correct alignment of the Z-lines (white arrows) (A), normal triads (white arrows-head) (B), normal-shaped mitochondrial profiles (red arrows-head) (B), normal sarcoplasmic reticulum located between myofibrils (yellow arrows-head) and preserved sarcomere (red asterisk) (B). **C–D:** Representative images of EDL muscle fibers from VAcHT-KD^{HOM} mice showing myofibrils disruption (red asterisks) (D), abnormal and misplaced T-tubules (white arrows-head) (D), abnormal elongated T-tubules (white arrows-head) (D), elongated mitochondrial profiles associated to degenerated regions (red arrows-head). Normal sarcomere in C. **E – F:** Representative images of the soleus from WT showing preserved muscle fibers. Alignment of Z-lines (E) (white arrows), normal size mitochondrial profiles (F) (red arrows-head), and regular sarcomere (F) (red asterisks). **G – H:** The soleus from VAcHT-KD^{HOM}, shows preserved sarcomeres (red asterisks). The mitochondrial profiles from VAcHT-KD^{HOM} mice are more frequent (H) (red arrows-head). We evaluated at least 15 images from three different animals for each genotype. Scale bar = 500 nm. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

normal. In contrast, muscle fibers of the EDL from VAcHT-KD^{HOM} mice present discontinuous Z-lines (white arrows) (Fig. 4C) and disruption of myofibrils (separation of the thin and thick myofibrils) of some sarcomeres (red asterisks) (Fig. 4D). Quantitatively, the number of disrupted sarcomeres is 6.2 times higher in VAcHT-KD^{HOM} mice compared to WT mice (WT: 5.7 ± 3.3 and VAcHT-KD^{HOM}: $35.6 \pm 9.1\%$, $p = 0.03$). These muscle fibers also exhibit abnormal T-tubules, which are more elongated than normal, and lack typical triads (white arrows-head) (Fig. 4D). The SR also exhibits abnormal, swelled, and misplaced vacuole-like structures (yellow arrows-head) (Fig. 4D). Moreover, we found elongated mitochondrial profiles located in the regions of muscle fibers associated with degraded myofibril regions (red arrows-head) (Fig. 4D). In stark contrast to the EDL muscle, fibers in the soleus muscle from VAcHT-KD^{HOM} mice exhibit preserved components, such

as correct alignment and continuity of the Z-lines (white arrows) (Fig. 4E–G), and sarcomere integrity (red asterisk) (Fig. 4F–H). In agreement with increased PGC1- α and MTND-1 levels, mitochondria are more prevalent in muscle fibers in the soleus muscle of VAcHT-KD^{HOM} compared to WT mice (Fig. 4G–H).

To assess the function of the gastrocnemius, soleus, and EDL muscles, we performed a series of behavior and oxygen consumption tests in VAcHT-KD^{HOM} and WT mice. Oxygen consumption while resting and under maximal intensity was measured using a maximal incremental test (MIT). The duration, distance, maximum velocity (V_{max}), the work, and oxygen handling parameters were evaluated. We found a significant reduction in the MIT duration and distance (Table 3) in VAcHT-KD^{HOM} mice. The maximum velocity is also reduced (Table 3). Additionally, the work performed is significantly reduced in VAcHT-

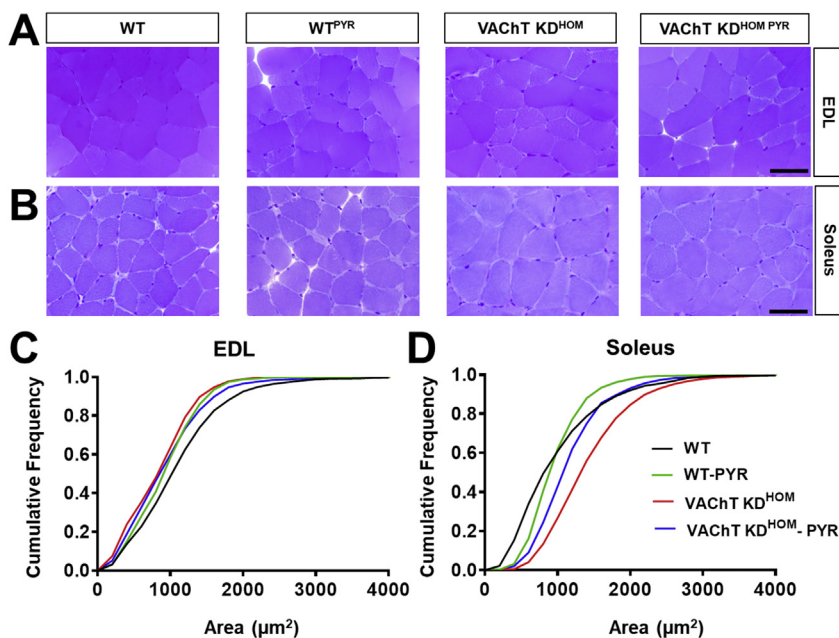


Fig. 5. Pyridostigmine (PYR) treatment partially reverses morphology alterations in EDL and soleus muscles in VAcHT-KD^{HOM} mice. **A–B:** Images of EDL (A) and soleus (B) muscle fibers from WT and VAcHT-KD^{HOM} mice treated and non-treated with PYR. **C.** Cumulative frequency of muscle fibers areas of the EDL from WT and VAcHT-KD^{HOM} mice showing VAcHT-KD^{HOM}-PYR partially restoring muscle fibers to WT values. **D.** In the Soleus, VAcHT-KD^{HOM}-PYR partially restored the sizes of its muscle fibers. For the EDL and soleus at least 1130 and 1573 myofibers, respectively, were analyzed from three animals per genotype/treatment.

KD^{HOM} mice compared to WT mice (Table 3). Despite these differences, the oxygen consumed is the same between genotypes while resting and under MIT (Table 3). This finding is more surprising given that VACHT-KD^{HOM} mice weigh significantly less than WT mice (Table 3).

Given that skeletal muscles may be similarly affected in individuals with VACHT mutations, we tested if increasing the levels of ACh at the synaptic cleft reverses the functional and morphological features found in VACHT-KD^{HOM} mice. To address this, WT and VACHT-KD^{HOM} mice were treated with the cholinesterase inhibitor pyridostigmine (1 mg/kg, twice daily) for 28 days. We then compared the muscle fiber average CSA among the different treatments and genotypes in the EDL and soleus muscles. In this case, we specifically compared the distribution of muscles sizes using a cumulative frequency graph (Fig. 5C and D) due to the inherent high variability of muscle sizes across genotypes and following pyridostigmine treatments. This analysis revealed that pyridostigmine partially restores the size of muscle fibers in the EDL of VACHT-KD^{HOM} mice (Table 4 and Fig. 5A and C). Although the treatment reduces the CSA of WT-treated compared with non-treated WT mice (Table 4 and Fig. 5C), the size of muscle fibers in non-treated VACHT-KD^{HOM} mice remains reduced compared to treated WT mice (Fig. 5A and C). In the soleus muscle, pyridostigmine partially reduces the hypertrophy observed in VACHT-KD^{HOM} muscle fibers (Fig. 5B and D). These findings led us to ask if pyridostigmine treatment improves motor function in VACHT-KD^{HOM} mice. We found that animals treated with pyridostigmine perform better in the open-field task (Table 4). VACHT-KD^{HOM} mice treated with pyridostigmine did not perform better in the rotarod or wire-hanging test based on a Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test. However, intra-genotype comparisons revealed that VACHT-KD^{HOM} mice treated with pyridostigmine perform 2.5 times better on both tests compared with vehicle treated VACHT-KD^{HOM} mice (Table 4). These differences were significant using a two-tailed unpaired student t-test.

4. Discussion

Most CMS cases are related to mutations in postsynaptic proteins and the prevalence of pre-synaptic mutations are very rare and, until now, only found in *SNAP25B* (Shen et al., 2014), *Synaptotagmin-2* (Herrmann et al., 2014), *Synaptobrevin-1* (Shen et al., 2017), *MUNC13-1* (Engel et al., 2016), *ChAT* (Byring et al., 2002; Ohno et al., 2001), and *CHT-1* (Bauché et al., 2016). However, recent reports revealed congenital myasthenia in individuals caused by mutations in the *VACHT* gene (Aran et al., 2017; Schwartz et al., 2018; O'Grady et al., 2016). Using VACHT mouse models to study CMS (VACHT-KD^{HOM} and VACHT-Knockout), our group has found motor (Prado et al., 2006), cardiac (Lara et al., 2010), and synaptic (de Castro et al., 2009; Lima et al., 2010; Prado et al., 2006; Rodrigues et al., 2013) alterations that resemble some of the features later discovered in patients with VACHT mutations (O'Grady et al., 2016; Aran et al., 2017; Schwartz et al.,

2018). For example, we previously showed that NMJs in the diaphragm from VACHT-KD^{HOM} mice exhibit several abnormalities, including altered recycling of synaptic vesicles (Rodrigues et al., 2013). Those published findings led us to hypothesize that reduced cholinergic transmission may differentially affect the size and biochemical properties of muscle fiber subtypes. Thus, in the present study, we investigated the impact of lowering ACh on the fast-contracting EDL, the slow-contracting soleus, and the gastrocnemius muscles.

4.1. Fast type muscle fibers are preferentially affected by reduced cholinergic transmission

Different mouse models of neuromuscular disorders have revealed that fast-twitch skeletal muscles are more susceptible to atrophy than slow-contracting muscles (Harandi et al., 2014; Wang and Pessin, 2013; Biral et al., 1989). In addition, denervation or tetrodotoxin (TTX) blockade of nerve impulses preferentially cause the atrophy of fast type muscle fibers in the diaphragm (Aravamudan et al., 2006) and gastrocnemius muscles (Zhan and Sieck, 1992). We found that fast-twitch muscle fiber types (2B, 2X) are smaller in the EDL muscle of VACHT-KD^{HOM} compared with WT mice using light microscopy. Ultrastructural analysis corroborated this finding, and revealed that myofibrils degrade in muscle fibers of the EDL muscle from VACHT-KD^{HOM} mice. Interestingly, the EDL muscle of VACHT-KD^{HOM} mice contained fewer type 2B and more type 2X fibers compared to WT mice. This shift in the ratio of muscle fiber types in fast muscles has also been observed in aged animals (Larsson and Ansved, 1995; Larsson et al. 1993, 1995), where cholinergic transmission has been found to also be altered.

In addition to cellular changes, reduced cholinergic transmission also affects the molecular composition of the EDL muscle. We found that Atrogin-1 is reduced while no changes were found in MuRF1 in the EDL muscle of VACHT-KD^{HOM} mice. This finding was surprising because muscle fibers atrophy in the EDL muscle of adult VACHT-KD^{HOM} mice, and Atrogin-1 and MuRF1 promote muscle atrophy when induced (Bodine and Baehr, 2014). However, the pro-myogenic genes MyoD and myogenin are reduced in the EDL of VACHT-KD^{HOM} mice. In addition to playing critical roles in muscle biogenesis, myogenin and MyoD also regulate the expression of Atrogin-1 and MuRF1 (Bonaldo and Sandri, 2013; Hyatt et al., 2003; Moresi et al., 2010). The observed reduction in myogenin, MyoD, and Atrogin-1 expression in the EDL muscle from VACHT-KD^{HOM} suggests that reduced cholinergic transmission inhibits myogenesis but also atrophy in adult fast type muscles. These findings thus raise the possibility that myogenesis is impaired during developmental stages and/or the growth of newly formed muscle fibers is inhibited in the EDL of adult VACHT-KD^{HOM} mice, potentially accounting for fewer and smaller muscle fibers. This is a possibility that can be assessed in future studies designed to analyze the number and size of muscle fibers during development in addition to myogenin and MyoD expression in VACHT-KD^{HOM} mice. If the formation and growth of

Table 4
Results of the treatment with Pyridostigmine (PYR) on mice muscle histology and behavior.

HISTOLOGY	WT	WT ^{PYR}	VACHT-KD ^{HOM}	VACHT-KD ^{HOM} PYR	Statistics
EDL – CSA (μm ²)	1191 ± 28.9	998.7 ± 24.8 ^a	936.5 ± 23 ^a	1009 ± 28.4 ^a	p = 0.0007 [#]
Soleus – CSA (μm ²)	1199 ± 364	1031 ± 59.1	1535 ± 168.7	1258 ± 97.7	NS [#]
BEHAVIOR	WT	WT ^{PYR}	VACHT KD ^{HOM}	VACHT KD ^{HOM} PYR	Statistics
Open-field	95 ± 27	106.4 ± 18	46 ± 11 ^{ab}	83.4 ± 16.7 ^c	p = 0.0007 [#]
Rotarod (s)	225 ± 100	271 ± 64	104 ± 60.3 ^b	263 ± 29	p = 0.03
Wire-hang (s)	28.4 ± 10	39.2 ± 6.2	5.0 ± 1.1 ^{ab}	12 ± 2.1	p = 0.0007

Statistical analysis was deployed to compare differences between at least 3 WT and 3 VACHT-KD^{HOM} mice. Values represent Mean ± SEM. Statistics for rotarod and wire-hang: Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test. For the EDL, at least 1130 myofibers in a n = 3 animals per genotype/treatment were analyzed. In soleus, at least 1573 myofibers in a n = 3 animals per genotype/treatment were analyzed. For behavior n = 5 animals per genotype/treatment. ^a Statistically different from WT; ^b different from WT^{PYR}; ^c different from VACHT-KD^{HOM}. [#]One-way ANOVA followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

muscle fibers is disrupted in the EDL muscle of VACHT-KD^{HOM}, it would resemble findings reported following analysis of the R6/2 mice model for Huntington's disease where muscle fiber maturation is also impaired and partly due to progressive Cl-channel defects (Miranda et al., 2017). Irrespective, our findings show that reducing cholinergic transmission by 65% is deleterious to fast type muscle fibers.

4.2. Type 1 muscle fibers size increase under reduced cholinergic transmission

In contrast to the EDL, reduced cholinergic transmission causes muscle fibers in the soleus to hypertrophy. This finding was unexpected because the soleus is a tonic muscle, and we thus expected that reducing ACh by 65% would be detrimental to the viability of the soleus muscle. What could then account for the increased size of muscle fibers in the soleus muscle? One possibility is that atrophy of the gastrocnemius increases the functional load on the soleus to maintain balance thereby leading to compensatory hypertrophy of muscle fibers in the soleus. This possibility is supported by published studies showing that compensatory hypertrophy occurs in the soleus muscle (Allen et al., 2001) (Hanzlíková et al., 1975; Minderis et al., 2016). Another possibility, not mutually exclusive, is that type 1 fibers, which make a large proportion of the soleus muscle, resist degeneration and instead hypertrophy when cholinergic transmission is reduced. In this regard, Pax-7 and MyoD are both increased in the soleus muscle of VACHT-KD^{HOM} mice, both genes important for myogenesis. Thus, mechanical overload could promote the proliferation of Pax-7-expressing satellite cells, thereby leading to increased expression of myogenic factors. However, the increased oxidative profile of the soleus muscle in VACHT-KD^{HOM} mice suggests an alternative possibility. In these mice, the soleus is populated by more type 1 muscle fibers and has augmented expression of PGC1- α , and MTND-1. Accompanying these changes was a loss of type 2A muscle fibers, further indicating that muscle fibers with a fast type profile are more affected by reduced cholinergic transmission preferentially. These changes are also found in aged skeletal muscles, where there is a shift from fast to slow fiber types (Holloszy et al., 1991; Larsson and Ansved, 1995; Miljkovic et al., 2015; Thompson, 1994). Therefore, it may be possible that the changes observed in the soleus muscle of VACHT-KD^{HOM} mice are more indicative of a premature aged phenotype.

4.3. Reduced cholinergic transmission impacts physical capacity

Previous data has shown that mice with reduced VACHT expression perform worse than WT mice in running tests (Prado et al., 2006). Here, in addition to the treadmill test, we measured oxygen consumption, a gold standard for the evaluation of aerobic capacity (Petrosino et al., 2016; Silva et al., 2016; Speakman, 2013). Interestingly, despite the reduction in duration, distance, and Vmax, VACHT-KD^{HOM} and WT mice consumed the same oxygen amount during the tests. This result may be due to the lower mechanical efficiency of the VACHT-KD^{HOM} mice resulting from cardiac dysfunction (Lara et al., 2010).

4.4. Pyridostigmine treatment reverses muscle pathology caused by reduced cholinergic transmission

Ultimately, the increased availability of ACh in the synaptic cleft caused by pyridostigmine partially reverses EDL atrophy and soleus hypertrophy in our mice. In addition, performance in open field, rotarod, and wire hanging are partially improved in comparison with non-treated mice. Since pyridostigmine acts preferably at the level of the peripheral nervous system, these results indicate that the reduced performance in the tests is due to abnormalities in hind limb muscles, including those analyzed herein. In our pyridostigmine treated mice, we cannot rule out an effect of increased ACh availability induced by this cholinesterase inhibitor in presynaptic auto-receptors. Previous work has shown that pyridostigmine increases neurotransmitter released

following each nerve impulse in a mouse nerve muscle preparation (Vizi and Somogyi, 1989). This effect is mediated by nicotinic auto-receptors with positive feedback in the NMJ (Bowman et al., 1990; Starke et al., 1989). In addition, several experiments have shown a modulatory effect of presynaptic ACh release by agonists and antagonists of presynaptic muscarinic receptors (Ganguly and Das, 1979; Wessler, 1989; Santafé et al., 2003). Future experiments will be needed to clarify this point. Importantly, the successful reversion of some of the muscle changes and performance improvement obtained with pyridostigmine treatment of VACHT-KD^{HOM} mice have interesting implications for neuromuscular disorders, such as CMS. Indeed, a mild clinical improvement was observed in patients with a biallelic variant of the VACHT gene that were treated with pyridostigmine (O'Grady et al., 2016). Taken together, these data emphasize the importance of maintaining normal cholinergic activity for preserving the structure of skeletal muscle fibers, and ultimately motor function.

Conflicts of interest

We have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPEMIG [#00271-13]; CNPq [#467220/2014-0, #475735/2013-7] and CAPES. Cristina Guatimosim is a Bolsista de Produtividade em Pesquisa (CNPq). Gregorio Valdez received support from the National Institutes of Health in the US (K01NS085071, R56AG051501 and 1R01AG055545). The authors acknowledge the Center for Acquisition and Processing of Images (CAPI) – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais and the Microscopy Center at Universidade Federal de Minas Gerais for providing the equipments and technical support for experiments involving tissue processing and electron microscopy. We thank Dr. Enrrico Bloise for suggestions on gene analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.jneuint.2018.07.002>.

References

- Allen, D.L., Harrison, B.C., Sartorius, C., Byrnes, W.C., Leinwand, L. a, 2001. Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C637–C645.
- Aran, A., Segel, R., Kaneshige, K., Gulsuner, S., Renbaum, P., Oliphant, S., Meirson, T., Weinberg-Shukron, A., Hershkovitz, Y., Zeligson, S., Lee, M.K., Samson, A.O., Parsons, S.M., King, M.C., Levy-Lahad, E., Walsh, T., 2017. Vesicular acetylcholine transporter defect underlies devastating congenital myasthenia syndrome. *Neurology* 88, 1021–1028. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003720>.
- Aravamudan, B., Mantilla, C.B., Zhan, W.-Z., Sieck, G.C., 2006. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *J. Appl. Physiol.* 100.
- Bauché, S., O'Regan, S., Azuma, Y., Laffargue, F., McMacken, G., Sternberg, D., Brochier, G., Buon, C., Bouzidi, N., Topf, A., Lacène, E., Remerand, G., Beaufre, A.M., Pebrel-Richard, C., Thevenon, J., El Chehadeh-Djebbar, S., Faivre, L., Duffourd, Y., Ricci, F., Mongini, T., Fiorillo, C., Astrea, G., Burloiu, C.M.M., Butoianu, N., Sandu, C., Servais, L., Bonne, G., Nelson, I., Desguerre, I., Nougues, M.C., Bœuf, B., Romero, N., Laporte, J., Boland, A., Lechner, D., Deleuze, J.F., Fontaine, B., Strohlic, L., Lochmuller, H., Eymard, B., Mayer, M., Nicole, S., 2016. Impaired presynaptic high-affinity choline transporter causes a congenital myasthenic syndrome with episodic apnea. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 753–761. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.033>.
- Biral, D., Scarpini, E., Angelini, C., Salviati, G., Margreth, A., 1989. Myosin heavy chain composition of muscle fibers in spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 12, 43–51. <https://doi.org/10.1002/mus.880120109>.
- Bloemberg, D., Quadrilatero, J., 2012. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis. *e35273. PLoS One* 7 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035273>. rPONE-D-11-20138 [pii].
- Bodine, S.C., Baehr, L.M., 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am. J. Physiol. Metab* 307, E469–E484. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>.
- Bonaldo, P., Sandri, M., 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech* 6, 25–39. <https://doi.org/10.1242/dmm.010389>.

- Bowman, W.C., Prior, C., Marshall, I.G., 1990. Presynaptic receptors in the neuromuscular junction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 604, 69–81.
- Brandon, E.P., Lin, W., D'Amour, K. a, Pizzo, D.P., Dominguez, B., Sugiura, Y., Thode, S., Ko, C.-P., Thal, L.J., Gage, F.H., Lee, K.-F., 2003. Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J. Neurosci.* 23, 539–549 [doi:10.1523/JNEUROSCI.23-0539.2003](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-0539.2003) [pii].
- Brooke, M.H., Kaiser, K.K., 1970. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* 23, 369–379. <https://doi.org/10.1001/archneur.1970.00480280083010>.
- Byring, R.F., Pihko, H., Tsujino, A., Shen, X.-M., Gustafsson, B., Hackman, P., Ohno, K., Engel, A.G., Udd, B., 2002. Congenital myasthenic syndrome associated with episodic apnea and sudden infant death. *Neuromuscul. Disord.* 12, 548–553. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(01\)00336-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(01)00336-4).
- Chakkalakal, J.V., Nishimune, H., Ruas, J.L., Spiegelman, B.M., Sanes, J.R., 2010. Retrograde influence of muscle fibers on their innervation revealed by a novel marker for slow motoneurons. *Development* 137, 3489–3499. <https://doi.org/10.1242/dev.053348>.
- Darabid, H., Perez-Gonzalez, A.P., Robitaille, R., 2014. Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. *Nat. Rev. Neurosci.* 1–16. <https://doi.org/10.1038/nrn3821>.
- de Castro, B.M., De Jaeger, X., Martins-Silva, C., Lima, R.D.F., Amaral, E., Menezes, C., Lima, P., Neves, C.M.L., Pires, R.G., Gould, T.W., Welch, I., Kushmerick, C., Guatimosim, C., Izquierdo, I., Cammarota, M., Rylett, R.J., Gomez, M.V., Caron, M.G., Oppenheim, R.W., Prado, M.A.M., Prado, V.F., 2009. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. *Mol. Cell Biol.* 29, 5238–5250. <https://doi.org/10.1128/MCB.00245-09>.
- Di Giulio, I., Maganaris, C.N., Baltzopoulos, V., Loram, I.D., 2009. The proprioceptive and agonist roles of gastrocnemius, soleus and tibialis anterior muscles in maintaining human upright posture. *J. Physiol.* 587, 2399–2416. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.168690>.
- Engel, A.G., Selcen, D., Shen, X.-M., Milone, M., Harper, C.M., 2016. Loss of MUNC13-1 function causes microcephaly, cortical hyperexcitability, and fatal myasthenia. *Neurol. Genet.* 2, e105. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000105>.
- Ferreira-Vieira, T.H., Bastos, C.P., Pereira, G.S., Moreira, F.A., Massensini, A.R., 2014. A role for the endocannabinoid system in exercise-induced spatial memory enhancement in mice. *Hippocampus* 24, 79–88. <https://doi.org/10.1002/hipo.22206>.
- Ganguly, D.K., Das, M., 1979. Effects of oxotremorine demonstrate presynaptic muscarinic and dopaminergic receptors on motor nerve terminals. *Nature* 278, 645–646. <https://doi.org/10.1038/278645a0>.
- Gautam, M., DeChiara, T.M., Glass, D.J., Yancopoulos, G.D., Sanes, J.R., 1999. Distinct phenotypes of mutant mice lacking agrin, *MuSK*, or *rapsyn*. *Dev. Brain Res.* 114, 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00113-9](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00113-9).
- Hanzlíková, V., Macková, E.V., Hník, P., 1975. Satellite cells of the rat soleus muscle in the process of compensatory hypertrophy combined with denervation. *Cell Tissue Res.* 160, 411–421. <https://doi.org/10.1007/BF00222049>.
- Harandi, V.M., Lindquist, S., Kolan, S.S., Brännström, T., Liu, J.X., 2014. Analysis of neurotrophic factors in limb and extraocular muscles of mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 9, e109833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109833>.
- Herrmann, D.N., Horvath, R., Sowden, J.E., Gonzales, M., Sanchez-Mejias, A., Guan, Z., Whittaker, R.G., Almodovar, J.L., Lane, M., Bansagi, B., Pyle, A., Boczonadi, V., Lochmuller, H., Griffin, H., Chinnery, P.F., Lloyd, T.E., Troy Littleton, J., Zuchner, S., 2014. Synaptotagmin 2 mutations cause an autosomal-dominant form of Lambert-Eaton myasthenic syndrome and nonprogressive motor neuropathy. *Am. J. Hum. Genet.* 95, 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.08.007>.
- Holloszy, J., Chen, M., Cartee, G., Young, J., 1991. Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech. Ageing Dev.* 60, 199–213. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(91\)90131-I](https://doi.org/10.1016/0047-6374(91)90131-I).
- Hyatt, J.-P.K., Roy, R.R., Baldwin, K.M., Edgerton, V.R., 2003. Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285, C1161–C1173. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00128.2003>.
- Ingram, D.K., London, E.D., Reynolds, M.A., Waller, S.B., Goodrick, C.L., 1981. Differential effects of age on motor performance in two mouse strains. *Neurobiol. Aging* 2, 221–227. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(81\)90025-7](https://doi.org/10.1016/0197-4580(81)90025-7).
- Katz, B., Miledi, R., 1964. The development of acetylcholine sensitivity in nerve-free segments of skeletal muscle. *J. Physiol.* 170, 389–396. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1964.sp007339>.
- Kljakic, O., Janickova, H., Prado, V.F., Prado, M.A.M., 2017. Cholinergic/glutamatergic co-transmission in striatal cholinergic interneurons: new mechanisms regulating striatal computation. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1111/jnc.14003>.
- Langley, J.N., 1907. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *J. Physiol.* 36, 347–384. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1907.sp001236>.
- Lara, A., Damasceno, D.D., Pires, R., Gros, R., Gomes, E.R., Gavioli, M., Lima, R.F., Guimarães, D., Lima, P., Bueno, C.R., Vasconcelos, A., Roman-Campos, D., Menezes, C.A.S., Sirvente, R.A., Salemi, V.M., Mady, C., Caron, M.G., Ferreira, A.J., Brum, P.C., Resende, R.R., Cruz, J.S., Gomez, M.V., Prado, V.F., de Almeida, A.P., Prado, M.A.M., Guatimosim, S., 2010. Dysautonomia due to reduced cholinergic neurotransmission causes cardiac remodeling and heart failure. *Mol. Cell Biol.* 30, 1746–1756. <https://doi.org/10.1128/MCB.00996-09>.
- Larsson, L., Ansved, T., 1995. Effects of ageing on the motor unit. *Prog. Neurobiol.* [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)98601-Z](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)98601-Z).
- Larsson, L., Biral, D., Campione, M., Schiaffino, S., 1993. An age-related type IIB to IIX myosin heavy chain switching in rat skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 147, 227–234. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09493.x>.
- Larsson, L., Müller, U., Li, X., Schiaffino, S., 1995. Thyroid hormone regulation of myosin heavy chain isoform composition in young and old rats, with special reference to IIX myosin. *Acta Physiol. Scand.* 153, 109–116. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1995.tb09841.x>.
- Leite, H.R., Oliveira-Lima, O.C., de Pereira, L. de M., Oliveira, V.E. de M., Prado, V.F., Prado, M.A.M., Pereira, G.S., Massensini, A.R., 2016. Vesicular acetylcholine transporter knock down-mice are more susceptible to inflammation, c-Fos expression and sickness behavior induced by lipopolysaccharide. *Brain Behav. Immun.* 57, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.005>.
- Lima, R., de F., Prado, V.F., Prado, M.A.M., Kushmerick, C., 2010. Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J. Neurochem.* 113, 943–951. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06657.x>.
- Miljkovic, N., Lim, J.Y., Miljkovic, I., Frontera, W.R., 2015. Aging of skeletal muscle fibers. *Ann. Rehabil. Med.* 39 (2), 155–162. <https://doi.org/10.5535/arm.2015.39.2.155>.
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., 2012. Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1817, 851–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.08.010>.
- Minderis, P., Kilikevicius, A., Baltusnikas, J., Alhindi, Y., Venckunas, T., Bungler, L., Lionikas, A., Ratkevicius, A., 2016. Myostatin dysfunction is associated with reduction in overload induced hypertrophy of soleus muscle in mice. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 26, 894–901. <https://doi.org/10.1111/sms.12532>.
- Miner, J., Noakes, P., Son, Y., 1998. Development of the neuromuscular junction: genetic analysis in mice. *J. Physiol.* 167–172.
- Miranda, D.R., Wong, M., Romer, S.H., McKee, C., Garza-Vasquez, G., Medina, A.C., Bahn, V., Steele, A.D., Talmadge, R.J., Voss, A.A., 2017. Progressive Cl⁻ channel defects revealed disrupted skeletal muscle maturation in R6/2 Huntington's mice. *J. Gen. Physiol.* 149, 55–74. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611603>.
- Misgeld, T., Burgess, R.W., Lewis, R.M., Cunningham, J.M., Lichtman, J.W., Sanes, J.R., 2002. Roles of neurotransmitter in synapse formation. *Neuron* 36, 635–648. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)01020-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01020-6).
- Moresi, V., Williams, A.H., Meadows, E., Flynn, J.M., Potthoff, M.J., McAnally, J., Shelton, J.M., Backs, J., Klein, W.H., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2010. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell* 143, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.004>.
- O'Grady, G.L., Verschuuren, C., Yuen, M., Webster, R., Menezes, M., Fock, J.M., Pride, N., Best, H.A., Benavides Damm, T., Turner, C., Lek, M., Engel, A.G., North, K.N., Clarke, N.F., Macarthur, D.G., Kamsteeg, E.J., Cooper, S.T., 2016. Variants in *SLC18A3*, vesicular acetylcholine transporter, cause congenital myasthenic syndrome. *Neurology* 87, 1442–1448. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003179>.
- O'Neill, G.N., 2006. Inherited disorders of the neuromuscular junction. *Int. Anesthesiol. Clin.* 44 (2), 91–106. <https://doi.org/10.1097/00004311-200604420-00006>.
- Ohno, K., Rahman, M.A., Nazim, M., Nasrin, F., Lin, Y., Takeda, J., ichi, Masuda, A., 2017. Splicing regulation and dysregulation of cholinergic genes expressed at the neuromuscular junction. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1111/jnc.13954>.
- Ohno, K., Tsujino, A., Brengman, J.M., Harper, C.M., Bajzer, Z., Udd, B., Beyring, R., Robb, S., Kirkham, F.J., Engel, A.G., 2001. Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 98, 2017–2022. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.2017>.
- Parsons, S.M., 2000. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J.* 14, 2423–2434. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0203rev>.
- Pcr, R.T., Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in *Nucleic Acids Res.* 29, 16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Petrosino, J.M., Heiss, V.J., Maurya, S.K., Kalyanasundaram, A., Periasamy, M., Lafountain, R.A., Wilson, J.M., Simonetti, O.P., Ziouzenkova, O., 2016. Graded maximal exercise testing to assess mouse cardio-metabolic phenotypes. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148010>.
- Prado, V.F., Martins-Silva, C., de Castro, B.M., Lima, R.F., Barros, D.M., Amaral, E., Ramsey, A.J., Sotnikova, T.D., Ramirez, M.R., Kim, H.G., Rossato, J.I., Koenen, J., Quan, H., Cota, V.R., Moraes, M.F.D., Gomez, M.V., Guatimosim, C., Wetsel, W.C., Kushmerick, C., Pereira, G.S., Gainetdinov, R.R., Izquierdo, I., Caron, M.G., Prado, M.A.M., 2006. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51, 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.005>.
- Prado, V.F., Roy, A., Kolisnyk, B., Gros, R., Prado, M.A.M., 2013. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem. J.* 450, 265–274. <https://doi.org/10.1042/BJ20121662>.
- Rodrigues, H.A., Fonseca, M., de, C., Camargo, W.L., Lima, P.M.A., Martinelli, P.M., Naves, L.A., Prado, V.F., Prado, M.A.M., Guatimosim, C., 2013. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One* 8, e78342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078342>.
- Sacheck, J.M., Ohtsuka, A., McLary, S.C., Goldberg, A.L., 2004. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogen-1 and MuRF1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E591–E601. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00073.2004>.
- Sango, K., McDonald, M.P., Crawley, J.N., Mack, M.L., Tiffit, C.J., Skop, E., Starr, C.M., Hoffmann, A., Sandhoff, K., Suzuki, K., Proia, R.L., 1996. Mice lacking both subunits of lysosomal beta-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat. Genet.* 14, 348–352. <https://doi.org/10.1038/ng1196-348>.
- Santafé, M.M., Salon, I., García, N., Lanuza, M.A., Uchitel, O.D., Tomás, J., 2003. Modulation of ACh release by presynaptic muscarinic autoreceptors in the neuromuscular junction of the newborn and adult rat. *Eur. J. Neurosci.* 17, 119–127.
- Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Leopoldo, S., Simonetta, A., Vianello, M., Gundersen, K., Lomo, T., 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10, 197–205. <https://doi.org/10.1007/BF01739810>.
- Schiaffino, S., Reggiani, C., 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol.*

- Rev. 91, 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>.
- Schwartz, M., Sternberg, D., Whalen, S., Afenjar, A., Isapof, A., Chabrol, B., Portnoi, M.-F., Heide, S., Keren, B., Chantot-Bastarud, S., Siffroi, J.-P., 2018. How chromosomal deletions can unmask recessive mutations? Deletions in 10q11.2 associated with CHAT or SLC18A3 mutations lead to congenital myasthenic syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 176, 151–155. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38515>.
- Shen, X.-M., Scola, R.H., Lorenzoni, P.J., Audia, C., Kay, S.K., Werneck, L.C., Brengman, J., Selcen, D., Engel, A.G., 2017. Novel synaptobrevin-1 mutation causes fatal congenital myasthenic syndrome. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 4, 130–138. <https://doi.org/10.1002/acn3.387>.
- Shen, X.-M., Selcen, D., Brengman, J., Engel, A.G., 2014. Mutant SNAP25B causes myasthenia, cortical hyperexcitability, ataxia, and intellectual disability. *Neurology* 83, 2247–2255. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001079>.
- Silva, J.F., Correa, I.C., Diniz, T.F., Lima, P.M., Santos, R.L., Cortes, S.F., Coimbra, C.C., Lemos, V.S., 2016. Obesity, inflammation, and exercise training: relative contribution of inos and enos in the modulation of vascular function in the mouse aorta. *Front. Physiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00386>.
- Sousa, N., Almeida, O.F.X., Wotjak, C.T., 2006. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Gene Brain Behav.* 5 (Suppl 2), 5–24. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00228.x>.
- Speakman, J.R., 2013. Measuring energy metabolism in the mouse - theoretical, practical, and analytical considerations. *Front. Physiol.* 4, 34. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00034>.
- Starke, K., Göthert, M., Kilbinger, H., 1989. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* 69, 864–989.
- Thompson, L.V., 1994. Effects of age and training on skeletal muscle physiology and performance. *Phys. Ther.* 74, 71–81.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Fox, M.A., Sanes, J.R., 2012. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7 (4), e34640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034640>.
- Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn. Mem.* 7, 333–340. <https://doi.org/10.1101/lm.34600>.
- Vizi, E.S., Somogyi, G.T., 1989. Prejunctional modulation of acetylcholine release from the skeletal neuromuscular junction: link between positive (nicotinic) – and negative (muscarinic)-feedback modulation. *Br. J. Pharmacol.* 97, 65–70. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb11924.x>.
- Wang, Y., Pessin, J.E., 2013. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16, 243–250. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328360272d>.
- Wessler, I., 1989. Control of transmitter release from the motor nerve by presynaptic nicotinic and muscarinic autoreceptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 110–114. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(89\)90208-3](https://doi.org/10.1016/0165-6147(89)90208-3).
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelman, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., Newgard, C.B., Spiegelman, B.M., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C.R., Mandarino, L.J., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D., Groop, L.C., 2001. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131–138. <https://doi.org/10.1038/35093050>.
- Zhan, W.Z., Sieck, G.C., 1992. Adaptations of diaphragm and medial gastrocnemius muscles to inactivity. *J. Appl. Physiol.* 72 (4), 1445–1453. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.4.1445>.

RESEARCH

Open Access



VAcHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions

Satoshi Sugita¹, Leland L. Fleming^{1,4}, Caleb Wood¹, Sydney K. Vaughan^{1,3}, Matheus P. S. M. Gomes⁵, Wallace Camargo⁶, Ligia A. Naves⁶, Vania F. Prado⁷, Marco A. M. Prado⁷, Cristina Guatimosim⁵ and Gregorio Valdez^{1,2*} 

Abstract

Background: Cholinergic dysfunction occurs during aging and in a variety of diseases, including amyotrophic lateral sclerosis (ALS). However, it remains unknown whether changes in cholinergic transmission contributes to age- and disease-related degeneration of the motor system. Here we investigated the effect of moderately increasing levels of synaptic acetylcholine (ACh) on the neuromuscular junction (NMJ), muscle fibers, and motor neurons during development and aging and in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Methods: Chat-ChR2-EYFP (VAcHT^{HYp}) mice containing multiple copies of the vesicular acetylcholine transporter (VAcHT), mutant superoxide dismutase 1 (SOD1^{G93A}), and Chat-IRES-Cre and tdTomato transgenic mice were used in this study. NMJs, muscle fibers, and α -motor neurons' somata and their axons were examined using a light microscope. Transcripts for select genes in muscles and spinal cords were assessed using real-time quantitative PCR. Motor function tests were carried out using an inverted wire mesh and a rotarod. Electrophysiological recordings were collected to examine miniature endplate potentials (MEPP) in muscles.

Results: We show that VAcHT is elevated in the spinal cord and at NMJs of VAcHT^{HYp} mice. We also show that the amplitude of MEPPs is significantly higher in VAcHT^{HYp} muscles, indicating that more ACh is loaded into synaptic vesicles and released into the synaptic cleft at NMJs of VAcHT^{HYp} mice compared to control mice. While the development of NMJs was not affected in VAcHT^{HYp} mice, NMJs prematurely acquired age-related structural alterations in adult VAcHT^{HYp} mice. These structural changes at NMJs were accompanied by motor deficits in VAcHT^{HYp} mice. However, cellular features of muscle fibers and levels of molecules with critical functions at the NMJ and in muscle fibers were largely unchanged in VAcHT^{HYp} mice. In the SOD1^{G93A} mouse model for ALS, increasing synaptic ACh accelerated degeneration of NMJs caused motor deficits and resulted in premature death specifically in male mice.

Conclusions: The data presented in this manuscript demonstrate that increasing levels of ACh at the synaptic cleft promote degeneration of adult NMJs, contributing to age- and disease-related motor deficits. We thus propose that maintaining normal cholinergic signaling in muscles will slow degeneration of NMJs and attenuate loss of motor function caused by aging and neuromuscular diseases.

(Continued on next page)

* Correspondence: gvaldez1@vtc.vt.edu

¹Virginia Tech Carilion Research Institute, Virginia Tech, Roanoke, VA, USA

²Department of Biological Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA

Full list of author information is available at the end of the article

(Continued from previous page)

Keywords: Neuromuscular junction, Acetylcholine, VACHT, Aging, ALS, Synapse, Cholinergic transmission, Motor neuron

Abbreviations: ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; CHAT, Choline Acetyltransferase; CRE, Causes Recombination; MEPP, Miniature Endplate Potential; NMJ, Neuromuscular Junction; SOD1^{G93A}, Superoxide Dismutase 1 mutated from a glycine to alanine at codon 93; VACHT, Vesicular Acetylcholine Transporter; VACHT^{HYP}, Heterozygous Chat-ChR2-EYFP; YFP, Yellow Fluorescence Protein

Background

The organization and stability of synapses is dictated by the actions of pre- and postsynaptic organizing molecules, including neurotransmitters [1–3]. The vertebrate neuromuscular junction (NMJ), the synapse formed between α -motor neurons and skeletal muscle fibers, is under the influence of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) [1]. In addition to promoting muscle contraction, several lines of evidence indicate that ACh acts as an anti-synaptogenic factor [4, 5]. ACh promotes dispersion of nicotinic acetylcholine receptors (AChR) from postsynaptic sites by inducing posttranslational changes and accelerating the endocytosis of AChRs [6]. In mice lacking ACh, developing muscles contain larger and more complex postsynaptic sites that are innervated by silent motor axons. These postsynaptic sites initially form but fail to mature in the absence of neural-derived agrin (z-agrin), a molecule with critical roles in stabilizing AChRs [7, 8]. These findings have led to the hypothesis that ACh acts in concert with z-agrin in sculpting and stabilizing postsynaptic sites [7].

The recent generation of transgenic mice with altered expression of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) has made it possible to examine the impact of varying levels of ACh throughout the lifespan of mice [9, 10]. VACHT functions to load ACh into synaptic vesicles, thereby regulating the amount of neurotransmitter released [11]. Young adult mice with reduced expression of VACHT (VACHT^{KD}) have reduced cholinergic neurotransmission [10] while mice overexpressing VACHT (*Chat-ChR2-EYFP*; herein called VACHT^{HYP}) [12, 13] release more ACh at cholinergic synapses and thus have heightened cholinergic transmission [9]. Both transgenic lines exhibit cognitive deficits, indicating that cholinergic circuits in the brain are highly sensitive to both increasing and decreasing synaptic ACh. In the lower motor system, decreasing synaptic ACh by approximately 70 %, as is the case in VACHT^{KD} mice, results in symptoms resembling myasthenia gravis [10]. These mice also exhibit moderate changes in the shape and distribution of synaptic vesicles in α -motor axon nerve endings [14]. Conversely, young adult VACHT^{HYP} mice have enhanced motor endurance consistent with increased cholinergic tone [9].

During aging and throughout the progression of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), neuromuscular function decreases suggesting that increasing the release of ACh may potentially preserve muscle tone [1, 15]. Here we used VACHT^{HYP} mice to determine the contribution of chronically increasing synaptic ACh levels on developing, aging, and ALS-afflicted NMJs. We discovered that NMJs prematurely acquire age-related structural alterations in VACHT^{HYP} mice. These structural changes at NMJs are accompanied by a moderate reduction in the size of muscle fibers and motor deficits in aged VACHT^{HYP} mice. To determine if increased cholinergic transmission affects the progression of ALS-like pathology, we examined SOD1^{G93A} mice overexpressing VACHT. Increasing cholinergic transmission selectively affected male SOD1^{G93A} mice, prematurely causing motor deficits, degeneration of NMJs, and accelerating death of these mice. Together, these findings demonstrate that increasing cholinergic transmission accelerates the degeneration of NMJs during aging and progression of ALS-like pathology in a mouse model of the disease.

Methods

Mice

Several transgenic lines were used in these experiments. We obtained the following lines from The Jackson Laboratory: VACHT^{HYP} (B6.Cg-Tg(ChAT-COP4*H134R/EYFP,Slc18a3)6Gfng/J) [13], SOD1^{G93A} (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J) [16], ChAT-IRES-Cre (B6;129S6-Chat < tm1(cre)Lowl>/J) [17], tdTomato (B6;129S6-*Gt(ROSA)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze}/J*) [18]. Mice overexpressing VACHT [13] contained several bacterial artificial chromosomes (BAC) modified to express channelrhodopsin from the ChAT locus. However, the BAC construct used to generate these transgenic mice also contained an intact VACHT locus, thus introducing additional functional copies of the VACHT gene. All transgenic mice overexpressing VACHT (VACHT^{HYP}) [13] were maintained as heterozygous and allowed free access to food and water. For histological and biochemical analysis of NMJs, muscle fibers, motor neurons, and motor axons, we used at least four mice per genotype per experiment. All experiments were carried out under NIH guidelines

and animal protocols approved by the Virginia Tech Institutional Animal Care and Use Committee.

Electrophysiological recordings

We recorded miniature endplate potentials (MEPPs) using an Axoclamp 2A amplifier. Recordings were band-pass filtered at 0.1 to 5 kHz, further amplified 50 times by a Cyberamp, and then sampled on a computer at a frequency of 100 kHz. Microelectrodes were fabricated from borosilicate glass using a Narishige puller (PN-30) and had resistances of 8–15 Mohms when filled with 3 M KCl. The microelectrodes were inserted into the muscle fiber in the endplate region to record MEPPs. Tetrodotoxin (100 nM) was added to the bath solution to prevent muscle contraction. The signals were digitized by a board from National Instruments (NIDAQ-MX) and acquired by the program WinEDR (John Dempster, University of Strathclyde). MEPP amplitudes were corrected to a standard resting potential of -70 mV. Approximately 100 MEPPs in five different synapses per muscle were analyzed. We used three muscles from three different animals per genotype at 4 months of age.

Immunohistochemistry and histological analysis under confocal microscopy

Imaging NMJs

Mice were anesthetized with isoflurane and perfused transcardially with 4 % paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). The extensor digitorum longus (EDL) muscle was then dissected. Whole muscles were blocked for 1 h at room temperature (blocking solution; 1 % Triton X-100, 3 % BSA, 5 % goat serum in PBS) and then incubated with primary antibodies for 24 h in blocking solution to visualize AChRs, axons, and synaptic vesicles. Following staining with primary antibodies, muscles were washed three times with PBS-T (0.1 % Triton X-100) and incubated for 2 h with Alexa 488 or 555 conjugated α -bungarotoxin (fBTX, Life Technologies; 1:1000) and secondary antibodies. After washing with PBS-T, the muscles were whole-mounted onto slides using Vectashield (Vector Labs). The primary antibodies used were synaptotagmin-2 (znp-1, Zebrafish International Resource Center; 1:100) and VACHT (Millipore; 1:250). The secondary antibodies used were Alexa-647 anti-mouse IgG2a (Life Technologies; 1:1000) and Alexa-647 anti-guinea pig IgG (Life Technologies; 1:1000).

NMJ analysis

To analyze structural features at NMJs, maximum intensity projections of confocal stacks were created using ZEN software (Zeiss). We analyzed structural features following the criteria previously described by Valdez et al. [19]. Briefly, fragmented AChRs are defined as five or more AChR clusters in small islands with round

shape and/or a segment of the postsynapse. It also includes NMJs with small and/or irregularly shaped AChR clusters. Full or partial denervation describes postsynaptic sites not appropriately opposed by the nerve terminal. Multiple innervations are the simultaneous innervation of the postsynapse by two or more axons. A nerve sprout occurs when the nerve extends beyond AChR clusters in any direction. Colocalization is the extent of pre- and postsynaptic apposition measured using ZEN software. To quantify the size of NMJs, the region occupied by AChRs was measured using ImageJ software.

Fluorescence intensity analysis

To analyze the fluorescence intensity of VACHT immunostaining at NMJs, maximum intensity projections of confocal stacks were created using ZEN software (Zeiss). Using Zen Black software (Zeiss), individual NMJs were outlined and the mean fluorescence intensity was determined by Zen Black software with background fluorescence subtracted. The mean fluorescence intensity for individual NMJs was averaged to find the overall fluorescence intensity for each animal.

Muscle fiber diameter/central nuclei

The tibialis anterior (TA) muscle was dissected from perfused mice, transferred into a 30 % sucrose solution for 2 days, and cut using a cryostat at 14- μ m thickness. To visualize muscle fiber size and location of nuclei, the sections were stained by first blocking for 1 h at room temperature (0.1 % Triton X-100, 3 % BSA, 5 % goat serum in PBS) and then incubated with an antibody against laminin (L9393, Sigma; 1:100) for 24 h in blocking solution. The sections were washed three times in PBS and incubated for 3 h with secondary antibodies (Alexa-568 anti-rabbit IgG, Life Technologies; 1:1000). After washing with PBS, sections were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma; 1:1000), washed with PBS, and mounted using Vectashield. The area outlined by laminin was measured using ImageJ software. At least 300 muscle fibers per mouse were randomly selected and used for this analysis. Myonuclei located in the center of muscle fibers were counted. At least 1000 nuclei per mouse were counted.

Nerve counts

To visualize motor axons, Chat-Cre;tdTom mice were used. The peroneal nerve was dissected from perfused mice and embedded in a tissue-freezing medium (Tissue-Tek). The specimens were cut in a cryostat at 10- μ m thickness. Sections were blocked for 1 h at room temperature (0.1 % Triton X-100, 3 % BSA, 5 % goat serum in PBS) and subsequently incubated with antibodies for both neurofilament (smi-312, Covance; 1:1000) and S-100 (Z0311, Dako; 1:400) for 24 h in blocking solution.

Sections were then washed three times with PBS for 5 min each and incubated with secondary antibodies (Alexa-488 anti-mouse IgG1, Alexa-647 anti-rabbit IgG, Life Technologies; 1:1000). After washing with PBS, sections were mounted in Vectashield. Axons expressing tdTom and neurofilament were counted as motor axons. Axons labeled with only neurofilament are sensory axons.

Expression analysis using quantitative PCR

Mice were first anesthetized with isoflurane, and then the muscles and spinal cord regions, including cervical, thoracic, lumbar, and sacral regions, were dissected and flash frozen in liquid nitrogen. Total RNA was prepared using Aurum Total RNA Mini kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 500 ng of total RNA using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). PCR amplification was performed on the Bio-Rad CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). All primers used in this study are listed in Table 1.

SOD1^{G93A} copy number analysis

DNA isolation was performed with the DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen). Changes in transgene copy numbers were evaluated using TaqMan probe-based quantitative real-time PCR by determining the difference in

threshold cycle (Δ CT) between the transgene (hSOD1) and an internal positive control gene. Primers for hSOD1 were as follows: IMR9665 or Forward = 5'-GG GAAGCTGTTGTCCCAAG-3'; and IMR9666 or Reverse = 5'-CAAGGGGAGGTAAAAGAGAGC-3'. The TaqMan probe used for hSOD1 is 13854 = 5'-CTGC ATCTGGTTCTTGCAAAACACCA-3'. The primers for the internal positive control gene were as follows: IMR1544 or Forward = 5'-CACGTGGGCTCCAGC ATT-3'; and IMR3580 or Reverse = 5'-TCACCAGTC ATTTCTGCCTTTG-3'. The TaqMan probe for the internal positive control gene is TmoIMR0105 = 5'-CCA ATGGTCCGGGCACTGCTCAA-3'. These primers and probes are described in the Jackson Laboratories protocol for genotyping hSOD1 transgenic mice. We made minor modifications to the protocol to compare levels of hSOD1 between mice. We used 5 ng of genomic DNA, the TaqMan Universal PCR Mastermix (Thermo Fisher Scientific), and the Bio-Rad CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad) to amplify hSOD1. The following PCR settings were used: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 PCR cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min. To determine relative copy numbers, we compared the Δ CT value between SOD1^{G93A} and SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} for hSOD1 after subtracting the CT value of the internal control gene for each sample. The same Δ CT value indicates that there is no difference in the number of hSOD1 between SOD1^{G93A} and SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} mice.

Table 1 PCR primers

Gene	Fw (5'-3')	Rv (5'-3')
GAPDH	CCCACCTCTCCACCTTCGATG	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG
AChE	CTACACCACGGAGGAGAGGA	CTGGTCTTCCAGTGCACCA
AChR γ	GCTCAGCTGCAAGTTGATCTC	CCTCCTGCTCCATCTCTGTG
AChR ϵ	GCTGTGTGGATGCTGTGAAC	GCTGCCCAAAAACAGACATT
MuSK	CCACACTGCGTGAATGAGC	CTCTGCAAATGGGCATGGG
LRP4	GGCAAAAAGCAGGAATTGT	TCTACCCAGTGGCCAGAACT
Rapsyn	GTGCCATGGAGTGTGTGAG	CGGTTTCCGATCTCAGTCAT
Dok7	GGGTACTGGGCTGGAGTCTT	TCGGACGATGCAGTCAAACA
CDK5	GCCAGACTATAAGCCCTACCC	GTCAGAGAAGTAGGGGTGCT
MyHC2A	GAGTGAGCAGAAGCGAATGCT	GCGGAACCTGGATAGATTTGTG
MyHC2B	CACCTGGACGATGCTCTCAGA	GCTCTTGCTCGGCCACTCT
MyHC2X	GCTAGTAACATGGAGGTCA	TAAGGCACCTTGGCCTTTATC
Myogenin	GCACTGGAGTTCGGTCCCA	GTGATGCTGTCCACGATGGA
Foxo1	GAGTTAGTGAGCAGGCTACATT	TTGGACTGCTCCTCAGTTC
Atrogin-1	GCAGCAGCTGAATAGCATCCA	GGTGATCGTGAGGCCTTTGAA
Agrin-8	CTTTGATGGGCGGACCTACA	CGCTTTCTCAGCTGGGATCT
Agrin-11	CAGTGGGGACCTAGAAACAC	TTTCAGGGCTCTCAGTCACAG
Agrin-19	CTTTGATGGGCGGACCTACA	AGTTTCAGGGGCTGGGATCT
Chat	CCTGGATGTCCAGGCACT	GTCATACCAACGATTCGCTCC
VACHT	GAGAGTACTTTGCTGGGAGGA	GGCCACAGTAAGACCTCCCTTG

Behavioral tests

Hanging test

We examined motor function using an inverted grid hanging test [20]. The mice were placed on the center of a wire grid, which was mounted 25 cm above the table. After gently inverting the wire grid, we recorded the time the mouse remained hanging from the wire mesh. Each mouse was tested three times with at least 5-min breaks between trials. When comparing the ability of mice to stay on the wire mesh, we only used the maximum time they spent hanging for each trial.

Rotarod test

Mice were placed on a rotarod (Ugo Basile Instruments). The time that the mice were able to spend on the rotating platform was recorded. The following settings were used: for 400-day-old VACHT^{Hyp} and wild-type mice, acceleration was set to 8.0 rpm/min with no reverse. The maximum speed was set to 50 rpm and the minimum speed was 4 rpm. To test motor function in SOD1^{G93A} mice, acceleration was set to 5.0 rpm/min with no reverse. The maximum speed was set to 80 rpm and the minimum speed was 2 rpm. Each mouse was tested three times with at least 5-min breaks between trials. When comparing the ability of mice to stay on the

rotarod, we only used the maximum time they spent on the rotating platform for each trial.

At least eight animals were tested on both the rotarod and hanging tests. To compare motor function between young adult mice, 5-month-old male wild-type and VACHT^{HYP} mice were used. To compare motor function between middle-aged mice, 13-month-old female wild-type mice and VACHT^{HYP} mice were examined. We examined male mice expressing SOD1^{G93A}.

Analysis of survival rates

All mice affected with ALS were regularly observed. Mice were euthanized when they were unable to right themselves back up after lying on their sides. A Kaplan–Meier log rank test was used to compare the lifespan between the groups of mice affected with ALS.

Statistical analysis

Student's *t* test and a one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer and Kolmogorov–Smirnov tests were used to compare differences between groups. Data were expressed as the mean ± SE (standard error). *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

VACHT is increased at NMJs of VACHT^{HYP} mice

To assess the impact of altering acetylcholine (ACh) levels on the neuromuscular system, we examined a transgenic mouse line with increased expression of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) gene (*ChAT–Chr2–EYFP* [9, 21]; herein called VACHT^{HYP}). These mice have been shown to release threefold more synaptic ACh in the brain [9]. In this study, we only examined VACHT^{HYP} heterozygous mice. We first confirmed that VACHT is expressed at higher levels in the

spinal cord of VACHT^{HYP} heterozygous mice using quantitative PCR (qPCR). As expected, we found VACHT messenger RNA (mRNA) significantly increased in the spinal cord of VACHT^{HYP} mice compared to litter mate controls (Fig. 1a). We next used immunohistochemistry to examine the concentration of VACHT protein at neuromuscular junctions (NMJs) in the extensor digitorum longus (EDL) muscle. NMJs were visualized using fluorescently tagged α -bungarotoxin (fBTX), which binds selectively to nicotinic acetylcholine receptors (AChRs) located on the postsynaptic region of the NMJ. Using the same scanning parameters, VACHT immunofluorescence was invariably more intense at NMJs of VACHT^{HYP} mice (Fig. 1c–d) compared to NMJs of control mice (Fig. 1b, d).

Miniature endplate potential amplitudes are increased in VACHT^{HYP} muscles

To determine the impact of overexpressing VACHT on quantal size, we measured miniature endplate potentials (MEPPs) in the diaphragm muscle from 4-month-old controls and from VACHT^{HYP} mice. While the frequency of MEPPs was unchanged (Fig. 2a), the amplitude of MEPPs was significantly higher in VACHT^{HYP} compared to control mice (Fig. 2b, c). The mean MEPP amplitude was 0.86 ± 0.12 (mean ± SEM per muscle fibers per animal) mV in control mice (median = 0.75 mV) and 1.235 ± 0.18 mV in VACHT^{HYP} mice (median = 1.244 mV). We also found that the frequency of large mini amplitudes increased in VACHT^{HYP} mice (Fig. 2c). Reinforcing the notion that MEPP amplitudes are larger in VACHT^{HYP} animals compared to controls, the cumulative probability plot (Fig. 2d) shows a shift to the right in the VACHT^{HYP} curve (*P* < 0.001, Kolmogorov–Smirnov). These findings demonstrate that VACHT overexpression

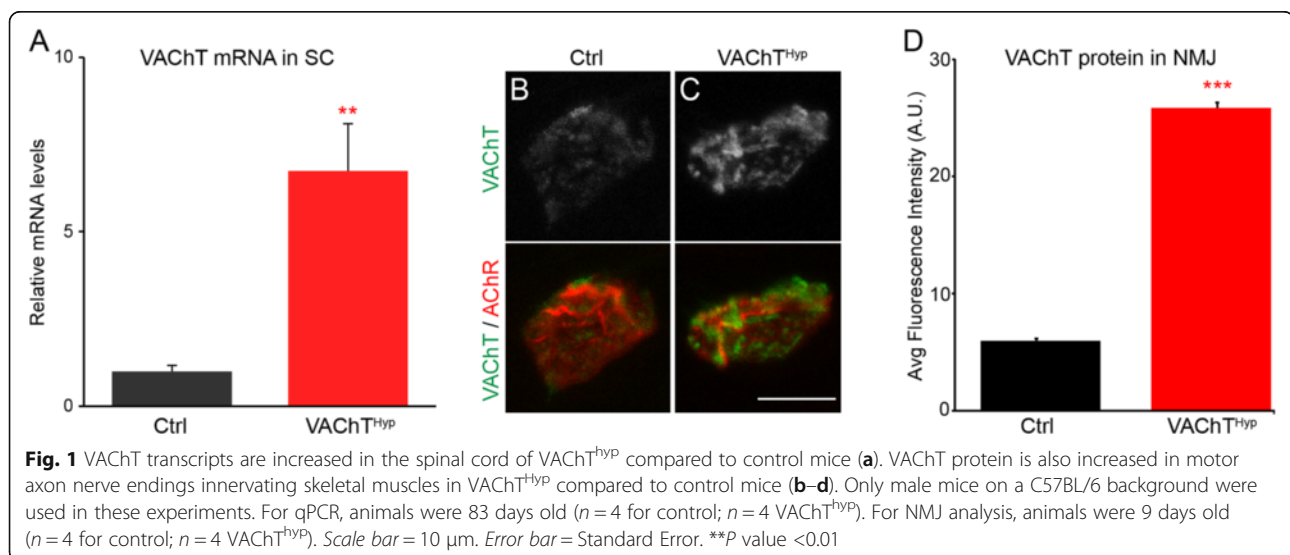


Fig. 1 VACHT transcripts are increased in the spinal cord of VACHT^{HYP} compared to control mice (a). VACHT protein is also increased in motor axon nerve endings innervating skeletal muscles in VACHT^{HYP} compared to control mice (b–d). Only male mice on a C57BL/6 background were used in these experiments. For qPCR, animals were 83 days old (*n* = 4 for control; *n* = 4 VACHT^{HYP}). For NMJ analysis, animals were 9 days old (*n* = 4 for control; *n* = 4 VACHT^{HYP}). Scale bar = 10 μm. Error bar = Standard Error. ****P* value < 0.01

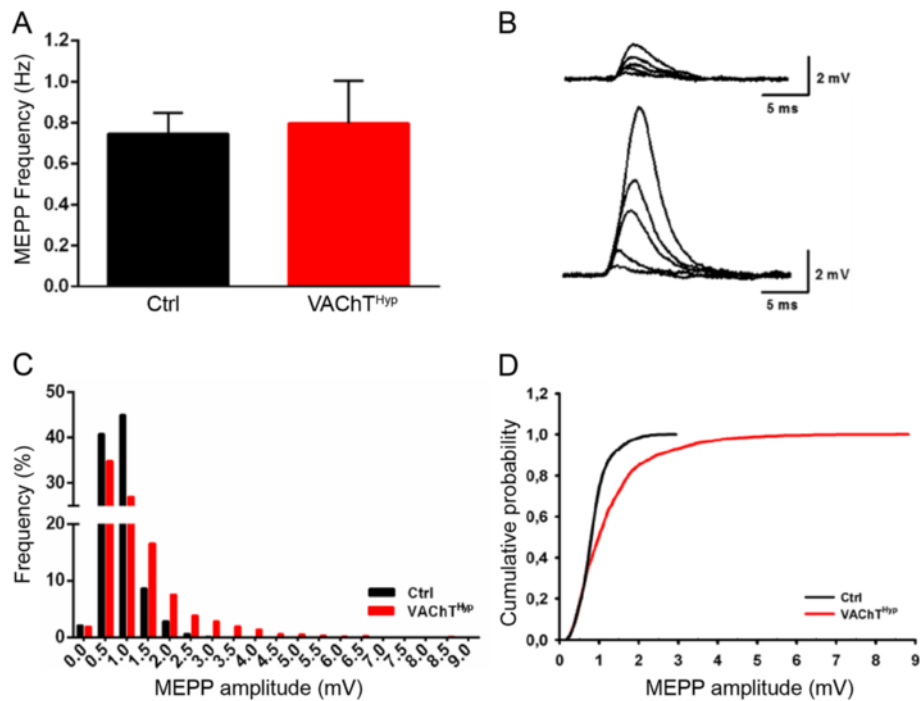


Fig. 2 The impact of increasing ACh was determined by recording miniature endplate potentials (MEPPs) in the diaphragm of young adult control and VACHT^{Hyp} mice. The frequency of MEPPs is unchanged in VACHT^{Hyp} mice (a), with error bar representing the standard error. However, the average MEPP amplitude is higher in VACHT^{Hyp} ($n = 2297$ events) compared to that in control mice ($n = 2444$ events) (b–d). The amplitude of MEPPs was on average significantly higher in VACHT^{Hyp} mice using a Kolmogorov-Smirnov test (d; P value < 0.001). Results are from 50 muscle fibers from five mice per genotype. Error bar = Standard Error. Four-month-old male mice on a C57BL/6 background were used for these experiments

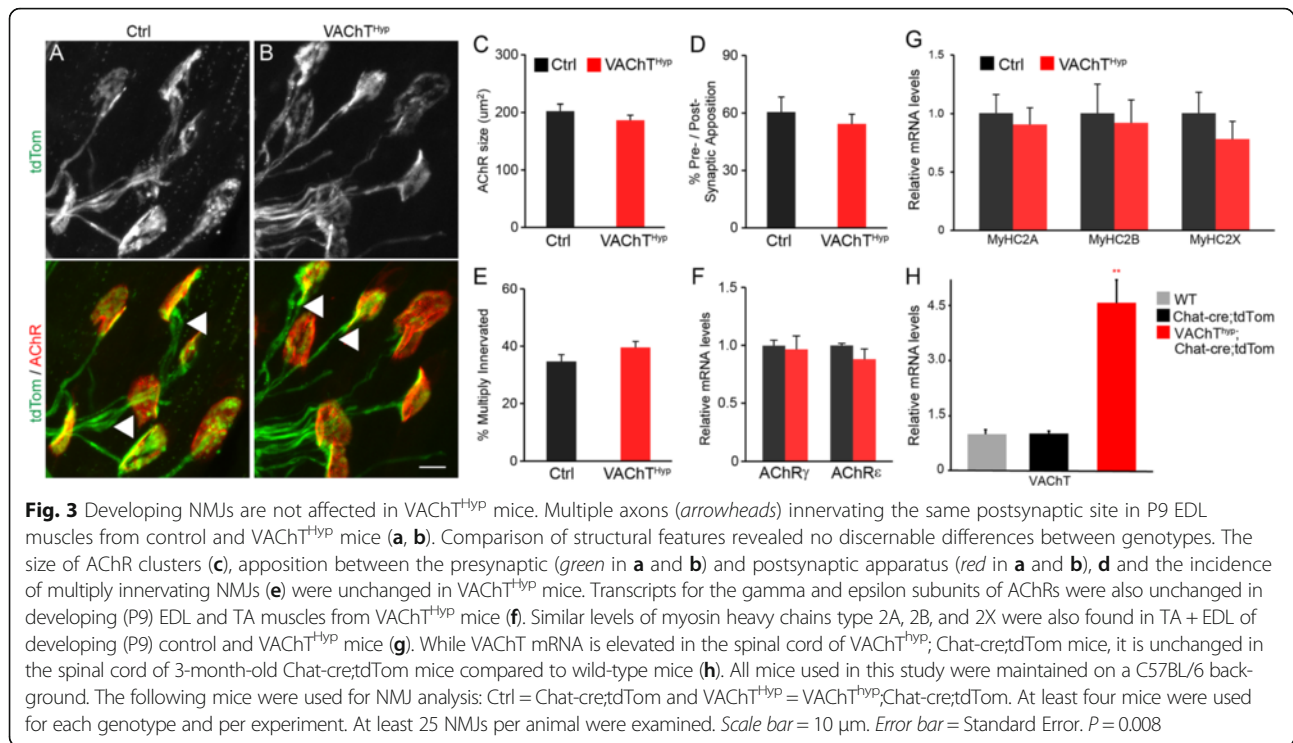
augments the amount of ACh loaded into and released from synaptic vesicles at NMJs.

Normal development of NMJs in VACHT^{Hyp} mice

Several lines of evidence indicate that ACh acts as an anti-synaptogenic factor at NMJs [4, 5, 7]. We thus asked if increased ACh levels affect developing NMJs in the predominantly fast-twitch EDL muscle. To facilitate analysis of motor nerve endings, we generated VACHT^{Hyp} mice expressing tdTomato specifically in cholinergic neurons. This was accomplished by mating VACHT^{Hyp} mice with ChAT-IRES-Cre [17] and tdTomato [18] mice. Control and VACHT^{Hyp} mice are referred herein as ChAT-Cre;tdTomato and VACHT^{Hyp};ChAT-Cre;tdTomato, respectively. To ascertain that VACHT expression is not affected by expression of Cre from the ChAT (Chat-Cre) locus and tdTomato from the Rosa locus (tdTomato), we examined VACHT mRNA levels in the spinal cord of wild-type, Chat-Cre;tdTomato, and VACHT^{Hyp};Chat-Cre;tdTomato mice. While VACHT transcripts were significantly elevated in the spinal cord of VACHT^{Hyp};Chat-Cre;tdTomato mice, there was no difference between wild-type and Chat-Cre;tdTomato mice (Fig. 3h). We thus used VACHT^{Hyp} and control mice expressing tdTomato to examine NMJs at postnatal day 9 (P9). At this age, NMJs are still in the process of

developing from a small plaque, often occupied by multiple innervating α -motor nerve endings, to a large pretzel-like structure [22]. We found that increased VACHT expression had no effect on the development of NMJs. The size of AChR clusters, the percent apposition between pre- and postsynaptic sites, and the incidence of multiply innervated NMJs are similar in the EDL muscle of VACHT^{Hyp} and control mice (Fig. 3a–e). Next, we asked if increased ACh affects expression of the gamma and epsilon subunits of AChRs in developing EDL muscles. The epsilon subunit replaces the gamma subunit as NMJs mature [23], altering the functional properties of AChRs [24, 25], and thus serves as a functional marker for maturing NMJs. Our analysis revealed similar levels of both the gamma and epsilon subunits in VACHT^{Hyp} mice compared to control mice of the same age (Fig. 3f). Collectively, these findings demonstrate that the structural and functional maturation of the NMJ are unaffected by higher levels of synaptic ACh.

Nerve activity has been well documented to influence the maturation and specification of muscle fiber types [26]. There are four major types of skeletal muscle fibers that can be identified based on their expression of myosin heavy chain (MyHC) isoforms (type 1, 2A, 2X, or 2B) [27]. We thus asked if altering levels of ACh affect muscle biogenesis, independently of changes at NMJs. In the tibialis



anterior (TA) and EDL muscles of 9-day-old VACHT^{HYP} mice, mRNA levels for MyHC type 2A, 2B, and 2X were similar to those in control mice (Fig. 3g). These findings show that the increased level of synaptic ACh in VACHT^{HYP} does not alter the normal development of muscle fibers and NMJs in the TA and EDL muscles.

NMJs exhibit age-related changes in young adult VACHT^{HYP} mice

In adulthood, the NMJ undergoes functional and structural changes due to diseases, injury, aging, and exercise [19, 28]. Since all these different conditions inevitably affect cholinergic transmission, we assessed the impact of moderately increasing synaptic ACh on adult NMJs. In the EDL muscle of 1-, 5-, and 19-month-old VACHT^{HYP} and aged-matched control mice, we examined NMJs for fragmentation, denervation, sprouting of motor axon nerve endings, and innervation by multiple motor axons. These cellular characteristics are a hallmark of NMJs in aged EDL muscles. We thus refer to them as age-related structural features. In 1-month-old male VACHT^{HYP} mice, there was no change in the number of fragmented and denervated NMJs compared to control mice of the same age and sex (Fig. 4a, b, e, f). However, NMJs were often found multiply innervated (Fig. 4g) and with motor axons sprouting beyond the postsynaptic site (Fig. 4h) in 1-month-old VACHT^{HYP} mice. By 5 months of age, fragmented and denervated NMJs were more prevalent in

male VACHT^{HYP} mice (Fig. 4d–f) compared to age- and sex-matched control and 1-month-old VACHT^{HYP} mice (Fig. 4c, e, f). The number of multiply innervated NMJs and axons sprouting beyond the postsynaptic site was similar between 1- and 5-month-old VACHT^{HYP} mice (Fig. 4g, h). NMJs were similarly affected in 5-month-old female VACHT^{HYP} mice (Fig. 4i–l). At 19 months of age, the incidence of NMJs with deleterious age-related structural changes further increased in female VACHT^{HYP} mice compared to control mice (Fig. 5a–d). Contrary to our expectations, these findings show that moderately increasing synaptic ACh accelerates aging of NMJs.

We next asked if structural alterations at NMJs in VACHT^{HYP} mice are the result of changes in key molecules with critical functions at NMJs. For this, we examined mRNA levels for eight NMJ-associated molecules in the EDL muscle of 5- and 19-month-old mice. Although acetylcholinesterase (AChE) was expressed at similar levels in the EDL muscle of 5-month-old control and VACHT^{HYP} mice, AChE was significantly reduced in aged VACHT^{HYP} (Fig. 6a). In contrast, mRNA for the gamma and epsilon nicotinic AChR subunits (Fig. 6b, c) [29], the muscle-specific kinase (MuSK) (Fig. 6d) [30], the LDL receptor-related protein 4 (LRP4) (Fig. 6e), rapsyn (Fig. 6f), the docking protein 7 (Dok7) (Fig. 6g), and the cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) (Fig. 6h) were unchanged in the EDL muscle of 5- and 19-month-old VACHT^{HYP} mice compared to control mice of the same age.

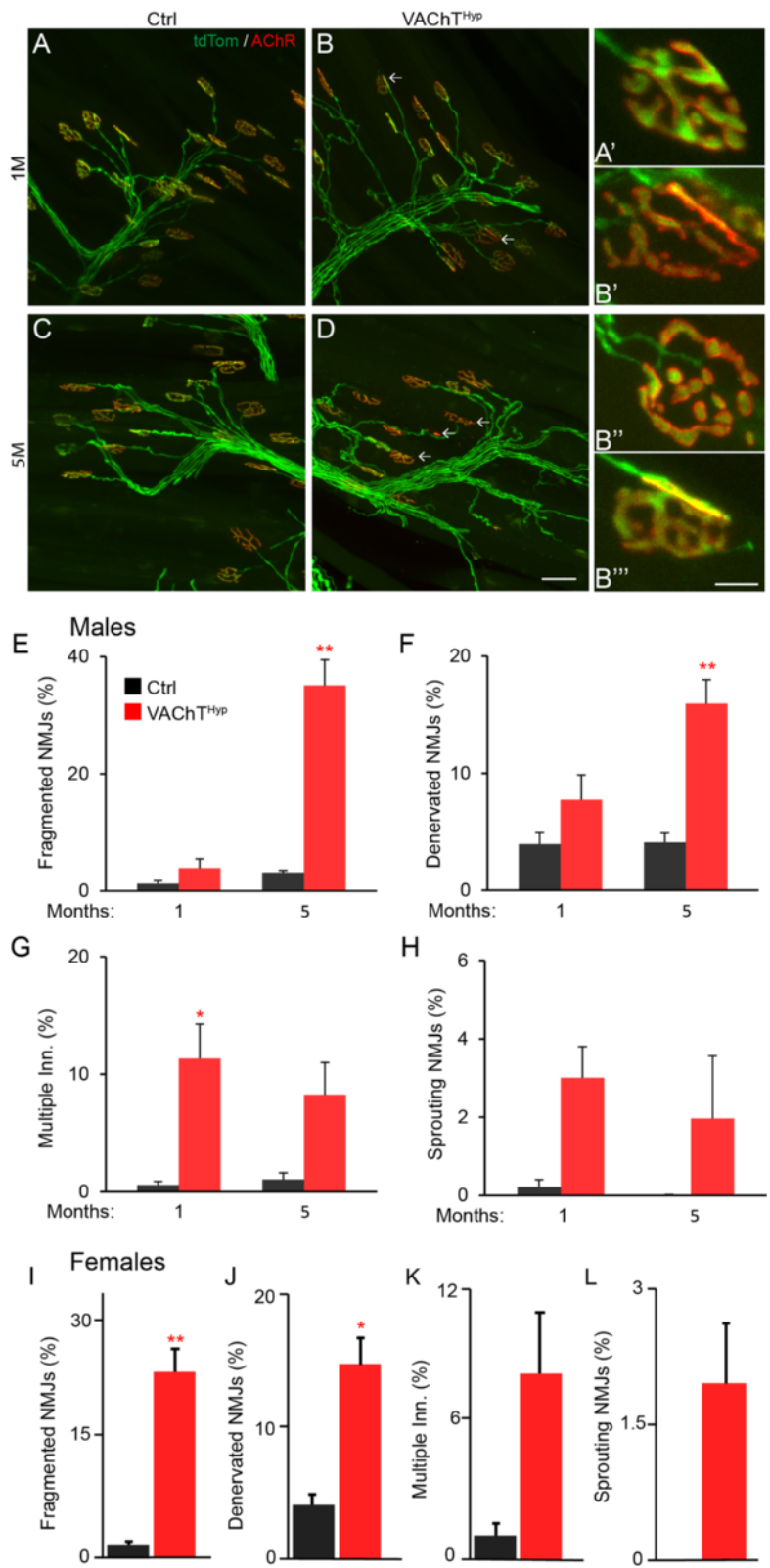


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 NMJs progressively degenerate in adult VACH^{T^{hyp}} mice. At 1 month of age, there is an increased incidence of NMJs with age- and disease-related structural features in the EDL muscle of VACH^{T^{hyp}} compared to control mice (**a, b, e–h**). By 5 months of age, there is an additional increase in the number of fragmented and denervated NMJs in male (**e–h**) and female (**i–l**) VACH^{T^{hyp}} mice. α -motor axons expressed tdTomato in these mice (*green* in **a–d**). Scale bar = 50 μ m (**a–d**), 10 μ m (**a'–b''**). All mice used in this study were maintained on a C57BL/6 background and only male mice were examined. Ctrl = Chat-cre;tdTom and VACH^{T^{hyp}} = VACH^{T^{hyp}};Chat-cre;tdTom. At least four mice were used for each genotype and per experiment. Error bar = Standard Error. **P* value <0.05, ***P* value <0.01

NMJ degeneration precedes motor deficits in VACH^{T^{hyp}} mice

The accelerated aging of NMJs suggests that motor function may be compromised in VACH^{T^{hyp}} mice. To explore this possibility, we tested motor function of 5- and 13-month-old VACH^{T^{hyp}} and control mice by measuring the latency to fall from a wire mesh and from a rotating platform. At both ages, we found no difference in body weight between genotypes (Fig. 7a, d). At 5 months of age, VACH^{T^{hyp}} and control mice performed equally well on both tests (Fig. 7b, c). However, 13-month-old VACH^{T^{hyp}} mice were unable to support their own weight on an inverted wire mesh as long as age- and sex-matched control mice (Fig. 7e). However, 13-month-old VACH^{T^{hyp}} mice spent the same amount of time on the rotarod as control mice of the same age (Fig. 7f). These findings indicate that, in addition to

accelerating degeneration of NMJs, increasing synaptic ACh compromises motor function.

NMJ degeneration precedes muscle atrophy in VACH^{T^{hyp}} mice

We next examined the effect of increasing cholinergic activity on muscle fibers' structure and molecular composition. To start, we stained 14 μ m muscle cross sections from the TA muscle of 5- and 19-month-old mice with an antibody against laminin to visualize and measure the perimeter of all muscle fibers. This analysis showed that the size of muscle fibers is unchanged in 5-month-old VACH^{T^{hyp}} mice compared to control mice of the same age (Fig. 8c, e). However, muscle fibers were slightly smaller in 19-month-old VACH^{T^{hyp}} mice (Fig. 8a, b, d, e). To determine if the reduced size of muscle fibers

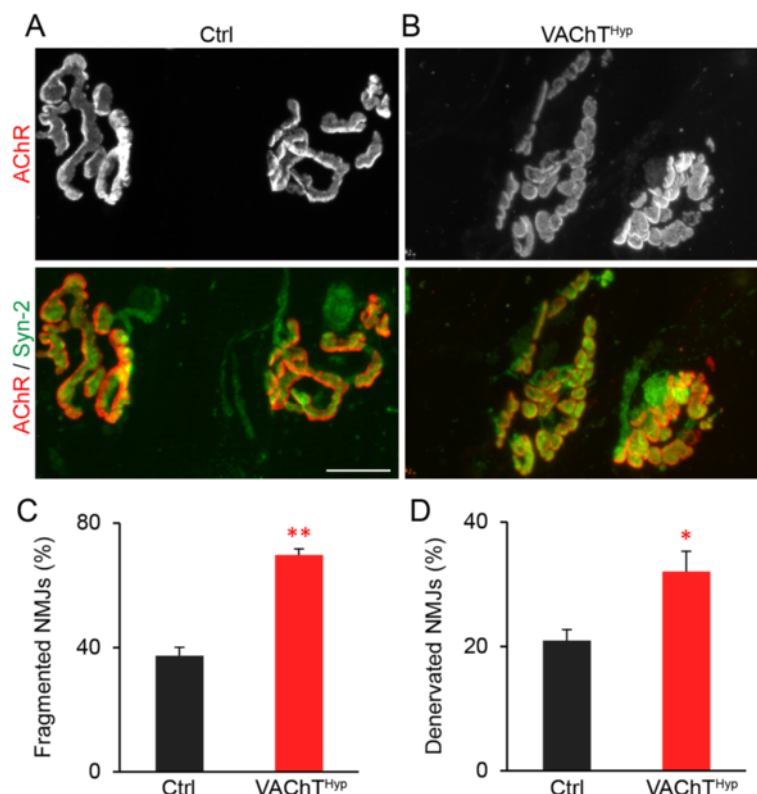
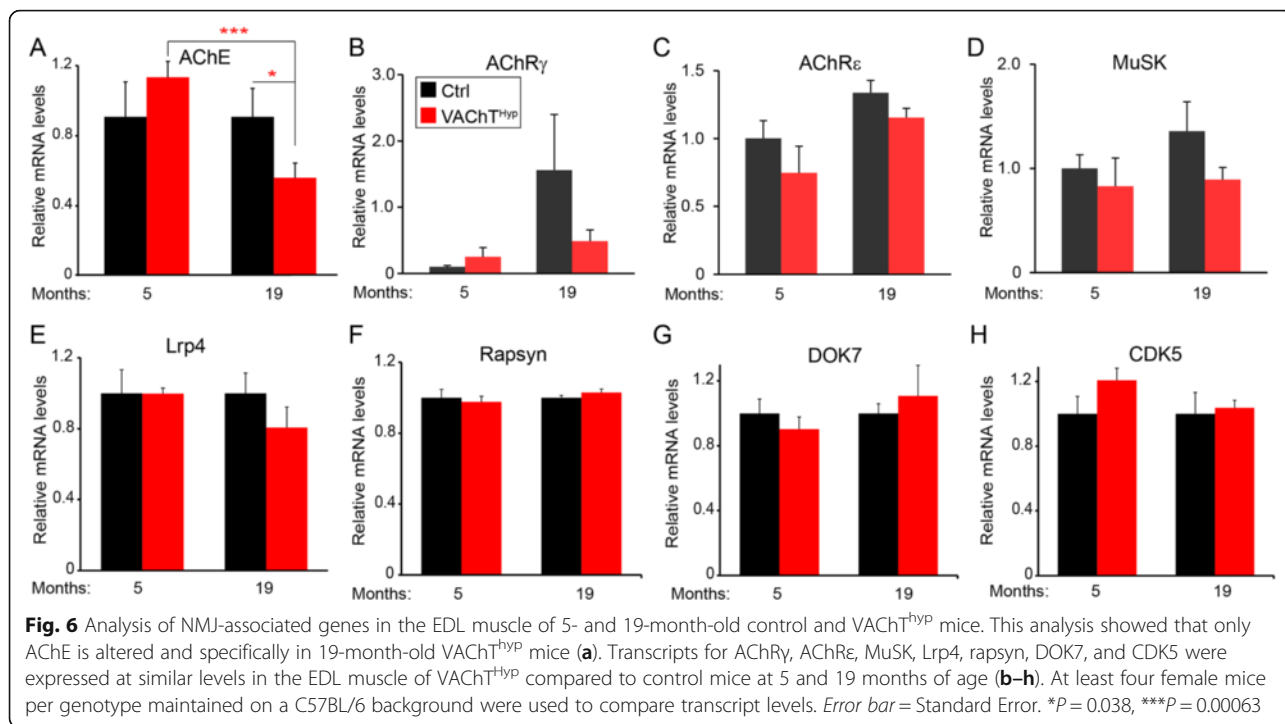
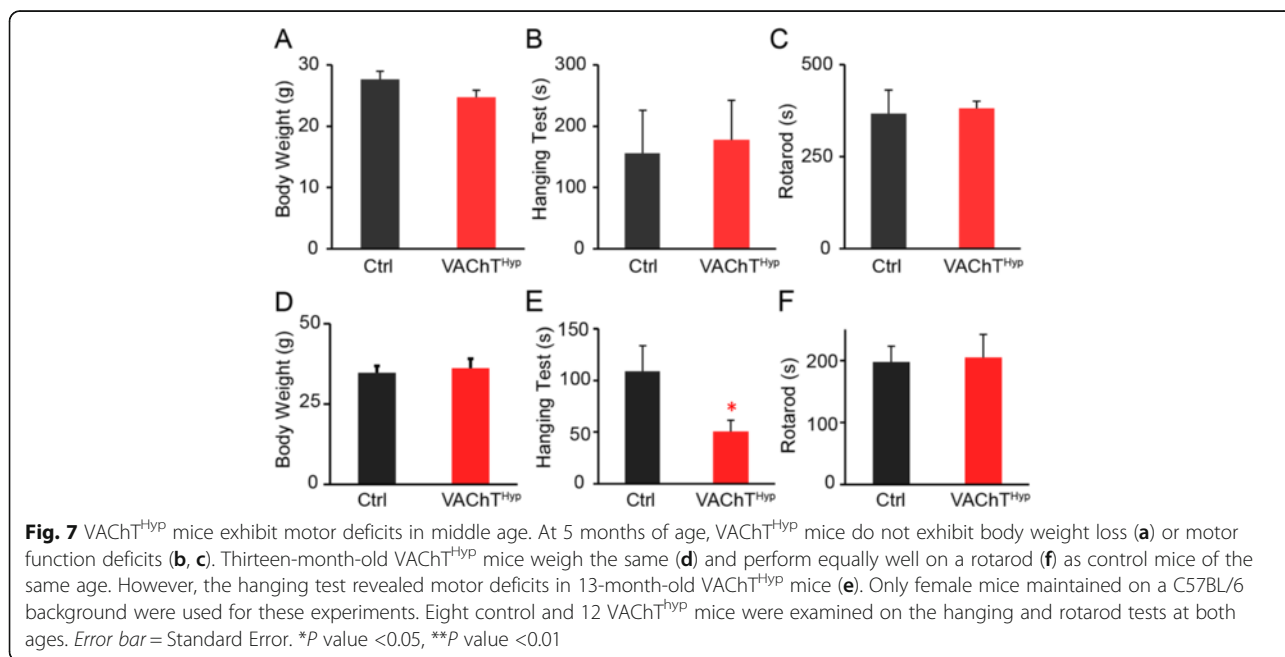


Fig. 5 Accelerated aging of NMJs in aging VACH^{T^{hyp}} mice. α -motor nerve endings (*green* in **a** and **b**) were visualized using an antibody against synaptotagmin-2 (Syn-2; *green*). There were more fragmented and denervated NMJs found in 19-month-old VACH^{T^{hyp}} (**b–d**) compared to control (**a, c–d**) mice of the same age and sex. Four mice per genotype were examined and at least 50 NMJs per animal analyzed. Scale bar = 20 μ m. Error bar = Standard Error. **P* value <0.05, ***P* value <0.01



in 19-month-old VACHT^{HYP} mice is due to atrophy, we examined the location of myonuclei using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Myonuclei located away from the peripheral membrane mark degenerating and regenerating muscle fibers. In 5-month-old VACHT^{HYP} and control mice, all myonuclei were found adjacent to the peripheral membrane. While a small number of muscle fibers contained myonuclei near the middle of

the cytoplasm in 19-month-old mice, there was no difference between VACHT^{HYP} and control mice (Fig. 8f). To further assess the effect of increasing synaptic ACh on muscle fibers, we examined levels of MyHC types 2A, 2B, and 2X in the EDL muscle. Transcripts for these genes were similarly expressed in 5- and 19-month-old VACHT^{HYP} and control mice (Fig. 9a–c). Moreover, levels of myogenin, forkhead box protein O1 (Foxo1), and



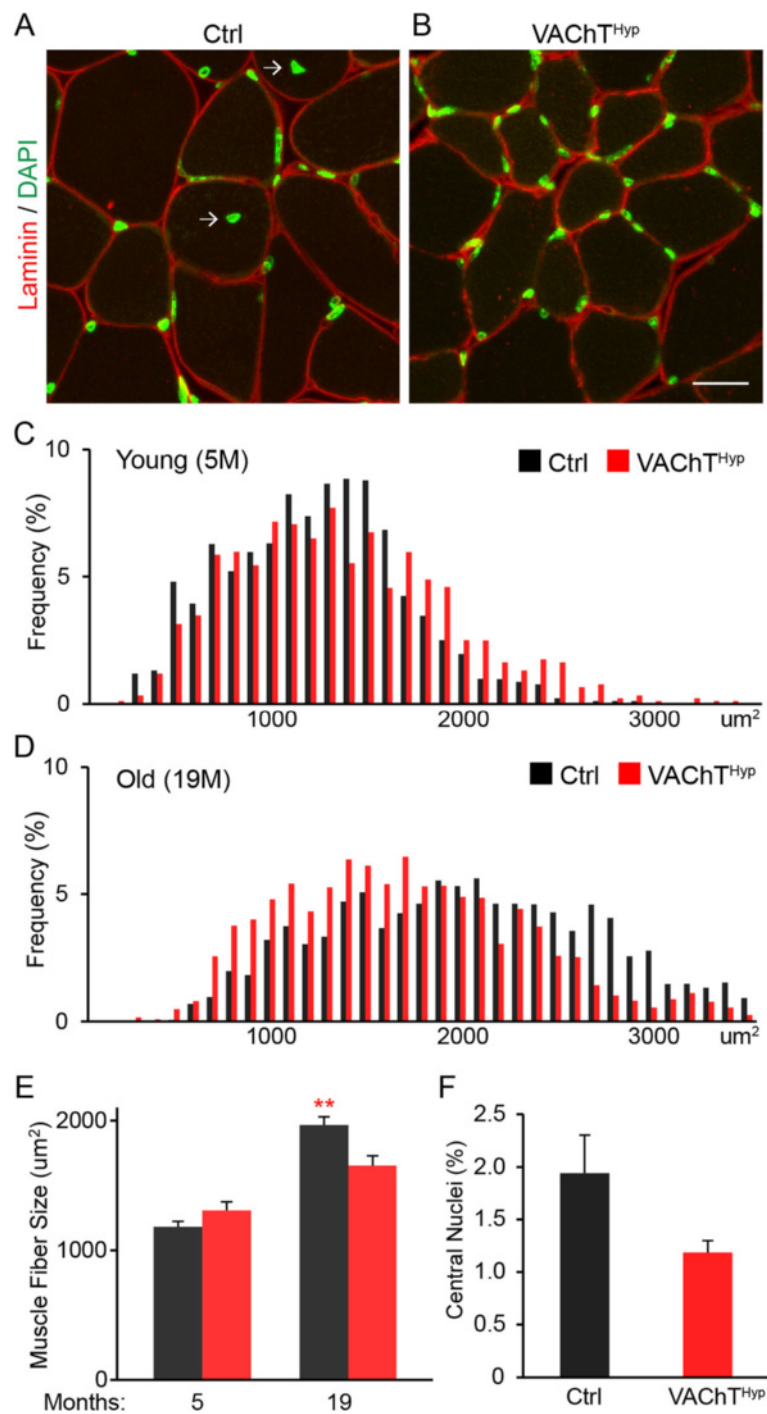


Fig. 8 Analysis of muscle fibers in young adult and old VACHT^{Hyp} mice. Muscle fibers were examined in VACHT^{Hyp} and control mice. Muscle fibers in the TA muscle were stained with an antibody against laminin to visualize their size (red) and labeled with the nuclei marker, DAPI (green), to determine if muscle fibers had undergone bouts of degeneration and regeneration (a, b). Images are from 19-month-old mice. The size of muscle fibers is similar in 5-month-old control and VACHT^{Hyp} mice (c, e). However, muscle fibers are smaller in 19-month-old VACHT^{Hyp} mice (d, e). There are also no significant differences in the number of muscle fibers with centrally located myonuclei between 19-month-old VACHT^{Hyp} control mice (f). At least four female mice per genotype maintained on a C57BL/6 background were used to compare transcript levels. Scale bar = 20 μm . Error bar = Standard Error. **P* value <0.05

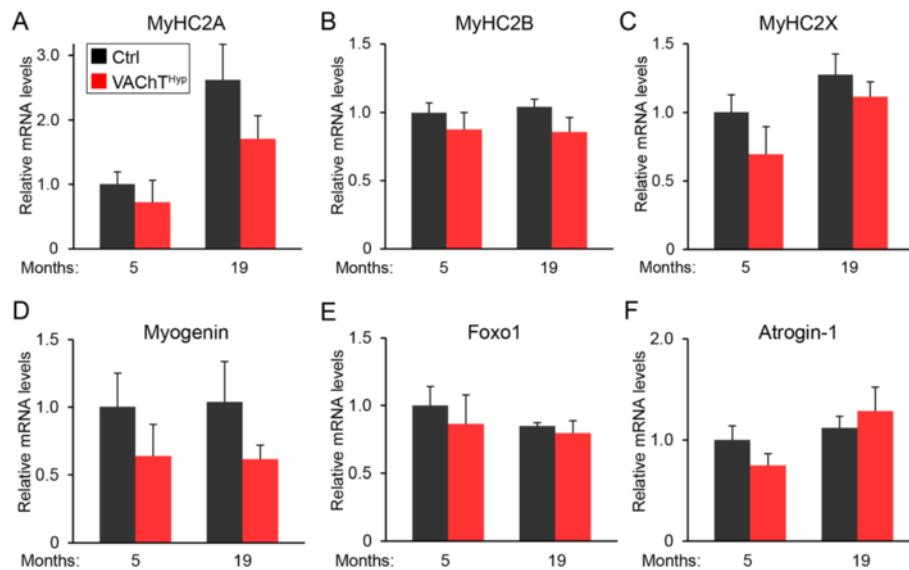


Fig. 9 Analysis of transcripts associated with muscle fiber identity (MyHC2A, MyHC2B, MyHC2X) and markers of muscle regeneration and atrophy (Myogenin, Foxo1, Atrogin-1) revealed no change in the EDL muscle of VACHT^{Hyp} compared to control mice at 5 and 19 months of age (a–f). At least four female mice per genotype maintained on a C57BL/6 background were used to compare transcript levels. Error bar = Standard Error

Atrogin1 [31–33], markers of atrophying and regenerating muscle fibers, were also unchanged in the EDL muscle of VACHT^{Hyp} compared to control mice of the same age (Fig. 9d–f). These findings indicate that the deleterious age-related structural features found at NMJs do not result in significant myogenic changes in VACHT^{Hyp} mice.

Presynaptic degeneration occurs in the absence of obvious changes in motor neurons in VACHT^{Hyp} mice

We next asked if degeneration of NMJs results in loss of motor neurons. For this purpose, we compared the number of motor axons present in the peroneal nerve of control and VACHT^{Hyp} mice expressing tdTomato [18] specifically in cholinergic neurons [17]. To count motor axons, we generated 10- μ m cross sections of the common peroneal nerve, a mixed nerve that innervates the TA, EDL, and other hind limb muscles (Fig. 10a). This analysis revealed no difference in the number of motor axons in 1- and 5-month-old VACHT^{Hyp} mice compared to control mice of the same age (Fig. 10b). The total number of peripheral axons, including sensory afferents, was also unchanged in VACHT^{Hyp} mice (Fig. 10c).

As a response to presynaptic degeneration and increased expression of VACHT, motor neurons may increase expression of agrin isoforms that function to stabilize the NMJ [34]. To explore this possibility, we examined transcripts for neural agrin isoforms (z-agrin) in the spinal cord of 5-month-old VACHT^{Hyp} and control mice. While we found that z-agrin isoforms were not statistically altered in the spinal cord of VACHT^{Hyp} mice compared to control mice, it is worth noting that all

three z-agrin isoforms were moderately and consistently higher, approximately 1.8-fold for all isoforms in VACHT^{Hyp} mice (Fig. 10d). If motor neurons were to increase these z-agrin isoforms in VACHT^{Hyp} mice, it would likely be to stabilize nAChRs on the postsynaptic region, and thus prevent further fragmentation and denervation of NMJs. It is also plausible that overexpression of VACHT results in induction of genes involved in the biosynthesis of ACh. This seems unlikely, however, since the choline acetylcholine transferase (ChAT) is expressed at similar levels in the spinal cord of VACHT^{Hyp} and control mice (Fig. 10e). Together with the lack of axonal degeneration, these findings indicate that increasing synaptic ACh directly affects the structural integrity of the NMJ.

Increased cholinergic transmission accelerates ALS pathogenesis

Early and progressive degeneration of NMJs is a hallmark of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [35]. In addition, dysregulated cholinergic transmission has become recognized as a factor that exacerbates ALS-related pathologies in mice and in cultured motor neurons [36–39]. To determine the impact of altering cholinergic transmission on ALS-related pathological features, we crossed VACHT^{Hyp} mice with SOD1^{G93A} transgenic mice (SOD1^{G93A};-VACHT^{Hyp}). Increasing cholinergic transmission selectively accelerated death of male SOD1^{G93A} mice by approximately 10 days (Fig. 11a). Although male SOD1^{G93A};-VACHT^{Hyp} mice weighed the same as SOD1^{G93A} mice (Fig. 11c), they had diminished motor function before the

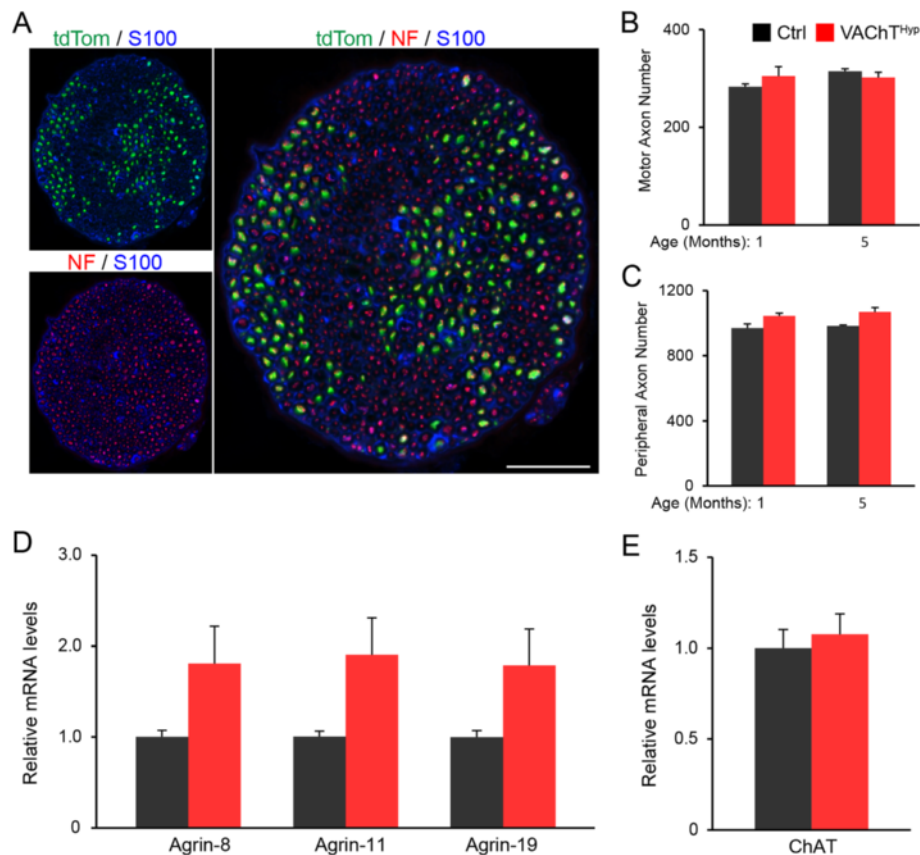


Fig. 10 The number of motor axons and expression of molecules with critical function at the NMJ are unchanged in VACHT^{Hyp} mice. Cross sections (10 μ m) of the common peroneal nerve expressing tdTomato in motor axons were also labeled with antibodies against neurofilament (NF) and the Schwann cell marker, S100, (a). There was no difference found in the number of motor axons (b) or peripheral axons (c) between control and VACHT^{Hyp} mice at 1 and 5 months of age. The expression of neuronal-agrin isoforms (d) and ChAT (e) are not significantly altered in the spinal cords of 3-month-old VACHT^{Hyp} mice. At least four male mice maintained on a C57BL/6 background were used per genotype for axonal counts and expression analysis. Scale bar = 50 μ m. Error bar = Standard Error

onset of neurological symptoms (Fig. 11d, e). At 75 days of age, male SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} mice were unable to stay as long as the SOD1^{G93A} mice on an inverted wire mesh, a test that measures motor function (Fig. 11d, e). Along with early motor deficits, we found that motor axons prematurely vacate NMJs in 90-day-old male SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} (Fig. 11f–h). These early behavioral and cellular changes were specific to male mice; we found no differences in survival between SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} and SOD1^{G93A} female mice (Fig. 11b). We also found no changes in copy numbers between SOD1^{G93A} and SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} mice, strongly suggesting that increased levels of ACh accelerate degeneration of the neuromuscular system in male SOD1^{G93A} mice.

Discussion

Impact of increasing synaptic ACh on NMJs, muscle fibers, and motor neurons

VACHT plays a critical role in the storage of ACh in synaptic vesicles [10, 40, 41]. In VACHT^{Hyp} mice, VACHT

and ACh secretion is increased in brain tissue [9]. Our qPCR and immunofluorescence analysis revealed that VACHT is similarly increased in the spinal cord and at the NMJ. Previous experiments have examined the amount of ACh released from hippocampal slices from these mice [9]. However, these studies did not address whether increased expression of VACHT results in more ACh loaded into synaptic vesicles in vivo and in motor neurons. Our finding that MEPP amplitudes are increased in VACHT^{Hyp} mice strongly suggests that overexpressing VACHT increases ACh accumulation in matured synaptic vesicles. These results suggest that at least a population of mature synaptic vesicles can accumulate higher amounts of ACh upon increased levels of transporter protein. Vesicular ACh accumulation by VACHT is complex and thought to be tightly regulated [42]. Our data suggest that potential changes in expression or trafficking of VACHT to synaptic vesicles can regulate the amount of ACh secreted by nerve endings by direct regulation of

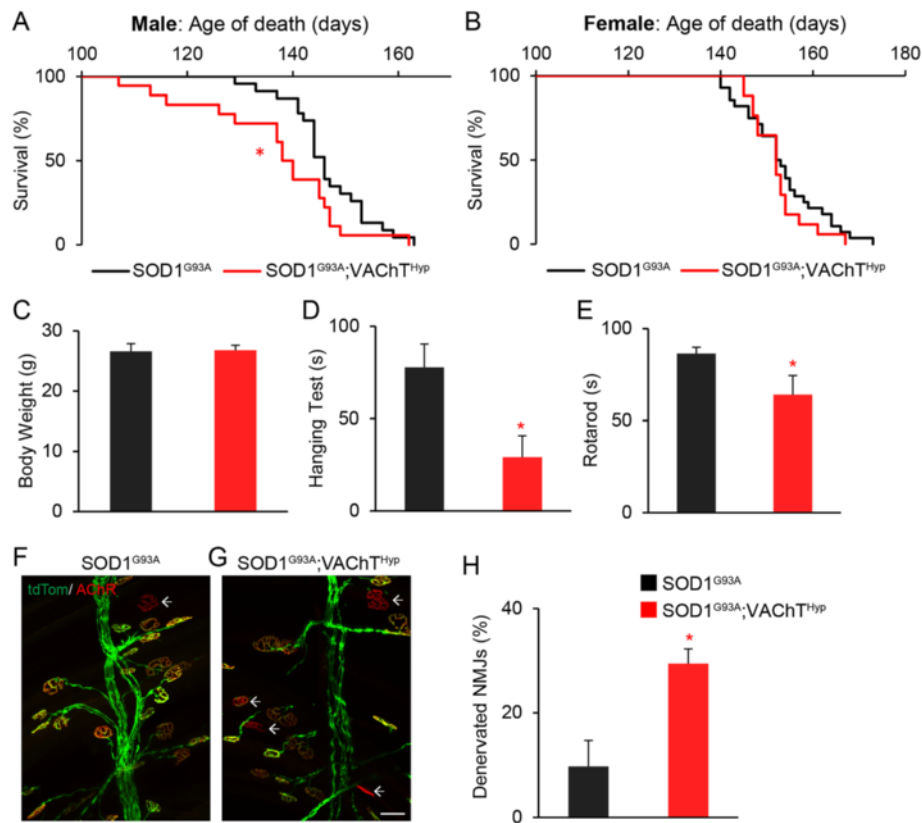


Fig. 11 Overexpression of VACHT accelerates NMJ degeneration and death of male mice expressing SOD1^{G93A}. The lifespan of male and female SOD1^{G93A} alone and crossed with VACHT^{Hyp} mice was determined. Overexpression of VACHT selectively accelerated death of male SOD1^{G93A} mice (a) without altering their weight (c). The average lifespan of female mice was unchanged (b). Male SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} mice also exhibited accelerated motor deficits at 75 days of age (d, e) and accelerated NMJ degeneration at 90 days of age (f–h). All mice were maintained on a C57BL/6 background. For survival and motor tests, SOD1^{G93A} and SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} mice without fluorescence protein were used. Survival curves are based on as follows: Males = 31 SOD1^{G93A} and 21 SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp}. Females = 41 SOD1^{G93A} and 20 SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp}. Motor tests were performed on 10 male SOD1^{G93A} and 10 male SOD1^{G93A};VACHT^{Hyp} mice. NMJ analysis was performed on four male mice per genotype expressing tdTomato in motor neurons. At least 50 NMJs were examined in the EDL muscle per animal. Scale bar = 50 μ m. Error bar = Standard Error. **P* value < 0.05

neurotransmitter accumulation in synaptic vesicles. Previous reports have shown that overexpression of VACHT in immature nerve-muscle *Xenopus* cultures increases both amplitude and frequency of MEPPs. This was interpreted as incorporation of VACHT in immature synaptic vesicles can both increase the amount of ACh stored in vesicles as well as increase the number of filled vesicles available for spontaneous release [43]. We did not observe an increased frequency of MEPPs in adult mice overexpressing VACHT, suggesting that the population of vesicles available for spontaneous release is unchanged in the NMJ.

In addition to its function in neurotransmission, ACh plays a critical role in the development of the NMJ. ACh acts as an anti-synaptogenic molecule by decreasing the stability of AChRs, and through this activity, it is believed to function together with the neural-derived factor, z-agrin, in sculpting the NMJ [5]. In this regard, while deletion of genes that prevent the synthesis [5, 7] and transport [41] of ACh into synaptic vesicles cause

significant changes at NMJs, the impact of increasing synaptic ACh levels on developing and adult NMJs had not been examined. We now show that the rate of synapse elimination, the size of AChR clusters, and their apposition with presynaptic sites are unchanged in developing VACHT^{Hyp} mice. In addition, we found no difference in the development of muscle fibers. The normal development of NMJs and muscle fibers in VACHT^{Hyp} mice may be attributed to different factors. The additional ACh released by motor neurons in VACHT^{Hyp} mice may not change muscle action potentials as ACh is already in excess during development [24]. Another plausible explanation, though not necessarily mutually exclusive, is that synaptic ACh and z-agrin are present at saturating levels compared to nAChRs during development. Thus, developing NMJs and muscle fibers are likely immune to further increasing ACh at the synaptic cleft, as is the case in VACHT^{Hyp} mice. Regarding synaptic elimination, all motor neurons in VACHT^{Hyp} mice are

likely to retain their “competitive vigor” [44, 45] since ACh is likely increased by the same magnitude in all NMJs. Hence, the time motor axons spend competing for the same target would not be expected to change in VACHT^{HYP} compared to those in control mice.

In adulthood, the incidence of NMJs with deleterious structural features increases with aging in control mice, and those features are more pronounced in VACHT^{HYP} mice. These findings indicate that NMJs within the EDL muscle vary in their susceptibility to increased levels of ACh at the synaptic cleft. The EDL muscle is primarily composed of muscle fibers that express myosin heavy chain type 2A and type 2B [28]. Thus, it is plausible that one of these muscle fiber type is more susceptible to increased synaptic ACh levels, a possibility not addressed in this work. Another possibility is that NMJs receiving less resource within a motor unit fail to adequately repair following structural changes driven by increased ACh at their synaptic clefts. In this regard, it has been shown that NMJs within the same motor unit respond differently to aging [28]. It is also possible that some motor neurons are more active, resulting in earlier degeneration of NMJs that make up their motor unit. Thus, an increase in the amount of synaptic ACh together with less functional α -agrin in adult NMJs would result in structural changes due to increased destabilization of AChRs. However, this conclusion is not supported by the lack of changes in transcript for the gamma AChR subunit, which is closely associated with increased internalization and degradation of AChRs. While NMJs are clearly affected in adult VACHT^{HYP} mice, it remains possible that cholinergic dysregulation elsewhere in the peripheral and central nervous system, including the spinal cord, may cause or contribute to the precocious degeneration of NMJs observed in young adult VACHT^{HYP} mice. Regardless, the results in this paper do not support previous suggestions [1, 15] that decreased neuromuscular function as a result of aging and ALS should be reversed by increased release of ACh at the NMJ synaptic cleft. Instead, these findings raise the possibility that the age-related increase in cholinergic transmission reported by several published studies contribute to the degeneration of NMJs [46–50].

It is interesting that old VACHT^{HYP} mice present with worse muscle function than age-matched control mice. This is in striking contrast with better performance of young VACHT^{HYP} mice on the treadmill [9]. Interestingly, recent analysis of the cardiac muscle in VACHT^{HYP} mice showed that they have preserved cardiac function when challenged with angiotensin II, a model of heart failure [51]. These data suggest that the better performance of VACHT^{HYP} mice on the treadmill may be a result of better cardiovascular fitness.

Male SOD1^{G93A} mice are selectively susceptible to increased ACh levels

We also showed that increasing cholinergic transmission selectively affects male mice harboring SOD1^{G93A}. Increased synaptic ACh causes NMJs to prematurely degenerate and accelerates death of male SOD1^{G93A} mice. While our findings demonstrate that increasing synaptic ACh does not affect female SOD1^{G93A} mice, it is worth noting that SOD1^{G93A} mice acquire neurological symptoms by 90 days and die within the first 160 days of life. Hence, it remains possible that increasing ACh at NMJs affects the initiation and progression of ALS-related pathology in long-lived female mice expressing mutant genes known to cause ALS, in addition to further exacerbating neurological symptoms in long-lived male mice expressing the same mutant genes. Irrespective, our data corroborates published findings indicating that male animals and humans are more susceptible to ALS [52, 53], and factors that suspect of altering the initiation and progression of the disease [54–58].

Significance to understanding aging- and disease-related changes at NMJs

It is now recognized that cholinergic dysfunction occurs in neurons harboring ALS-causing mutant genes and during normal aging [1, 35, 36, 59]. In addition, perisynaptic Schwann cells were recently shown to be uniquely sensitive to altered cholinergic transmission prior to the initiation of ALS-related symptoms in a mouse model for the disease [37]. The identification of mutations in cholinergic receptors in patients with ALS provides additional evidence that changes in cholinergic transmission directly drives degeneration of motor neurons and their NMJs [38, 39, 60]. In this regard, the only FDA-approved drug to treat ALS, riluzole, was recently shown to bind and to block the activity of muscle nicotinic AChRs obtained from patients with the disease [61]. The results presented in this paper provide evidence that increased cholinergic tone deteriorates NMJs in a mouse model of ALS and during normal aging. Thus, modulation of cholinergic transmission should be considered in approaches aimed at preventing degeneration of the motor system during the progression of ALS and normal aging.

Conclusions

This study sought to determine the impact of increasing synaptic ACh levels on developing, aging, and ALS-afflicted NMJs using mice expressing multiple copies of VACHT. We showed that while NMJs develop normally in VACHT^{HYP} mice, they progressively degenerate as the mice aged. This study also revealed that destruction of NMJs precedes degeneration of muscle fibers and motor neurons during aging and in mice harboring an ALS-causing mutant gene. Together, the data in

this paper demonstrate that dysregulated levels of ACh cause pathophysiological changes at NMJs and contribute to loss of motor function during aging and the progression of ALS.

Acknowledgements

The authors would like to thank members of the Valdez laboratory, in particular Nicholas Maxwell for genotyping and caring for all the mice used in this study.

Funding

This work supported by the following NIH grants from NINDS (K01NS085071) and NIA (R56AG051501).

Authors' contributions

SS conducted the experiments, analyzed the data, and generated figures 1 and 3–10. LLF and CW generated data for figures 4–5 and 10–11. SKV generated data for figures 1, 3, 6, and 10. MPSMG, WC, LAN, VFP, MAMP, and CG designed and conducted experiments for figure 2. MPSMG and CG generated data for figures 3–4. SS, SKV, MPSMG, CG, VFP, and MAMP contributed to writing and editing the manuscript. GV designed the study, conducted experiments, and prepared the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval

All experiments were carried out under NIH guidelines and animal protocols approved by the Virginia Tech Institutional Animal Care and Use Committee.

Author details

¹Virginia Tech Carilion Research Institute, Virginia Tech, Roanoke, VA, USA. ²Department of Biological Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA. ³Graduate Program in Translational Biology, Medicine, and Health, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA. ⁴Virginia Tech Postbaccalaureate Research and Education (VT PREP) Scholar, Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA. ⁵Departamento de Morfologia, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁶Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁷Robarts Research Institute, Department of Physiology and Pharmacology, Department of Anatomy & Cell Biology, Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, London, ON N6A5K8, Canada.

Received: 4 May 2016 Accepted: 26 August 2016

Published online: 05 October 2016

References

- Tintignac LA, Brenner H-R, Rüegg MA. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. *Physiol Rev*. 2015;95:809–52.
- Harris KP, Littleton JT. Transmission, development, and plasticity of synapses. *Genetics*. 2015;201:345–75.
- Andreae LC, Burrone J. The role of neuronal activity and transmitter release on synapse formation. *Curr Opin Neurobiol*. 2014;27:47–52.
- Lin W, Dominguez B, Yang J, Aryal P, Brandon EP, Gage FH, Lee K-F. Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron*. 2005;46:569–79.
- Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR. Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron*. 2002;36:635–48.
- St John PA, Gordon H. Agonists cause endocytosis of nicotinic acetylcholine receptors on cultured myotubes. *J Neurobiol*. 2001;49:212–23.
- Misgeld T, Kummer TT, Lichtman JW, Sanes JR. Agrin promotes synaptic differentiation by counteracting an inhibitory effect of neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:11088–93.
- Lin W, Burgess RW, Dominguez B, Pfaff SL, Sanes JR, Lee KF. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*. 2001;410:1057–64.
- Kolisnyk B, Guzman MS, Raulic S, Fan J, Magalhães AC, Feng G, Gros R, Prado VF, Prado MAM. ChAT-ChR2-EYFP mice have enhanced motor endurance but show deficits in attention and several additional cognitive domains. *J Neurosci*. 2013;33:10427–38.
- Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim H-G, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MFD, Gomez MV, Guatimosim C, Wetsel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado MAM. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*. 2006;51:601–12.
- Prado VF, Roy A, Kolisnyk B, Gros R, Prado MAM. Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem J*. 2013;450:265–74.
- Ting JT, Feng G. Recombineering strategies for developing next generation BAC transgenic tools for optogenetics and beyond. *Front Behav Neurosci*. 2014;8:111.
- Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM, Feng G. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat Methods*. 2011;8:745–52.
- Rodrigues HA, Fonseca M de C, Camargo WL, Lima PMA, Martinelli PM, Naves LA, Prado VF, Prado MAM, Guatimosim C. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One*. 2013;8:e78342.
- Moloney EB, de Winter F, Verhaagen J. ALS as a distal axonopathy: molecular mechanisms affecting neuromuscular junction stability in the presymptomatic stages of the disease. *Front Neurosci*. 2014;8:252.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994;264:1772–5.
- Rossi J, Balthasar N, Olson D, Scott M, Berglund E, Lee CE, Choi MJ, Lauzon D, Lowell BB, Elmquist JK. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2011;13:195–204.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*. 2010;13:133–40.
- Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson Jr GD, Gage FH, Lichtman JW, Sanes JR. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:14863–8.
- Pérez-García MJ, Burden SJ. Increasing MuSK activity delays denervation and improves motor function in ALS mice. *Cell Rep*. 2012;2:497–502.
- Ren J, Qin C, Hu F, Tan J, Qiu L, Zhao S, Feng G, Luo M. Habenula “cholinergic” neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron*. 2011;69:445–52.
- Sanes JR, Lichtman JW. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:389–442.
- Missias AC, Chu GC, Klocke BJ, Sanes JR, Merlie JP. Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: regulation of the AChR gamma-to-epsilon switch. *Dev Biol*. 1996;179:223–38.
- Takahashi M, Kubo T, Mizoguchi A, Carlson CG, Endo K, Ohnishi K. Spontaneous muscle action potentials fail to develop without fetal-type acetylcholine receptors. *EMBO Rep*. 2002;3:674–81.
- Liu Y, Sugiura Y, Padgett D, Lin W. Postsynaptic development of the neuromuscular junction in mice lacking the gamma-subunit of muscle nicotinic acetylcholine receptor. *J Mol Neurosci*. 2010;40:21–6.
- Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:269–78.
- Chakkalakal JV, Kuang S, Buffelli M, Lichtman JW, Sanes JR. Mouse transgenic lines that selectively label Type I, Type IIA, and Types IIX + B skeletal muscle fibers. *Genesis*. 2012;50:50–8.
- Valdez G, Tapia JC, Lichtman JW, Fox MA, Sanes JR. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One*. 2012;7:e34640.
- Frail DE, Musil LS, Buonanno A, Merlie JP. Expression of RAPSyn (43K protein) and nicotinic acetylcholine receptor genes is not coordinately regulated in mouse muscle. *Neuron*. 1989;2:1077–86.
- Bowen DC, Park JS, Bodine S, Stark JL, Valenzuela DM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Glass DJ, DiStefano PS. Localization and regulation of MuSK at the neuromuscular junction. *Dev Biol*. 1998;199:309–19.

31. Apel PJ, Alton T, Northam C, Ma J, Callahan M, Sonntag WE, Li Z. How age impairs the response of the neuromuscular junction to nerve transection and repair: An experimental study in rats. *J Orthop Res*. 2009;27:385–93.
32. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:14440–5.
33. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117:399–412.
34. Burgess RW, Nguyen QT, Son YJ, Lichtman JW, Sanes JR. Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction. *Neuron*. 1999;23:33–44.
35. Rocha MC, Pousinha PA, Correia AM, Sebastião AM, Ribeiro JA. Early changes of neuromuscular transmission in the SOD1(G93A) mice model of ALS start long before motor symptoms onset. *PLoS One*. 2013;8:e73846.
36. Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C, Wiskow O, Han SSW, Sandoe J, Perez NP, Williams LA, Lee S, Boulting G, Berry JD, Brown RH, Cudkowicz ME, Bean BP, Eggan K, Woolf CJ. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. *Cell Rep*. 2014;7:1–11.
37. Arbour D, Tremblay E, Martineau É, Julien J-P, Robitaille R. Early and persistent abnormal decoding by glial cells at the neuromuscular junction in an ALS model. *J Neurosci*. 2015;35:688–706.
38. Moriconi C, Di Angelantonio S, Piccioni A, Trettel F, Sabatelli M, Grassi F. Mutant human $\beta 4$ subunit identified in amyotrophic lateral sclerosis patients impairs nicotinic receptor function. *Pflugers Arch*. 2011;461:225–33.
39. Sabatelli M, Eusebi F, Al-Chalabi A, Conte A, Madia F, Luigetti M, Mancuso I, Limatola C, Trettel F, Sobrero F, Di Angelantonio S, Grassi F, Di Castro A, Moriconi C, Fucile S, Lattante S, Marangi G, Murdolo M, Orteschi D, Del Grande A, Tonali P, Neri G, Zollino M. Rare missense variants of neuronal nicotinic acetylcholine receptor altering receptor function are associated with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2009;18:3997–4006.
40. de Castro BM, Pereira GS, Magalhães V, Rossato JI, De Jaeger X, Martins-Silva C, Leles B, Lima P, Gomez MV, Gainetdinov RR, Caron MG, Izquierdo I, Cammarota M, Prado VF, Prado MAM. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes Brain Behav*. 2009;8:23–35.
41. de Castro BM, De Jaeger X, Martins-Silva C, Lima RDF, Amaral E, Menezes C, Lima P, Neves CML, Pires RG, Gould TW, Welch I, Kushmerick C, Guatimosim C, Izquierdo I, Cammarota M, Rylett RJ, Gomez MV, Caron MG, Oppenheim RW, Prado MAM, Prado VF. The vesicular acetylcholine transporter is required for neuromuscular development and function. *Mol Cell Biol*. 2009;29:5238–50.
42. Parsons SM. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J*. 2000;14:2423–34.
43. Song H, Ming G, Fon E, Bellocchio E, Edwards RH, Poo M. Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron*. 1997;18:815–26.
44. Buffelli M, Burgess RW, Feng G, Lobe CG, Lichtman JW, Sanes JR. Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature*. 2003;424:430–4.
45. Kasthuri N, Lichtman JW. The role of neuronal identity in synaptic competition. *Nature*. 2003;424:426–30.
46. Banker BQ, Kelly SS, Robbins N. Neuromuscular transmission and correlative morphology in young and old mice. *J Physiol*. 1983;339:355–77.
47. Bhattacharyya BJ, Tsen K, Sokoll MD. Age-induced alteration of neuromuscular transmission: effect of halothane. *Eur J Pharmacol*. 1994;254:97–104.
48. Fahim MA. Endurance exercise modulates neuromuscular junction of C57BL/6Nnia aging mice. *J Appl Physiol*. 1997;83:59–66.
49. Smith DO. Acetylcholine storage, release and leakage at the neuromuscular junction of mature adult and aged rats. *J Physiol*. 1984;347:161–76.
50. Willadt S, Nash M, Slater CR. Age-related fragmentation of the motor endplate is not associated with impaired neuromuscular transmission in the mouse diaphragm. *Sci Rep*. 2016;6:24849.
51. Roy A, Dakroub M, Tezini GCSV, Liu Y, Guatimosim S, Feng Q, Salgado HC, Prado VF, Prado MAM, Gros R. Cardiac acetylcholine inhibits ventricular remodeling and dysfunction under pathologic conditions. *FASEB J*. 2015; 30(2):688–701.
52. Pfohl SR, Halicek MT, Mitchell CS. Characterization of the contribution of genetic background and gender to disease progression in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(2):137–50.
53. McCombe PA, Henderson RD. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend Med*. 2010;7:557–70.
54. McCombe PA, Henderson RD. The Role of immune and inflammatory mechanisms in ALS. *Curr Mol Med*. 2011;11:246–54.
55. Oskarsson B, Horton DK, Mitsumoto H. Potential environmental factors in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin*. 2015;33:877–88.
56. Yu Y, Su F-C, Callaghan BC, Goutman SA, Batterman SA, Feldman EL. Environmental risk factors and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a case-control study of ALS in Michigan. *PLoS One*. 2014;9:e101186.
57. de Jong SW, Huisman MHB, Sutedja NA, van der Kooij AJ, de Visser M, Schelhaas HJ, Fischer K, Veldink JH, van den Berg LH. Smoking, alcohol consumption, and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Am J Epidemiol*. 2012;176:233–9.
58. Alonso A, Logroscino G, Hernán MA. Smoking and the risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81:1249–52.
59. Pousinha PA, Correia AM, Sebastião AM, Ribeiro JA. The giant miniature endplate potentials frequency is increased in aged rats. *Neurosci Lett*. 2015; 584:224–9.
60. Sabatelli M, Lattante S, Conte A, Marangi G, Luigetti M, Del Grande A, Chiò A, Corbo M, Giannini F, Mandrioli J, Mora G, Calvo A, Restagno G, Lunetta C, Penco S, Battistini S, Zeppilli P, Bizzarro A, Capoluongo E, Neri G, Rossini PM, Zollino M. Replication of association of CHRNA4 rare variants with sporadic amyotrophic lateral sclerosis: the Italian multicentre study. *Amyotroph Lateral Scler*. 2012;13:580–4.
61. Deflorio C, Palma E, Conti L, Roseti C, Manteca A, Giacomelli E, Catalano M, Limatola C, Inghilleri M, Grassi F. Riluzole blocks human muscle acetylcholine receptors. *J Physiol*. 2012;590(Pt 10):2519–28.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

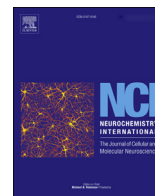
Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/nci

Neuromuscular synapse degeneration without muscle function loss in the diaphragm of a murine model for Huntington's Disease

Priscila A.C. Valadão^a, Matheus P.S.M. Gomes^a, Bárbara C. Aragão^a, Hermann A. Rodrigues^d, Jéssica N. Andrade^a, Rubens Garcias^a, Julliane V. Joviano-Santos^a, Murilo A. Luiz^a, Wallace L. Camargo^b, Lígia A. Naves^b, Christopher Kushmerick^b, Walter L.G. Cavalcante^c, Márcia Gallacci^e, Itamar C.G. de Jesus^b, Silvia Guatimosim^b, Cristina Guatimosim^{a,*}

^a Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

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

^e Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP, Distrito de Rubião Jr., Botucatu, 18618-970 São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 October 2017

Received in revised form

27 February 2018

Accepted 8 March 2018

Available online 10 March 2018

Keywords:

Huntington's disease

BACHD

Neuromuscular junctions

Diaphragm

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease characterized by chorea, incoordination and psychiatric and behavioral symptoms. The leading cause of death in HD patients is aspiration pneumonia, associated with respiratory dysfunction, decreased respiratory muscle strength and dysphagia. Although most of the motor symptoms are derived from alterations in the central nervous system, some might be associated with changes in the components of motor units (MU). To explore this hypothesis, we evaluated morphofunctional aspects of the diaphragm muscle in a mouse model for HD (BACHD). We showed that the axons of the phrenic nerves were not affected in 12-months-old BACHD mice, but the axon terminals that form the neuromuscular junctions (NMJs) were more fragmented in these animals in comparison with the wild-type mice. In BACHD mice, the synaptic vesicles of the diaphragm NMJs presented a decreased exocytosis rate. Quantal content and quantal size were smaller and there was less synaptic depression whereas the estimated size of the readily releasable vesicle pool was not changed. At the ultrastructure level, the diaphragm NMJs of these mice presented fewer synaptic vesicles with flattened and oval shapes, which might be associated with the reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter protein. Furthermore, mitochondria of the diaphragm muscle presented signs of degeneration in BACHD mice. Interestingly, despite all these cellular alterations, BACHD diaphragmatic function was not compromised, suggesting a higher resistance threshold of this muscle. A putative resistance mechanism may be protecting this vital muscle. Our data contribute to expanding the current understanding of the effects of mutated huntingtin in the neuromuscular synapse and the diaphragm muscle function.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease clinically characterized by chorea,

* Corresponding author. Departamento de Morfologia- ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil.

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

incoordination, motor impersistence, psychiatric and behavioral symptoms (Finkbeiner, 2011; Walker, 2007). The worldwide prevalence of HD is 5–10 cases per 100,000 people (Baig et al., 2016). It is caused by an excessive number of CAG repeats (≥ 37) in the Huntingtin gene (*IT15*), which translates into an elongated polyglutamine (polyQ) tail in the Huntingtin (HTT) protein (McNeil et al., 1997; Rubinsztein et al., 1996; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

The leading cause of death in HD patients is pneumonia (Roos,

2010), which is mainly due to dysphagia and aspiration (Heemskerck and Roos, 2011). Respiratory dysfunction, decreased respiratory muscle strength and lung volumes, as well as swallow dysfunction, are some of the factors underlying respiratory failure and dysphagia (Heemskerck and Roos, 2011; Jones et al., 2016).

The main cause of motor symptoms is the death of striatal medium spiny and cortical pyramidal neurons (DiFiglia et al., 1995; Vonsattel and DiFiglia, 1998). Mutant HTT (mHTT) with expanded polyQ are prone to aggregate, thereby affecting several key neuronal processes such as nuclear transcription, apoptosis, mitochondrial function, axonal transport and neurotransmitter release, all eventually leading to neuronal death (Harjes and Wanker, 2003; Li and Li, 2004). Other possible explanations are: i) the mutation of the protein confers a new function to HTT that is toxic to the cell (gain of toxic function); and ii) the normal protein is sequestered in clusters formed by mHTT, thus leading to loss of normal protein function (Browne and Beal, 2004; Imarisio et al., 2008; Zuccato et al., 2010).

The HTT is a 348 kDa multiple domain protein that is usually expressed at high levels in the central nervous system (CNS) of humans and rodents (DiFiglia et al., 1997; Ferrante et al., 1997). Both the normal and mutated forms are also expressed in tissues outside the CNS such as in the skeletal muscle, heart, liver, pancreas, kidney, testis and stomach (Van Der Burg et al., 2009). Although normal HTT can be found in the cell nucleus, the protein is primarily found in the cytoplasm associated to organelles such as the Golgi complex, mitochondria, endoplasmic reticulum, synaptic vesicles, and cytoskeletal components (Hoffner et al., 2002). Interestingly, a large number of proteins interact with HTT to help axonal transport by microtubules (Schulte and Troy Littleton, 2011). Gauthier et al. (2004) showed that normal HTT is capable of improving vesicular transport by interacting with huntingtin-associated protein 1 (HAP1), which is attached to the p150 subunit of dynactin. The HAP 1 is also found associated with motor proteins such as dynein and kinesin that are proteins involved with retrograde and anterograde axonal transport (Caviston and Holzbaur, 2009; Wu and Zhou, 2009; Schulte and Troy Littleton, 2011).

Although several studies have focused on elucidating the mechanisms of neurodegeneration in the brain, the expression of the *HTT* gene and HTT are not restricted to this organ, as they occur in many peripheral tissues, including skeletal muscles (Farrar et al., 2011; Sassone et al., 2009; Smith et al., 2006; Yuen et al., 2012). Previous studies have shown contractility reduction, muscle atrophy, dysregulation of contractile proteins, changes in NMJs, and electrophysiological alterations in skeletal muscles of HD mouse models (Mielcarek, 2015; Sathasivam et al., 1999). However, these studies are limited to the early stages of the disease in mice, which correspond to the pre-clinical manifestation of the disease in humans. There are a few reports considering HD in the skeletal muscles of patients with the late stages of the disease. For example, the sternomastoid muscle, a skeletal neck muscle important for head stability, was investigated by Valadão et al. (2017).

One feature of HD is the progressive weakness and uncoordinated movements of the face, neck, lips and diaphragm muscle, which underlie the chewing and swallowing difficulties that arise in patients later in their life, when the first symptoms of the disease appear (Brotherton et al., 2012). However, the structural and functional alterations in the diaphragm of HD patients remains poorly understood. We have previously described neuromuscular synaptic defects in the diaphragm of 3-months-old BACHD mouse model for HD, which corresponds to the pre-clinical stage in humans. We found morphological alterations in the shape and circumference of synaptic vesicles, decreased exocytosis and a reduction in the amplitude of miniature endplate potentials (MEPPs) in diaphragm NMJs from BACHD mice (de Aragão et al.,

2016). However, the main impairments in diaphragm function occur at later stages of the disease and virtually nothing is known about the changes in this muscle in patients with advanced HD.

To further understand the mechanisms underlying HD progression, we investigated the motor pathology of the diaphragm nerve-muscle communication in the 12-months-old BACHD mouse model, which corresponds to the late clinical manifestation of the disease in humans. The BACHD mouse is a particularly attractive model because it shows symptoms that closely resemble human HD such as progressive motor and cognitive impairment, psychiatric-like disturbances and striatal neuronal loss. Moreover, it allows for the study of the later stages of the disease (Gray et al., 2008).

2. Materials and methods

2.1. Drugs and chemicals

FM1–43, FM1–43fx, α -bungarotoxin (α -btx) and ProLong[®] Gold antifade were purchased from Invitrogen[™]; D-tubocurarine and ADVASEP-7 were purchased from Sigma–Aldrich. All other chemicals and reagents were of analytical grade.

2.2. Animals and ethical procedures

The experimental procedures were carried out in accordance with the protocol approved by the local Ethics Committee on Animal Experimentation - CEUA/UFMG – protocol 036/2013. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. This study was not pre-registered. The experimental procedures in this work were performed at Departments of Morphology and Physiology of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and the Department of Pharmacology, Institute of Biosciences of the Universidade do Estado de São Paulo (UNESP). We used the male mouse from the strains FVB/NJ wild-type (WT) and FVB/N-Tg (HTT*97Q) IXwy/J (BACHD) (RRID: SCR #008197). These transgenic animals were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and were housed at the animal care facility of the Department of Physiology and Biophysics at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Upon arrival, the animals were housed at 23 °C on a 12 h light/12 h dark cycle with food (Nuvilab CR-1) and water provided *ad libitum*. All animals used in this study were genotyped 10 days after birth using multiplex PCR (HTT-Forward: CCGCTCAGGTTCTGCTTTTA/HTT-Reverse: GGTCGGTGCAGCGGCTCCTC.

Actin- Forward: TGGAATCGTGTGGCATCCATCA/Actin- Reverse: AATGCCTGGGTA CATGGGGTA).

All animals used in this study were appropriately identified by numbers according to their genotype (WT or BACHD) and separated into mini-isolator cages (length: 48.3 cm; width: 33.7 cm; height: 21.4 cm) with a maximum of four animals per cage. The mice were randomly divided into two groups using a table of random numbers. The number of experiments is provided in the figure legends/results section. The experimental groups remained constant from the beginning to the end of the study. For all experiments involving morphology and electrophysiology techniques, mice from both genotypes (WT and BACHD) were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 mL/20 g) in accordance with the CEUA/UFMG protocol. All surgical procedures are described in the appropriate following sections. The experimental procedures were performed in the afternoon and by the end of each surgical procedure, animals were euthanized by a super-dosage of anesthetics.

2.3. Nerve-muscle preparation

The phrenic nerve was processed following the transmission

electron microscopy (TEM) protocol (see below, topic 2.8). The semi-thin cross sections (300 nm) obtained and stained with toluidine blue as described were used to capture images of whole phrenic nerve cross-sections from WT and BACHD mice using a 20x objective in a ZEISS Axio Lab. A1 microscope. The cross-sectional area of the nerve was measured using ImageJ plugins (NIH). To quantify axonal myelination we used the G-ratio, which was calculated measuring the axonal inner diameter and dividing it by the outer diameter following the formula: $G = d/D$, where G is the G-ratio, d is the inner diameter, and D is the outer diameter (Chau et al., 2000).

For FM1-43 experiments, the diaphragm muscle was dissected out, split in two hemi diaphragms and bathed in mouse Ringer solution (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM Na₂HPO₄, and 11 mM D-glucose) that was bubbled with a mixture of 95% O₂–5% CO₂ and the pH adjusted to 7.4.

For Transmission Electron Microscopy (TEM) experiments, the diaphragm muscles were fixed in ice-cold modified Karnovsky solution fixative (4.0% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer).

2.4. Staining of pre and post-synaptic elements

Experiments were performed as described previously (Rodrigues et al., 2013). Briefly, immediately after dissection, the diaphragm muscles were labeled with α -btx- Alexa Fluor 555 (12 μ M) for 20 min to visualize the clusters of nicotinic receptors in the postsynaptic membrane. FM1-43fx (8 μ M) was added to stain recycling synaptic vesicles during stimulus with a high-K⁺ solution (60 mM KCl) for 10 min. After stimulation, the diaphragm muscle preparations were maintained at rest in normal Ringer solution with FM1-43fx for 10 min to guarantee maximal dye uptake during compensatory endocytosis. Excess of FM1-43fx adhering to the muscle plasma membrane and nerve terminal membrane was removed during a 40 min washing period in mouse Ringer solution devoid of FM1-43fx. To reduce the background fluorescence, we added Advasep-7 (1 mM) during the washing step (after FM1-43fx staining). Diaphragms were fixed with 4% paraformaldehyde for 40 min and then mounted onto slides using ProLong[®] Gold (Invitrogen, SP, Brazil) mounting medium.

2.5. Confocal microscopy and image analysis

Confocal microscopy experiments followed the steps described in previous works published by our group (Valadão et al., 2017; Rodrigues et al., 2013). Images of NMJs stained with FM1-43fx and α -btx - Alexa Fluor 555 were acquired with a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 880 - located at Center of Acquisition and Processing of Images (CAPI) – ICB/UFGM), using an oil immersion objective (63x/NA 1.4) for quantification of pre and post-synaptic elements. The excitation light came from an argon laser (488 nm) and the emission spectrum was set from 507 to 564 nm to FM 1-43fx. To visualize the α -btx - Alexa Fluor 555 staining, we used a helium-neon laser (543 nm) and the emission light was collected (577–697 nm). Optical sections in Z series mode were collected at 2.0 μ m intervals. During image acquisition, whole hemi diaphragms were scanned and the images were obtained from muscle areas with stained pre and post-synaptic terminals. Quantitative analyses of nerve terminals were carried out with Image J software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). For each set of experiments, the images were converted to a gray scale format of 8 bits. All marked synaptic elements were individually evaluated and the mean fluorescence intensity was considered for comparisons between genotypes. The nerve terminals were identified considering their colocalization with nicotinic acetylcholine

receptors (nAChR) clusters.

We used the method of particles analysis to obtain the NMJs fragmentation index based on the pixels presented in each image (Pratt et al., 2013). Briefly, the images were converted into a binary image pattern and then skeletonized. Next, to describe the connectivity for each pixel in the image, a histogram was generated using the Binary Connectivity Class plugin from ImageJ (Pratt et al., 2013). We analyzed the degree of fragmentation in pre- and post-synaptic elements comparing muscle samples obtained from WT and BACHD mice. The parameters adopted for fragmentation were defined according to evaluation criteria that establish fragmentation by five or more islands both in the presynaptic and post-synaptic membranes, as described by Valdez et al. (2010).

2.6. Monitoring exocytosis with FM1-43

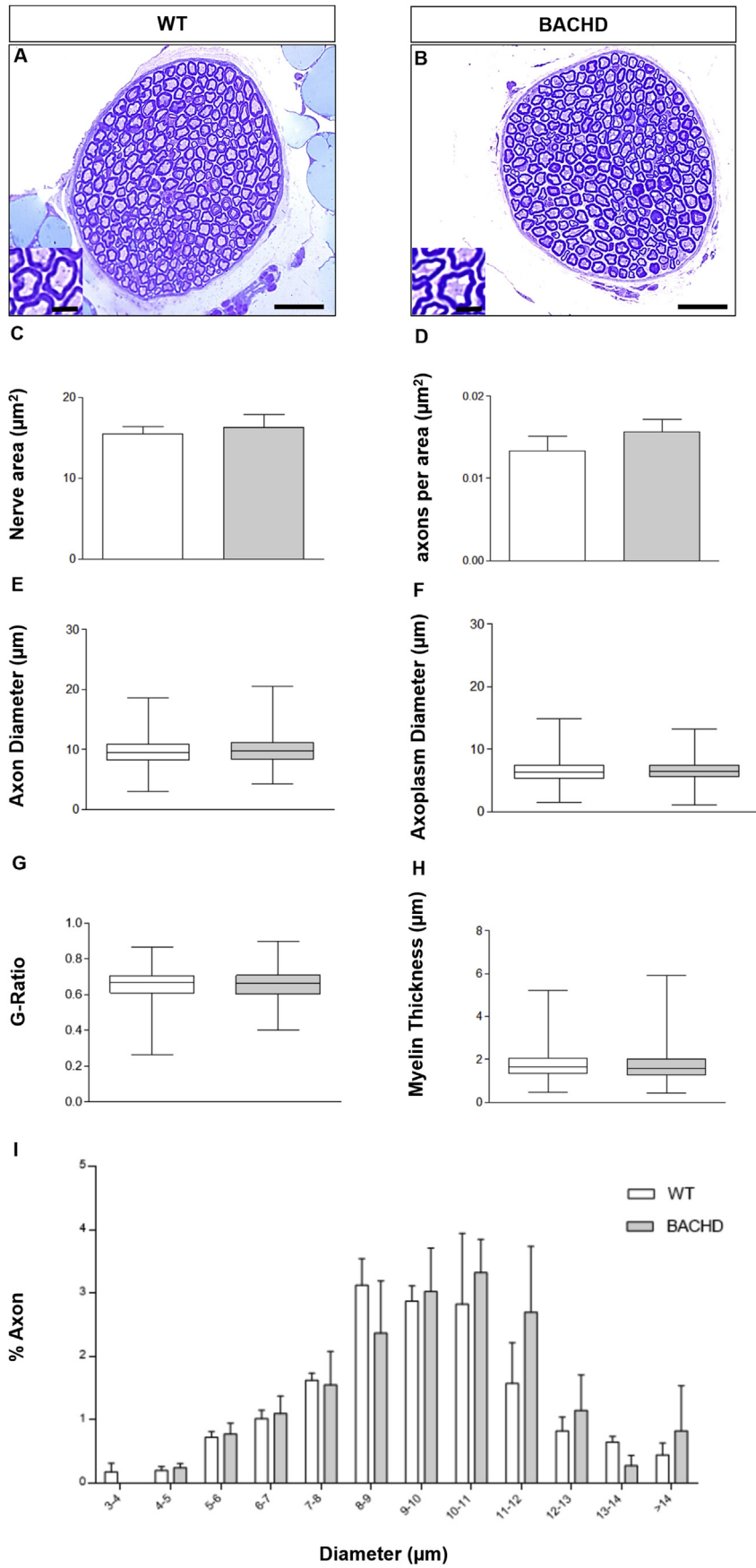
These experiments were performed as described in de Aragão et al. (2016) and Rodrigues et al. (2013). The fluorescent dye FM1-43 binds reversibly to the outer leaflet of biological membranes membrane without permeating them, being a powerful tool to track exocytosis, endocytosis and recycling of secretory granules or vesicles (Betz and Bewick, 1992). FM1-43 binds to the synaptic membrane and after a stimulus that causes exocytosis of synaptic vesicles and consequently a compensatory endocytosis, the fluorescent dye is incorporated. This results in a typical staining pattern of the synaptic vesicles (Betz and Bewick, 1992). When the nerve terminals are subjected to a new round of stimulation in the absence of FM1-43 in the external medium, the dye is released into the hydrophilic medium, leading to a decrease in the fluorescence intensity, which represents the exocytosis of synaptic vesicles (Rizzoli and Betz, 2004; Betz et al., 1996; Betz and Bewick, 1992). The neuromuscular preparations were stimulated by the addition of a saline solution containing a high concentration of potassium (60 mM KCl) in the presence of the vital dye FM1-43 (4 μ M) for 10 min. After stimulation, the preparation was left for 10 min to rest in Ringer solution containing FM1-43. Then, the preparation was washed in Ringer solution devoid of FM1-43 for at least 20 min to allow the excess of labeled FM1-43 adhered to the membrane of the synaptic terminal and the muscle cell membrane to be removed. The preparations were incubated in the presence of D-tubocurarine (16 μ M) to prevent muscle contractions during the entire experimental procedure. For each animal, we used only one presynaptic terminal for monitoring the destaining process (exocytosis).

2.7. Optical imaging and analyses

Images of NMJs stained with FM1-43 were acquired using a fluorescence microscope (Leica DM2500) coupled to a Leica DFC 345FX camera and visualized in a microcomputer with the Leica Application Suite software (LAS). The microscope was equipped with a water immersion objective (63x, 0.95NA). Excitation light came from a 100-W Hg lamp and passed through filters (505/530 nm) to select the fluorescence spectrum appropriate to the excitation of the FM1-43. All image adjustment variables such as binning and the exposure time were maintained constant for images acquired in the same experiment. Image analyses were performed using the software Image J allowing quantification of the brightness of several regions of interest. The mean fluorescence intensity was determined for each group of fluorescent spots and plotted as a percentage of its mean initial fluorescence using Microsoft Excel and Graph Pad Prism 4.0.

2.8. Transmission electron microscopy

These experiments were performed as described in Rodrigues



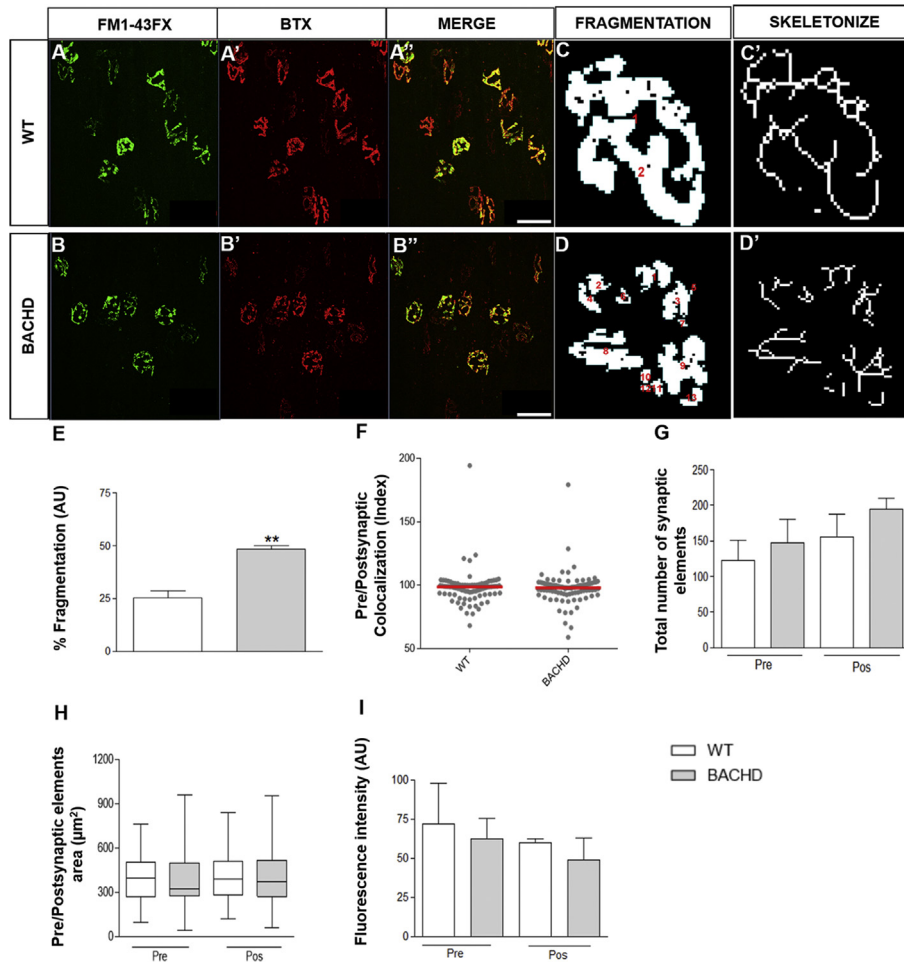


Fig. 2. BACHD mice show fragmentation of diaphragm neuromuscular junctions (NMJ). A–B'': Representative images of diaphragm NMJs of 12-months-old WT and BACHD mice. A and B: Presynaptic terminals labeled with FM1-43fx (green). A' and B': Postsynaptic acetylcholine receptors (AChRs) labeled with Alexa-555 α -bungarotoxin (red). A'' and B'': Merged images. C and D: Representation of the particle analysis for both genotypes (red numbers indicate the number of fragments in each NMJ). C' and D': Skeletonization rendering of fragmentation in endplates from WT and BACHD. E–I: Graphs showing fragmentation of NMJs (E), the index of co-localization (F), total number of synaptic elements (G), pre- and postsynaptic elements area (H) and fluorescence intensity (I). Results are presented as mean \pm SD of 55 NMJs per genotype. Mann-Whitney test (F and H); unpaired Student's *t*-test (E, G and I); ***p* = 0.0031; *n* = 3 animals per genotype. Scale bar = 50 μm . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

et al. (2013). For ultrastructural analysis, diaphragm muscles were fixed overnight in a modified Karnovsky solution at 4 °C. After fixation, the samples were washed with cacodylate buffer (0.1 M). The preparations were cut into several pieces, post-fixed in reduced osmium (1% osmium tetroxide containing 1.6% potassium ferrocyanide) for 90 min at 4 °C, washed with water, contrasted *en bloc* with uranyl acetate (2% uranyl acetate in deionized water) and dehydrated through an ascending series of ethanol solutions. After dehydration, the samples were embedded in EPON resin. Then, the blocks were sectioned in semi-thin sections (300 nm) that were placed onto glass slides and stained with toluidine blue to aid the selection of regions of interest. Ultra-thin sections (50 nm) were collected on 300 mesh copper grids and contrasted with lead citrate. The sections were viewed with a Tecnai-G2- Spirit-FEI/Quanta electron microscope (120 kV Philips) located at the UFMG's

Microscopy Center.

2.9. TEM imaging analysis

NMJs were selected based on the presence of mitochondria and junctional folds in the postsynaptic membrane. Single sections through terminals of interest were traced and the cross-section area of each nerve terminal and the number of synaptic vesicles were determined. Analyses were performed as described in Rodrigues et al. (2013).

Vesicle circumference was measured using equation $2\pi [(d/2 + d_2)/2]$ 0.5 considering the longest diameter (*d*) and the diameter at right angles (*d*₂) (Van der Kloot et al., 2002). Synaptic vesicles shape was determined using the equation: shape factor = $(4 \times \pi \times \text{area})/(\text{perimeter})^2$. This parameter reaches a maximum of

Fig. 1. BACHD mice do not present alterations in phrenic nerve morphology. A–B: Representative images of axons from 12-months-old WT and BACHD mice, respectively. Note the typical axons with preserved structure in both genotypes (inserts in A and B). Axons were stained with toluidine blue. Scale bar: 10 μm . C–H: Quantification of nerve area (C), number of axons per nerve area (D), axon's diameter (E), axoplasm diameter (F), G-ratio [$G = d/D$, where *G* is the G-ratio, *d* is the inner diameter, and *D* is the outer diameter] (G), and myelin thickness (H). I: Histogram of the axonal size. *n* = 3 animals per group. We analyzed one semi-thin section per animal; 659 axons in WT and 708 in BACHD. Mann-Whitney test (E, F, G and H); unpaired Student's *t*-test, *p* > 0.05 (C, D and I). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

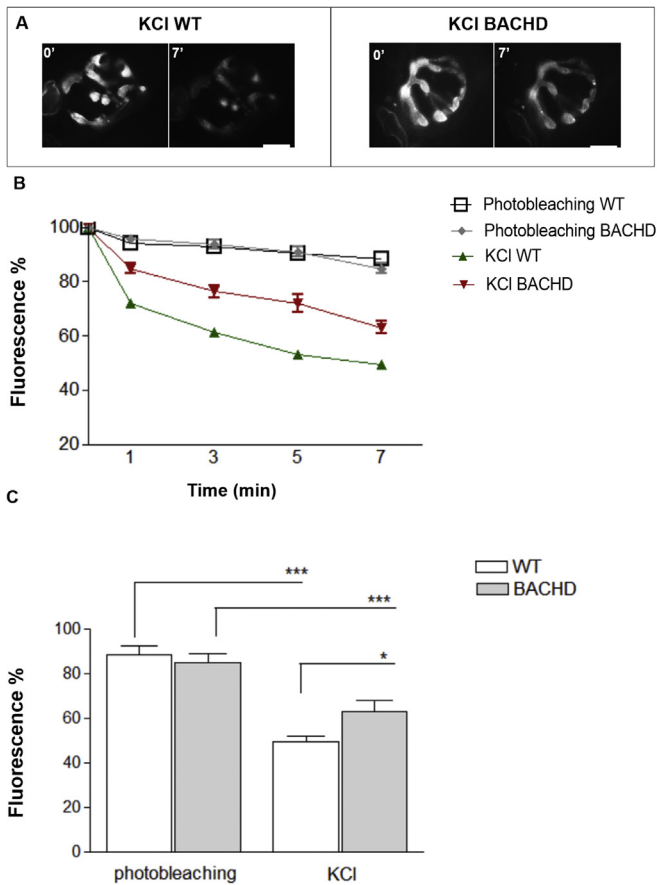


Fig. 3. BACHD mice show decreased synaptic vesicles exocytosis in the diaphragm nerve terminals. A: Representative images of the axon terminal of WT and BACHD diaphragm labeled with FM1-43 before (time 0') and 7 min (time 7') after the depolarizing stimulus. B: Fluorescent signal decay during 7 min following the depolarizing stimulus in WT (green) and BACHD (red) nerve terminals. Black and gray curves represent fluorescence decay control due to photobleaching. C: Graph showing fluorescence decay due to photobleaching and exocytosis evoked by KCl stimulus in WT (white) and BACHD (gray) animals. Five fluorescent points per nerve terminal were analyzed and four animals per genotype were used for quantification. The results express the mean \pm SEM of 20 fluorescent points for each experimental group. Unpaired Student's t-test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$. Scale bar = 10 μ m. (For interpretation of colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

1 for a circular object (Croft et al., 2005). The values for circumference and shape factor are shown by a histogram and a cumulative probability plot and compared using the Mann Whitney test. The graphs were plotted using the software Minitab and Sigma Plot 10.0 0 (SyStat Software) Graph Pad Prism 4.0. While determining the average circumference of the synaptic vesicles, we did not correct for variability in the plane of the section through which the vesicles were cut. Although this is likely to underestimate vesicle diameter and lead to variability in size and shape, we did not expect this to change the interpretation of our results. Indeed, these effects should be similar for the identically prepared samples from WT and BACHD mice. Van der Kloot et al. (2002) used a similar approach.

2.10. Electrophysiology

Hemi-diaphragm nerve-muscle preparations were prepared as described above and maintained in Ringer solution bubbled with carboxygen (5%CO₂/95% O₂) at room temperature (22–24°C). For recordings, muscles were pinned onto a bed of silicon rubber (Sylgard; DowCorning, Midland, MI) in a 5 mL chamber on the stage

of a dissecting microscope and perfused with carboxygenated Ringer at 1–2 mL/min. Microelectrodes were fabricated from borosilicate glass using a Narishige puller (PN-30) and had resistances of 8–15 M Ω when filled with 3M KCl. Recordings were made with an Axoclamp 2A 10-X preamplifier (Molecular Devices) connected to a CyberAmp 380 (Molecular Devices) that filtered the signal at a band with of 0.1–5 kHz and then applied further amplification by 20–100 times, as needed. A second channel recorded the DC-coupled 10 times V_m signal which was used to correct for resting potential and non-linear summation (see below). Data was sampled at 100 kHz by a digital-to-analog converter (National Instruments) in a PC computer controlled by the program WinEDR (kindly provided by John Dempster, University of Strathclyde).

Microelectrodes were inserted into the muscle fibers in the endplate region as verified by the presence of miniature endplate potential (MEPP) with rise time < 1 ms. To measure quantal size, tetrodotoxin (100 nM) was included in some experiments to avoid action potentials and movement artifacts. In experiments with nerve stimulation, we used the cut-fiber method (Barstad and Lilleheil, 1968) which depolarizes the nerve fiber thus preventing muscle contraction. For stimulation, the nerve was drawn into a suction electrode and suprathreshold 0.1 ms voltage pulses were applied. Amplitudes of EPPs and MEPPs were corrected to a standard resting potential of –70 mV for intact fibers or –36 mV for cut fiber experiments. EPP amplitudes were further corrected for non-linear summation (McLachlan and Martin, 1981).

To measure quantal size in intact fibers, we sampled >100 MEPPs from each of 5 fibers from 5 animals of each genotype. For measurements of EPP, quantal content, tetanic depression and readily-releasable pool, measurements were from 4 to 7 fibers per animal from 3 different animals per genotype. The nerve stimulation protocol consisted of 90 stimuli applied at 0.3 Hz followed by 1500 stimuli at 30 Hz. MEPP amplitudes were captured during the intervals between stimuli. Quantal content was calculated by the direct method and expressed in units of EPP/MEPP, for which quantal size (i.e. MEPP amplitude) was determined separately for each fiber. Synaptic depression was calculated as the average of 30 EPP amplitudes at the end of a 50 s train at 30 Hz, normalized to the amplitude of the first EPP in the train. Readily-releasable pool was estimated by fitting a line to the relationship of QC vs Σ QC (Elmqvist and Quastel, 1965). For these calculations, the linear fit started at the second EPP, to allow for facilitation and 10 EPPs were used for the fit. Estimates of RRP are expressed in units of EPP/MEPP (i.e. quanta).

2.11. Neuromuscular preparation and recording of muscle contractions

The phrenic nerve-diaphragm muscle preparation was removed and mounted for myographic recording “in vitro”, as described by Gallacci and Oliveira (1994). Briefly, the preparation was mounted vertically in a conventional isolated organ-bath chamber containing 15 mL of Ringer's solution. This solution was gassed with O₂ (95%) + CO₂ (5%) and maintained at 35°C. Muscle contractions were recorded by isometric force transducer (FT03, Grass) coupled to an AcquireLab Data Acquisition System (Gould). Indirect contractions were evoked by supramaximal strength pulses delivered from an electronic stimulator (S88K, Grass) and applied to the phrenic nerve using a suction electrode. Once mounted in the test apparatus, muscles were allowed to stabilize for 30 min, and an indirect stimulation (0.2 Hz, 5 ms) was used to establish the muscle viability.

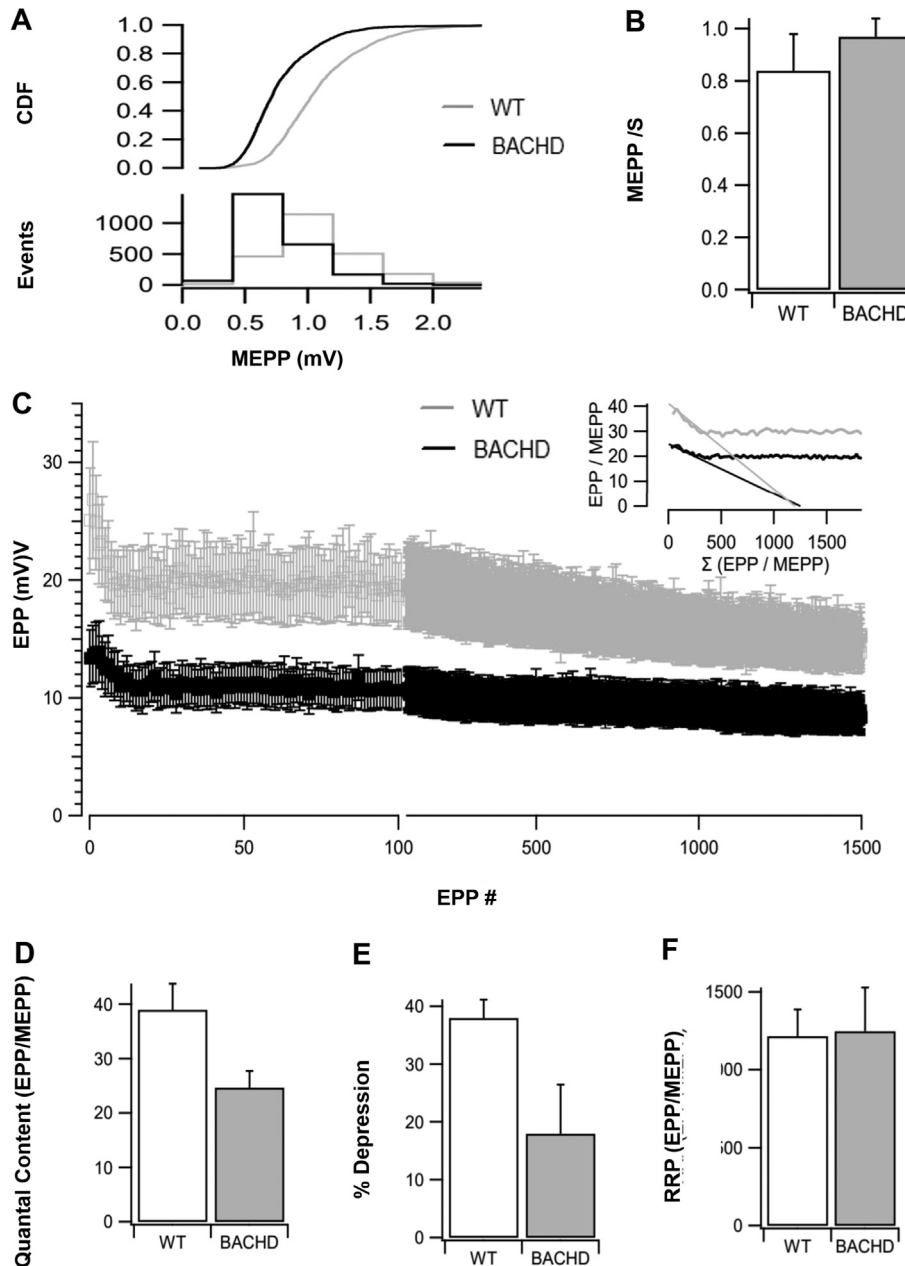


Fig. 4. Reduced quantal release at BACHD NMJs. A: Amplitude cumulative distribution function (CDF) and histogram for MEPPs recorded from WT NMJ (grey lines) or BACHD NMJ (black lines). Groups are pooled from 5 animals of each genotype. For each group, 4–5 fibers were sampled from each animal, resulting in 24 fibers in each group. B: Frequency of MEPPs measured in WT or BACHD NMJ. Data are from the same groups as shown in panel A. C: Average EPP amplitudes during 30 Hz stimulation. Data are pooled from 3 animals of each genotype, 4–7 fibers per animal, resulting in $N = 14$ fibers (WT) and 20 fibers (BACHD). Note change in horizontal scale after EPP# 100. Inset: Average quantal content of each EPP in the stimulus train plotted against the cumulative quantal content. Quantal content was determined as EPP/MEPP where quantal size was determined for each fiber by recording MEPPs in the intervals between evoked events. Lines indicate extrapolation of the initial linear phase of depression to the horizontal axis to estimate RRP. D: Average quantal content of EPPs recorded during low frequency stimulation (0.3 Hz). E: Extent of depression induced by 50 s of 30 Hz stimulation. For each fiber, the average amplitude of 15 events at the end of a 50 s train were normalized to the amplitude of the first EPP in the train. F: Readily reliable pool, determined for each fiber using the method illustrated in the inset to Panel C. Experimental groups for Panel C insert, Panel D and Panel E are the same as described above for Panel C. For determination of RRP, fibers that exhibited less than 15% depression generated unreliable estimates and were excluded from analysis, resulting in $N = 12$ fibers for WT and 14 fibers for BACHD.

2.12. Safety margin of synaptic transmission

The overall safety margin of the synaptic transmission was evaluated from the susceptibility of indirectly evoked contractions of the diaphragm muscle to the blockade induced by the addition of increasing concentrations of pancuronium bromide or magnesium to the organ bath, allowing 10 min between each concentration. The ratio of muscle tension in the presence and absence of

pancuronium or magnesium was used to estimate the safety margin of neuromuscular transmission.

Other preparations were submitted to a gradual increase of tetanic stimulation, starting at 70 Hz and ending at 220 Hz, with a gradual increase of 10 Hz. Each tetanus lasted 5 s with an interval of 10 min between them. During this interval, supramaximal pulses (0.2 Hz; 0.5 ms) evoked indirect contractions. The ability of the preparation to support the different tetanus was assessed by the

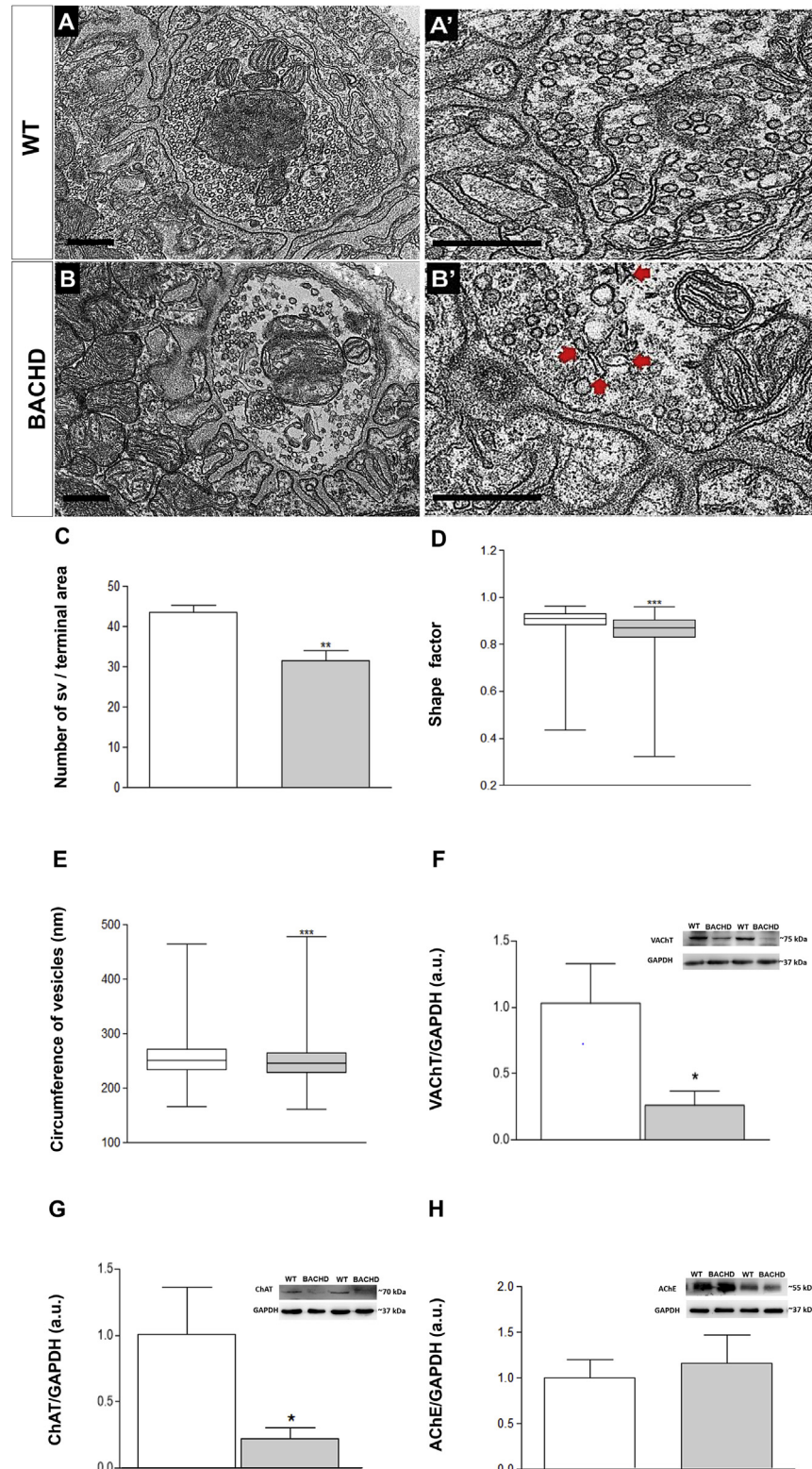


Fig. 5. BACHD mice present ultrastructural changes in the morphology of the synaptic vesicles of diaphragm NMJs. A: Representative image of a WT diaphragm nerve terminal. B: Representative images of a BACHD nerve terminal presenting synaptic vesicles with heterogeneous sizes. Scale bar = 500 nm. A' and B': Representative images showing nerve terminals with changes in the size and shape of the synaptic vesicles (red arrows). Scale bar = 500 nm. C: Graph representing the number of synaptic vesicles per terminal area (Unpaired student's t-test; * $p = 0.0286$). D: Boxplot comparing the synaptic vesicles shape in WT and BACHD mice (Mann Whitney test, *** $p < 0.0001$). E: Boxplot comparing synaptic vesicles circumference in WT and BACHD mice (Mann Whitney test, *** $p < 0.0001$). We analyzed at least 15 NMJs profiles from three animals per genotype. All integrally visualized synaptic vesicles were used for the quantification of shape and circumference. A total of 3723 synaptic vesicles were analyzed for WT and 2343 for BACHD F–H: Western blot analysis of VAcHT (F), ChAT (G) and AChE (H) proteins in diaphragm muscle of WT and BACHD. GAPDH was used as a control of protein loading between experiments. GAPDH protein levels are similar between WT and BACHD. Data are presented as a percentage of WT (Unpaired student's t-test; *** $p = 0.0286$, * $p = 0.04$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

relationship between the amplitude of the initial tetanic peak amplitude and the moment at which the stimulus was ended.

2.13. Fatigue resistance

After the diaphragm muscle was stabilized, the preparations were submitted to a repeat sequence of 30 tetanic contractions, with 5 s long, 130 Hz and an interval of 20 s. Fatigue resistance was defined as the amplitude of the last contraction of the series relative to the first, expressed as a percentage. Results were expressed as mean \pm S.E. Data were analyzed by ANOVA complemented by the Tukey-Kramer test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

2.14. Western blot

To detect the vesicular ACh transporter (VAChT), Choline acetyltransferase (ChAT) and Acetylcholinesterase (AChE) in diaphragm muscles, 50 μ g of protein were separated by SDS-PAGE. The antibodies used and their sources are as follow: anti-VAChT (1:2000; Sigma-Aldrich Cat# V5387 RRID: AB_261875), anti-ChAT (1:1000; Abcam Cat#ab70219 RRID: AB_1209541) and anti-AChE (1:1000; Thermo Fisher Scientific Cat#MA3-042 RRID: AB_325478) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:3000; Santa Cruz Biotechnology Cat#sc-20356 RRID: AB_641103). Validation data for each antibody were obtained from the data-sheet provided by the company. Immunodetection was carried out using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences). Protein levels were expressed as a ratio of optical densities. GAPDH was used as a protein loading control.

2.15. Statistical analysis

All data were registered using Microsoft Excel and were plotted using the program GRAPHPAD PRISM 6. For data with normal distribution, values were represented as the mean \pm standard deviation (mean \pm SD) and statistical significance was evaluated using the unpaired Student's *t*-test. When data were not normally distributed, the values were represented as the median and the Man-Whitney test was used to assess statistical significance. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Exact *p*-values are provided in the figure legends. During the analyses, the investigators were blinded to the genotypes and experimental groups. Each genotyped animal was assigned a number that was revealed to the investigator only after the analyses ended.

In this work, we used a minimum of three animals per genotype for each data set to detect a difference at 95% confidence ($\alpha = 0.05$) and 0.8 statistical power. The exact *n* for each experimental procedure is described in the figure legends. All data points were treated as outliers and excluded from the data analysis outside the 95% confidence interval.

3. Results

We previously described neuromuscular synaptic defects in the diaphragm of adult (3-months-old) BACHD mice (de Aragao et al., 2016). Herein, we asked if aging would exacerbate those defects. We initially looked at the structure of the phrenic nerve that is responsible for innervation of the diaphragm muscle in 12-months-old BACHD and WT mice. Histological analysis of this nerve showed that, in both genotypes, the phrenic nerve was preserved (Fig. 1A–B), with no alterations in the analyzed parameters: i) nerve area (C) ii) number of axons per area (D); iii) axon diameter (E); iv) axoplasm diameter (F); v) G-ratio (G); and vi) size of the axons (H).

Labeling the nerve-muscle preparations with the activity-

dependent fluorescent marker FM1-43fx and the postsynaptic nicotinic receptors for ACh with the α -btX conjugated to Alexa Fluor 555, revealed significant alterations in the motor nerve terminals during depolarizing stimulus. Fig. 2 shows representative images of pre- and postsynaptic elements of the diaphragm NMJs of WT (Fig. 2A–A'') and BACHD (Fig. 2B–B'') mice. Fragmentation analysis showed that diaphragm NMJs from 12-month-old BACHD mice are more fragmented than diaphragm NMJs of WT animals (Fig. 2C–C', D–D' and E). The quantitative analysis of the pre- and postsynaptic elements showed no statistically significant differences in the following morphological parameters: i) co-localization of pre- and postsynaptic elements (Fig. 2F); ii) total number of elements (Fig. 2G); iii) area of the elements (Fig. 2H). Measuring endocytic activity through fluorescence intensity of the presynaptic elements did not reveal significant differences between the genotypes (Fig. 2I). Next, using FM1-43, we measured the exocytosis of synaptic vesicles in the diaphragm NMJs of BACHD and WT animals. The fluorescence intensity was reduced in the diaphragm NMJs of both BACHD and WT mice, especially in the later (Fig. 3B). The KCl-evoked decrease in the fluorescent signal in the nerve terminals was greater in the WT in comparison with the BACHD mice (Fig. 3C). Diaphragm NMJs of WT mice showed a decrease in fluorescence of approximately 50% whereas the diaphragm NMJs of BACHD mice lost about 35% of their fluorescent signal (Fig. 3C). No significant differences were observed between WT and BACHD photobleaching values (Fig. 3C).

Electrophysiological recordings show that MEPPs of BACHD mice have smaller amplitudes when compared with WT (Fig. 4A). In contrast, there was no significant difference in MEPPs frequency between the two genotypes. (Fig. 4B).

Since we found that BACHD animals have a decreased rate of destaining, which suggests an impairment in the exocytosis, we measured evoked release during low frequency (0.3 Hz) and high frequency (30 Hz) stimulation. In between evoked events, we captured MEPPs to calculate quantal content by the direct method (EPP/MEPP). Both EPP amplitude and quantum content were significantly reduced in BACHD animals (WT: EPP = 26.6 ± 5.5 mV, QC = 39 ± 4.8 ; BACHD: EPP = 14.0 ± 2.5 mV QC = 24.7 ± 3.1 , $p < 0.05$). During high frequency stimulation, average EPP amplitude declined in both WT and BACHD groups, however tetanic depression was stronger in WT groups (Fig. 4E). At the end of a 50 s train at 30 Hz, EPP amplitudes in WT fibers had declined by $38 \pm 3.2\%$ of compared to a decline of only $18 \pm 8.5\%$ in the BACHD Group ($p < 0.05$).

We estimated the size of the Releasable pool using a calculation based on the method of Elmqvist and Quastel (1965). EPPs were measured during 30 Hz stimulation and the QC of each EPP in the train plotted as a function of the cumulative release (Fig. 4C, insert) and a line fit to the initial, linear phase of depression and extrapolating to the horizontal axis. These data indicate an available pool of about 1200 quanta, with no significant difference between WT and BACHD animals. Based on these results, we conclude that, although the pool of vesicles available is similar in WT and BACHD NMJ, the BACHD group have a lower release probability, resulting in fewer quantal released. These findings explain the reduction in FM-143 destaining as described above. A consequence of the reduced release probability is that BACHD exhibit less synaptic depression during 30 Hz stimulation.

Since we observed a decrease of quantal size in the diaphragm NMJs of BACHD, we investigated whether there were ultrastructural changes in the size and shape of the synaptic vesicles in the diaphragm NMJs of these mice. The qualitative analysis of the electron micrographs of the diaphragm NMJs showed that the nerve terminals of both genotypes presented similar morphology of the terminal area and post-junctional folds (Fig. 5A–B). We also

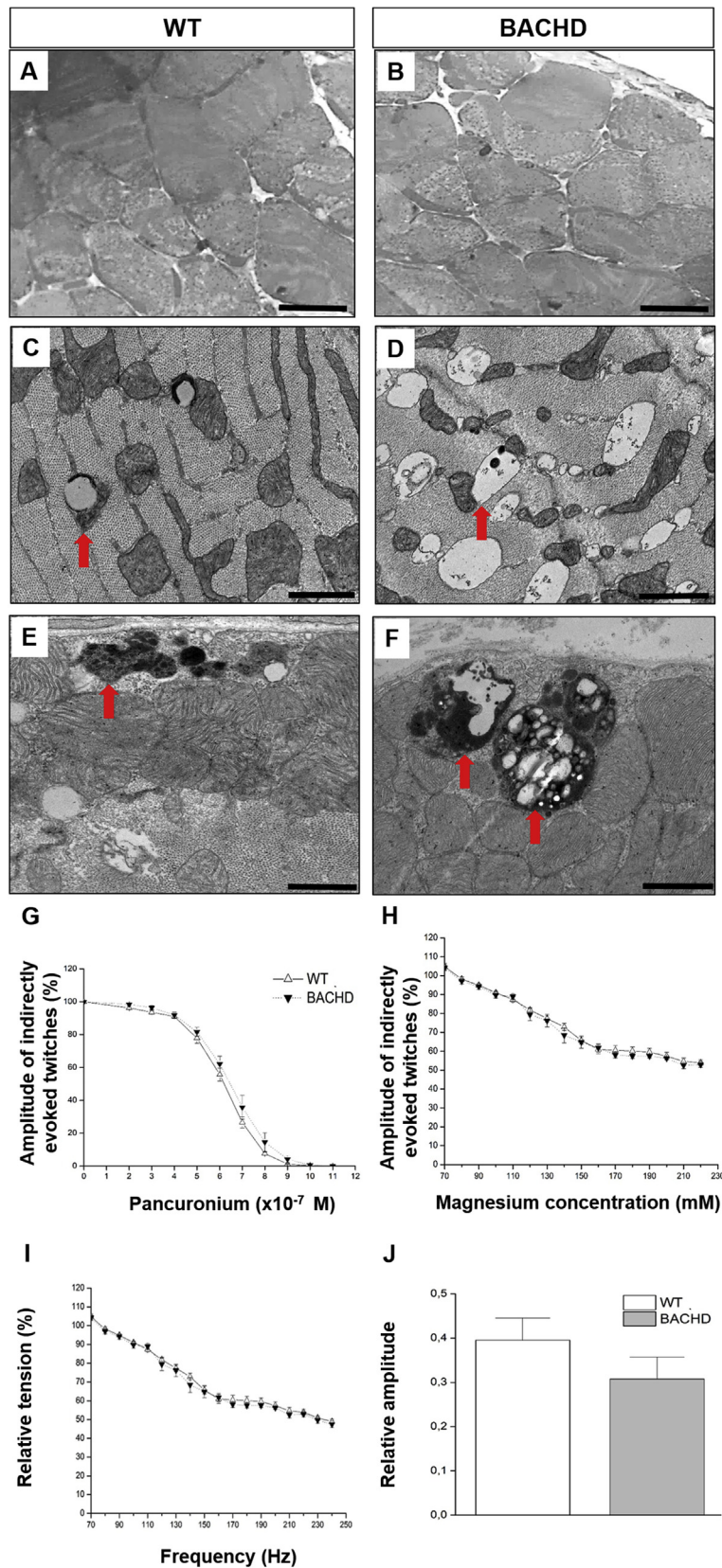


Fig. 6. BACHD mice present ultrastructural changes in the mitochondrial of diaphragm muscle fiber, despite having normal functional parameters. A–B: Representative images of diaphragm skeletal muscle fibers from 12- month-old old WT and BACHD mice, respectively. C–E: Representative electron micrographs of diaphragm fibers from WT (C and E) and BACHD mice (D and F). Note morphological alterations such as abnormal mitochondria in different stages of degeneration in both genotypes (red arrows in C–F). G–H: Time course of indirectly evoked twitches in phrenic-diaphragm preparations of WT and BACHD animals in the presence of Pancuronium (G) and Magnesium (H). Twitch amplitudes were expressed as a percentage from the control situation (without pancuronium or magnesium). I: Time course of tetanic fade of indirectly evoked contractions induced

observed that the nerve terminals of BACHD animals contained less synaptic vesicles in their interior (Fig. 5 B'–C). Moreover, the diaphragm NMJs of BACHD mice presented vesicles with irregular morphology (varying sizes, flattened or with elliptical shape) (Fig. 5D). Additionally, the circumference and shape of the synaptic vesicles of the diaphragm NMJs of BACHD animals were smaller than that found in the diaphragm NMJs of WT mice (Fig. 5E). Given that the expression of cholinergic neuronal markers such as ChAT, AChE and VAcHT is reduced in transgenic mice for HD (Aquilonius et al., 1975; Smith et al., 2006; Massouh et al., 2008), we also examined VAcHT, ChAT and AChE protein expression levels in the diaphragm NMJs of 12-months-old BACHD animals. We found a significant reduction in the expression of VAcHT and ChAT, but AChE was not reduced in the diaphragm NMJs of BACHD compared to WT mice (Fig. 5F–H).

In light of the above-reported observations, we investigated the general morphology of the diaphragm muscle fibers. The qualitative analysis showed no morphological changes in the diaphragm muscle fibers of both genotypes (Fig. 6A–B). However, ultrastructural analysis revealed abnormal mitochondria with vacuoles in the diaphragm NMJs of WT and BACHD animals, as shown in the representative images displayed in Figs. 6C–F. Lastly, we asked if all the presynaptic and muscle alterations described above could compromise diaphragm function in BACHD mice. We found no differences between the genotypes with regards to the susceptibility of neuromuscular blockade induced by pancuronium bromide (Fig. 6G) or excess of magnesium (Fig. 6H), indicating that the safety margin of diaphragm's synaptic transmission is preserved in 12-months-old BACHD mice. In addition, experiments with increasing frequencies of tetanic stimulation also showed no differences between the experimental groups (Fig. 6I). The fatigue resistance test revealed similarities between WT and BACHD animals (Fig. 6J). These data indicate that despite all morphological changes, the diaphragm muscle maintains its functional capacity in the BACHD mice.

4. Discussion

One of the main pathological features of HD is brain neurodegeneration, although cellular dysfunctions have also been reported in other structures such as the spinal cord motor neurons, nerves, NMJs and the skeletal muscles (Valadão et al., 2017; Mielcarek, 2015; Zielonka et al., 2014; Ribchester et al., 2004). Previous work from our group showed that 3-months-old BACHD mice exhibit: i) decreased number of synaptic elements in diaphragm NMJs; ii) reduced synaptic vesicle exocytosis; iii) changes in the form and sizes of the synaptic vesicles; and iv) decreased spontaneous ACh release, thus suggesting a deficit of neuromuscular function (de Aragão et al., 2016). To better understand the progression mechanisms of HD, we investigated the advance of motor pathology in the diaphragm of 12-months-old BACHD mice.

In BACHD, the NMJs from phrenic nerve, which innervates the diaphragm muscle, did not differ from the WT mice regarding the index of co-localization, the total number and area of pre- and postsynaptic elements and the endocytosis process. However, diaphragm NMJs of BACHD were more fragmented compared with WT, indicating that diaphragm NMJs of BACHD mice are undergoing a neurodegenerative process. These results are in agreement with previous morphological evaluations showing an increase of NMJ fragmentations of different models for neurodegenerative

diseases such as HD and ALS (Valadão et al., 2017; Valdez et al., 2010, 2012).

The decreased FM1-43 destaining rate and smaller synaptic depression observed in BACHD mice argue in favor of a decreased vesicular exocytosis rate. This indicates that middle-aged (12-months-old) BACHD present alterations in exocytosis of synaptic vesicles similar to previous observations in younger animals (3-month-old BACHD) (de Aragão et al., 2016). Abnormal interactions between mHTT and proteins that are involved with the exocytosis process may influence the release of neurotransmitters (Sari, 2011; Saudou and Humbert, 2016; Zuccato et al., 2010). Also, several studies demonstrated the reduction of synaptic proteins involved in synaptic vesicle exocytosis in the postmortem brain of WT animals and in HD mice. These proteins include complexin II, V-SNARE (synaptobrevin 2), and Rab3A (Morton and Edwardson, 2001; Smith et al., 2005, 2007). These reports show that mHTT interacts with key proteins of the exocytosis process of synaptic vesicles, which may explain the lower rate of exocytosis seen in the BACHD in relation to WT mice.

Diaphragm NMJs of BACHD mice had a reduced quantal size, when compared with WT animals. Reduction in MEPPs' size in the 3-months-old BACHD mice has been reported by de Aragão et al. (2016), indicating that the deficit in the quantal size in BACHD mice remains at more advanced ages. This could be due to less ACh per vesicle since we observed here a decrease in ChAT and VAcHT expression levels in BACHD diaphragms.

We observed no differences in the frequency of MEPPs between BACHD and WT mice, showing similarity in the rate of spontaneous release in both genotypes. On the other hand, we observed less EPPs depression. Data from the literature regarding neurotransmission are divergent, with two reports showing increased synaptic vesicles exocytosis and neurotransmitter release (Rozas et al., 2010, 2011), decreased release (Khedraki et al., 2017; and a report showing no differences in the neurotransmission mechanism (Ribchester et al., 2004). The differences between some of these studies and our observations may be due to the different transgenic models used.

We found changes in the morphological aspect of synaptic vesicles. Electron micrographs revealed that the presynaptic terminals of the diaphragm NMJs of BACHD mice possessed altered synaptic vesicles shape (elliptic and flattened) and circumference compared with the WT counterparts. de Aragão et al. (2016), also observed a similar result in 3-months-old BACHD. The mHTT binds more strongly to the synaptic vesicles compared with the normal HTT, thus altering the structure of the vesicle and affecting neurotransmitter release (Li et al., 2003), which could explain the alterations observed in the structure of the synaptic vesicles.

Reduction in VAcHT protein expression can lead to reduced vesicular content of ACh, which can be seen as changes in both MEPPs and synaptic vesicle size in KD VAcHT mice (Rodrigues et al., 2013). The reduction in quantal size we observed in the present study could be due to smaller vesicular content of ACh due to less VAcHT to fill the vesicles. Moreover, transgenic HTT mice have reduced expression of cholinergic neuronal markers such as ChAT (Aquilonius et al., 1975; Massouh et al., 2008), AChE, and VAcHT (Smith et al., 2006). These findings may also be related to smaller quantal size we observed. Considering that the synaptic vesicles morphology seems to correlate with the level of their filling with neurotransmitters (Budzinski et al., 2009; Rodrigues et al., 2013; Van der Kloot et al., 2002), we suggest that the changes in the

circumference of the synaptic vesicles described here may be a consequence of decreased filling with ACh. Further research will be needed to verify this hypothesis.

Ultrastructural changes were observed in the diaphragm muscle of 12-months-old BACHD animals, including mitochondria at different stages of degeneration. However, these changes were also found in the control muscles. According to Regmi et al. (2014), mitochondrial degeneration may be related to age. Biopsies of human muscle reveal that characteristics such as decreased activities of tricarboxylic acid cycle enzymes and those related to oxidative phosphorylation and ATP synthesis may be related to factors such as mitochondrial volume decrease, increased oxidative stress, mitochondrial DNA (mtDNA), and/or altered mitochondrial morphology observed during aging of muscle cells (Bua et al., 2002; Marzetti et al., 2013). Valadão et al. (2017) also described similar ultrastructural changes in the mitochondria of the sternomastoid muscle of 12-months-old BACHD mice. In addition, several studies support the hypothesis that mitochondria dysfunction is involved in the pathophysiological process of several neurodegenerative diseases, particularly HD (Browne and Beal, 2004; Reddy et al., 2009).

In light of the morphological changes observed in the diaphragm NMJs of 12-months-old BACHD animals, we hypothesized that the neuromuscular function would also be affected in these mice. Therefore, we evaluated the overall safety margin of the synaptic transmission regarding the resistance to the neuromuscular blockade induced by pancuronium bromide or magnesium (del Castillo and Engbaek, 1954). No differences in the susceptibility of the neuromuscular blockade induced by pancuronium bromide or excess of magnesium were found between both genotypes, indicating that the safety margin of synaptic transmission was preserved in the diaphragm NMJs of BACHD mice. This suggests that the phrenic nerve of the diaphragm muscle of BACHD animals may be adapted to the period of exposure to HD or that the pre- or postsynaptic alterations were not enough to alter the neurotransmission process observed in our methodology.

Physiological tetanic stimulation induces depletion of ACh output, which is balanced by increased synthesis and transfer of neurotransmitter from mobilization stores (Padmaja and Mantha, 2002). However, the progressive increase of tetanic frequency can disrupt this balance and preparations with compromised safety margin will be more susceptible to such changes, presenting an absence of sustained tetanic stimulation, which is known as tetanus fade (Gissen and Katz, 1969). We used a tetanic protocol and evaluated the fatigue resistance of the phrenic-diaphragm preparation from BACHD and WT mice. Diaphragm muscle resistance to fatigue animals was not significantly different between the BACHD and WT mice. Importantly, the diaphragm muscle is vital for survival since it is involved in the respiratory process. Therefore, it is likely that even if morphological changes are present, the diaphragm probably has a higher resistance threshold than some other muscles when it undergoes functional tests. Future studies characterizing the contractile properties of other muscles may allow comparisons and provide insights on the mechanisms of diaphragm resistance.

5. Conclusions

In summary, here we provide evidence that aging maintains alterations in the diaphragm NMJs (i.e.: reduced exocytosis and ACh release, and altered shape and size of synaptic vesicles) of 12-months-old BACHD mice. Further, aging does not lead to further changes (i.e.: in endocytosis, or muscle ultrastructure) in the BACHD mice diaphragm. Additionally, we noted that WT mice presented losses in the parameters analyzed, probably due to aging. This may

have masked the effects of HD in the 12-months-old BACHD mice. Our functional analysis suggested that the phrenic nerve might be less affected by the neurodegeneration processes occurring in HD. Therefore, we propose that putative resistance mechanisms may be protecting this vital muscle to allow for survival. The results presented herein contribute to expand the current understanding of the effects of mHTT in the neuromuscular synapse and in the diaphragm muscle function.

Conflicts of interest

We have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPEMIG (#00271-13), CNPq (#467220/2014-0 and #475735/2013-7), CAPES and IBRO-PROLAB 2017 (C.G). Cristina Guatimosim and Silvia Guatimosim are recipients of CNPq research fellowships. The authors would like to thank the Center for Acquisition and Processing of Images (CAPI/ICB/UFMG) and the Microscopy Center at UFMG for providing the equipment and technical support for experiments involving tissue processing and electron microscopy.

Appendix A. Supplementary data


Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.03.007>.

References

- Aquilonius, S.M., Eckernäs, S.A., Sundwall, A., 1975. Regional distribution of choline acetyltransferase in the human brain: changes in Huntington's chorea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 38, 669–677.
- Baig, S.S., Strong, M., Quarrell, O.W., 2016. The global prevalence of Huntington's disease: a systematic review and discussion. *Neurodegener. Dis. Manag.* 6 (4), 331–343.
- Barstad, J.A., Lilleheil, G., 1968. Transversally cut diaphragm preparation from rat. An adjuvant tool in the study of the physiology and pharmacology of the myoneural junction. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 175, 373–390.
- Betz, W.J., Bewick, G.S., 1992. Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255, 200–203.
- Betz, W.J., Mao, F., Smith, C.B., 1996. Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6 (3), 365–371.
- Brotherton, A., Campos, L., Rowell, A., Zoia, V., Simpson, S.A., Rae, D., 2012. Nutritional management of individuals with Huntington's disease: nutritional guidelines. *Neurodegener. Dis. Manag.* 2 (1), 33–43.
- Browne, S.E., Beal, M.F., 2004. The energetics of Huntington's disease. *Neurochem. Res.* 29 (3), 531–546.
- Bua, E.A., McKiernan, S.H., Wanagat, J., McKenzie, D., Aiken, J.M., 2002. Mitochondrial abnormalities are more frequent in muscles undergoing sarcopenia. *J. Appl. Physiol.* 92, 2617–2624.
- Budzinski, K.L., Allen, R.W., Fujimoto, B.S., Kinsel-Hammes, P., Belnap, D.M., Bajjalieh, S.M., Chiu, D.T., 2009. Large structural change in isolated synaptic vesicles upon loading with neurotransmitter. *Biophys. J.* 97 (9), 2577–2584.
- Caviston, J.P., Holzbaur, E.L.F., 2009. Caviston, J. P., Holzbaur, E. L. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends Cell Biol.* 19 (4), 147–155.
- Chau, W.K., So, K.F., Tay, D., Dockery, P., 2000. A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* 16, 105–116.
- Croft, B.G., Fortin, G.D., Corera, A.T., Edwards, R.H., Beaudet, A., Trudeau, L.E., Fon, E.A., 2005. Normal biogenesis and cycling of empty synaptic vesicles in dopamine neurons of vesicular monoamine transporter 2 knockout mice. *Mol. Biol. Cell* 16, 306–315.
- de Aragão, B.C., Rodrigues, H.A., Valadão, P.A.C., Camargo, W., Naves, L.A., Ribeiro, F.M., Guatimosim, C., 2016. Changes in structure and function of diaphragm neuromuscular junctions from BACHD mouse model for Huntington's disease. *Neurochem. Int.* 93, 64–72.
- del Castillo, J., Engbaek, L., 1954. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol.* 124, 370–384.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Reeves, S.A., 1995. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron* 14, 1075–1081.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., Aronin, N.,

1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277 (5334), 1990–1993.
- Elmqvist, D., Quastel, D.M., 1965. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J. Physiol.* 178 (3), 505–529.
- Farrar, A.M., Callahan, J.W., Abercrombie, E.D., 2011. Reduced striatal acetylcholine efflux in the R6/2 mouse model of Huntington's disease: an examination of the role of altered inhibitory and excitatory mechanisms. *Exp. Neurol.* 232, 119–125.
- Ferrante, R.J., Gutekunst, C.A., Persichetti, F., Mcneil, S.M., Kowall, N.W., Gusella, J.F., Macdonald, M.E., Beal, M.F., Hersch, S.M., 1997. Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *J. Neurosci.* 17, 3052–3063.
- Finkbeiner, S., 2011. Huntington's disease. *CSH. Perspect. Biol.* 3 (6), a007476.
- Gallacci, M., Oliveira, A.C., 1994. Pre- and postsynaptic mechanisms involved in tetanic fade induced by pancuronium in the isolated rat muscle. *Pharmacol* 49 (4), 265–270.
- Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelières, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., Saudou, F., 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118 (1), 127–138.
- Gissen, A.J., Katz, R.L., 1969. Twitch, tetanus and posttetanic potentiation as indices of nerve–muscle block in man. *Anesthesiol* 30 (5), 481–487.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., Andre, V.M., Wilburn, B., Lu, X.H., Yang, X.W., 2008. Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J. Neurosci.* 28 (24), 6182–6195.
- Harjes, P., Wanker, E.E., 2003. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.* 28 (8), 425–433.
- Heemskerk, A.W., Roos, R.A., 2011. Dysphagia in Huntington's disease: a review. *Dysphagia* 26 (1), 62–66.
- Hoffner, G., Kahlem, P., Djian, P., 2002. Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with β -tubulin: relevance to Huntington's disease. *J. Cell Sci.* 115 (5), 941–948.
- Imarisio, S., Carmichael, J., Korolchuk, V., Chen, C.W., Saiki, S., Rose, C., Krishna, G., Davies, J.E., Tofsi, E., Underwood, B.R., Rubinsztein, D.C., 2008. Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochem. J.* 412 (2), 191–209.
- Jones, K., Pitceathly, R.D., Rose, M.R., McGowan, S., Hill, M., Badrising, U.A., Hughes, T., 2016. Interventions for dysphagia in long-term, progressive muscle disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD004303.
- Khedraki, A., Reed, E.J., Romer, S.H., Wang, Q., Romine, W., Rich, M.M., Talmadge, R.J., Voss, A.A., 2017. Depressed synaptic transmission and reduced vesicle release sites in Huntington's disease neuromuscular junctions. *J. Neurosci.* 37 (34), 8077–8091.
- Li, H., Wyman, T., Yu, Z.X., Li, S.H., Li, X.J., 2003. Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Hum. Mol. Genet.* 12 (16), 2021–2030.
- Li, S.H., Li, X.J., 2004. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.* 20 (3), 146–154.
- Marzetti, E., Calvani, R., Cesari, M., Buford, T.W., Lorenzi, M., Behnke, B.J., Leeuwenburgh, C., 2013. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2288–2301.
- Massouh, M., Wallman, M.J., Pourcher, E., Parent, A., 2008. The fate of the large striatal interneurons expressing calcitonin in Huntington's disease. *Neurosci. Res.* 62 (4), 216–224.
- McLachlan, E.M., Martin, A.R., 1981. Non-linear summation of end-plate potentials in the frog and mouse. *J. Physiol.* 311, 307–324.
- McNeil, S.M., Novelletto, A., Srinidhi, J., Barnes, G., Kornbluth, I., Altherr, M.R., Myers, R.H., 1997. Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Hum. Mol. Genet.* 6 (5), 775–779.
- Mielcarek, M., 2015. Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Dis.* 3 (1), e1058464.
- Morton, A.J., Edwardson, J.M., 2001. Progressive depletion of complexin II in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 76 (1), 166–172.
- Padmaja, D., Mantha, S., 2002. Monitoring of neuromuscular junction. *Indian J. Anaesth.* 46 (4), 279–288.
- Pratt, S.J., Shah, S.B., Ward, C.W., Inacio, M.P., Stains, J.P., Lovering, R.M., 2013. Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *J. Physiol.* 591, 559–570.
- Reddy, P.H., Mao, P., Manczak, M., 2009. Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain Res. Rev.* 61 (1), 33–48.
- Regmi, S.G., Rolland, S.G., Conradt, B., 2014. Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan. *Aging (Albany NY)* 6 (2), 118–130.
- Ribchester, R.R., Thomson, D., Wood, N.I., Hinks, T., Gillingwater, T.H., Wishart, T.M., Morton, A.J., 2004. Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. *Eur. J. Neurosci.* 20, 3092–3114.
- Rizzoli, S.O., Betz, W.J., 2004. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles. *Science* 303 (5666), 2037–2039.
- Rodrigues, H.A., Fonseca, M.D.C., Camargo, W.L., Lima, P.M.A., Martinelli, P.M., Naves, L.A., Guatimosim, C., 2013. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One* 8 (11), e78342.
- Roos, R.A., 2010. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 40–48.
- Rozas, J.L., Gomez-Sanchez, L., Tomas-Zapico, C., Lucas, J.J., Fernandez-Chacon, R., 2011. Increased neurotransmitter release at the neuromuscular junction in a mouse model of polyglutamine disease. *J. Neurosci.* 31 (3), 1106–1113.
- Rozas, J.L., Gómez-Sánchez, L., Tomás-Zapico, C., Lucas, J.J., Fernández-Chacón, R., 2010. Presynaptic dysfunction in Huntington's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2), 488–492.
- Rubinsztein, D.C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J.J., Hayden, M.R., 1996. Phenotypic characterization of individuals with 30–40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36–39 repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 59 (1), 16–22.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Ber-taux, F., Wanker, E.E., Doherty, P., Davies, S.W., Bates, G.P., 1999. Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Hum. Mol. Genet.* 8, 813–822.
- Sari, Y., 2011. Huntington's disease: from mutant huntingtin protein to neurotrophic factor therapy. *Int. J. Biomed. Sci.* 7 (2), 89–100.
- Sassone, J., Colciago, C., Cislighi, G., Silani, V., Ciammola, A., 2009. Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues. *Exp. Neurol.* 219 (2), 385–397.
- Saudou, F., Humbert, S., 2016. The biology of huntingtin. *Neuron* 89 (5), 910–926.
- Smith, R., Brundin, P., Li, J.Y., 2005. Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (17), 1901–1912.
- Smith, R., Chung, H., Rundquist, S., Maat-Schieman, M.L.C., Colgan, L., Englund, E., Li, J.Y., 2006. Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 15 (21), 3119–3131.
- Smith, R., Klein, P., Koc-Schmitz, Y., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M., Brundin, P., Li, J.Y., 2007. Loss of SNAP-25 and rabphilin 3a in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 103 (1), 115–123.
- Schulte, J., Troy Littleton, J., 2011. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Curr. Trends Neurol.* 1 (5), 65–78.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993.**
- Valadao, P.A.C., de Aragão, B.C., Andrade, J.N., Magalhães-Gomes, M.P.S., Foureaux, G., Joviano-Santos, J.V., Guatimosim, C., 2017. Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* 45 (6), 785–796.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Kang, H., Clemenson, G.D., Gage, F.H., Lichtman, J.W., Sanes, J.R., 2010. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (33), 14863–14868.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Fox, M.A., Sanes, J.R., 2012. Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One* 7 (4), e34640.
- Van Der Burg, Jorien, M.M., Björkqvist, M., Brundin, P., 2009. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* 8, 765–774.
- Van der Kloot, W., Molgo, J., Cameron, R., Colasante, C., 2002. Vesicle size and transmitter release at the frog neuromuscular junction when quantal acetylcholine content is increased or decreased. *J. Physiol.* 541, 385–393.
- Vonsattel, G.J.P., DiFiglia, M., 1998. Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57 (5), 369–384.
- Walker, F.O., 2007. Huntington's disease. *Lancet* 369 (9557), 218–228.
- Wu, L.L., Zhou, X.F., 2009. Huntingtin associated protein 1 and its functions. *Cell Adhes. Migrat.* 3 (1), 71–76.
- Yuen, E.Y., Wei, J., Zhong, P., Yan, Z., 2012. Disrupted GABAAR trafficking and synaptic inhibition in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 46 (2), 497–502.
- Zielonka, D., Piotrowska, I., Marcinkowski, J.T., Mielcarek, M., 2014. Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. *Front. Physiol.* 5, 380–385.
- Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E., 2010. Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* 90 (3), 905–981.

Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease

Priscila Aparecida Costa Valadão,¹ Bárbara Campos de Aragão,¹ Jéssica Neves Andrade,¹ Matheus Proença S. Magalhães-Gomes,¹ Giselle Foureaux,¹ Julliane Vasconcelos Joviano-Santos,¹ José Carlos Nogueira,¹ Fabíola Mara Ribeiro,² Juan Carlos Tapia³ and Cristina Guatimosim¹ 

¹Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Department of Biomedical Sciences, University of Talca, Talca, Chile

Keywords: BACHD, motoneuron, neuromuscular junctions, spinal cord, sternomastoid muscle

Edited by Yoland Smith

Received 18 April 2016, revised 7 December 2016, accepted 8 December 2016

Abstract

Involuntary choreiform movements are clinical hallmark of Huntington's disease, an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by an increased number of CAG trinucleotide repeats in the huntingtin gene. Involuntary movements start with an impairment of facial muscles and then affect trunk and limbs muscles. Huntington's disease symptoms are caused by changes in cortex and striatum neurons induced by mutated huntingtin protein. However, little is known about the impact of this abnormal protein in spinal cord motoneurons that control movement. Therefore, in this study we evaluated abnormalities in the motor unit (spinal cervical motoneurons, motor axons, neuromuscular junctions and muscle) in a mouse model for Huntington's disease (BACHD). Using light, fluorescence, confocal, and electron microscopy, we showed significant changes such as muscle fibers atrophy, fragmentation of neuromuscular junctions, axonal alterations, and motoneurons death in BACHD mice. Noteworthy, the surviving motoneurons from BACHD spinal cords were smaller than WT. We suggest that this loss of larger putative motoneurons is accompanied by a decrease in the expression of fast glycolytic muscle fibers in this model for Huntington's disease. These observations show spinal cord motoneurons loss in BACHD that might help to understand neuromuscular changes in Huntington's disease.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a progressive, autosomal dominant, debilitating, and neurological disease caused by an increased CAG trinucleotide repetition at the short arm of chromosome 4 that leads to a polyglutamine expansion in the huntingtin (Htt) protein (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Bates, 2005). Its symptoms include cognitive and psychiatric disturbances and progressive motor decline with involuntary movements, rigidity, bradykinesia, and dystonia starting with motor impairment in facial muscles and then progressing to trunk and limb muscles (Bates *et al.*, 2002).

It has been described that Htt interacts with more than two hundred proteins and it is involved in many functions, such as regulating gene transcription, cell signaling, vesicular transport, exocytosis, endocytosis, etc. (Harjes & Wanke, 2003; Zuccato *et al.*, 2010). Furthermore, Htt plays a critical role in cell survival by regulating

apoptotic pathways (Ona *et al.*, 1999). For example, synthesis of Htt protects striatal neurons from apoptotic stimuli (Rigamonti *et al.*, 2000).

Previous reports have shown that mutated Htt (mHtt) leads to the generation of insoluble toxic protein aggregates, which accumulate inside the striatum, causing cellular dysfunction, degeneration and neuronal death, all hallmarks of HD neuropathology (Sathasivam *et al.*, 1999; Moffitt *et al.*, 2009). In mammals, besides the Central Nervous System (CNS), Htt is expressed in a number of tissues and organs, including skeletal muscles (Hoogeveen *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Trottier *et al.*, 1995). Indeed, Sathasivam *et al.* (1999), using R6/2 mouse model for HD, observed force and contractility reduction and deregulation in the transcription of contractile proteins that are directly related to the presence of protein aggregates in muscles. Ribchester *et al.* (2004), used the same mouse model to demonstrate peripheral disorders, including muscle atrophy as well as morphological and electrophysiological changes in neuromuscular junctions (NMJs). Recently, Mielcarek (2015) also observed muscle contractile dysfunction and progressive loss of functional motor

Correspondence: Cristina Guatimosim, as above.

E-mail: cguati@icb.ufmg.br

units in R6/2 mice. However, these studies only speculated the possibility of changes in motoneurons from the spinal cord. Thus, even though several groups have been investigating alterations induced by mHtt (Sathasivam *et al.*, 1999; Ribchester *et al.*, 2004; Zielonka *et al.*, 2014; Mielcarek, 2015), to our knowledge, little is known about motor unit changes induced by mHtt.

In this study, we investigated by a combination of methods (optical, confocal, and transmission electron microscopy) putative abnormalities in muscle fibers, neuromuscular junctions, spinal roots, and spinal cord motoneurons in a transgenic model for HD (BACHD). This murine HD model expresses the complete human *Htt* gene (Gray *et al.*, 2008), with a mutant full length sequence coding for a polyglutamine stretch (CAA-CAG) that is more stable through generations compared to the R6/1 and R6/2 mice models (Mangiarini *et al.*, 1996; Kazantsev *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1997). In addition, BACHD mice present robust motor deficits (such as decreased rotarod performance and hypolocomotion) and a slow progression of the disease, allowing to conduct more detailed longitudinal studies when compared to other models of fast progression like the R6/2 (Menalled *et al.*, 2009; Yang & Gray, 2011). The rationale for this study relies upon recent evidence indicating that muscle wasting in HD might occur independently of the cortex and basal ganglia dysfunction (Van Der Burg *et al.*, 2009; Mantovani *et al.*, 2016).

Materials and methods

BACHD mice

FVB/NJ (wild type) and FVB/N-Tg (HTT*97Q)IXwy/J (BACHD) male transgenic mice were generated by Gray *et al.* (2008) introducing 170 kb human *Htt* in 240 kb RP11-866L6 BAC. *Htt* locus was altered by inserting an exon1 with 97 mixed CAA-CAG repeats into the human *Htt* gene. The animals were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and used to establish a new colony where 12 months old (mo) WT and BACHD mice were obtained.

Our experiments were done in 12 months WT and BACHD animals as previous studies using this mouse model demonstrated morphological changes in the brain, like atrophy of the cerebral cortex (Gray *et al.*, 2008). Furthermore, Holmes *et al.* (2002), showed that changes in behavior tests were more pronounced in 12 months BACHD mice (For a detailed review see Yang & Gray, 2011).

Mice were held in a place with controlled temperature (23 °C) in a 12 h light/12 h dark cycle and with food and water provided *ad libitum*. Animal care was in accordance with the Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee on Animal Experimentation (CEUA) under approved protocol #036/2013.

Skeletal muscle and spinal roots morphology

Animals from both genotype (WT and BACHD) were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 mL/20 g) in accordance with CEUA/UFMG protocol. The sternomastoid (STM) muscle were dissected out and fixed in 4% glutaraldehyde diluted in phosphate-buffered saline (0.2 M) for 24 h at room temperature. After dehydration in an ascending series of alcohols (70, 80, 90, 95% 2X), samples were embedded in glycolmethacrylate resin (Leica) and sectioned in a microtome (Reichert Jung) where 5 µm thick sections were obtained. Sections from muscle samples were stained with toluidine blue (EMS), to determine the cross-sectional area (CSA) of individual myofibers. Images were acquired using a microscope (Leica DM2500) coupled to a CCD camera (Leica DFC345FX). Muscles sections were imaged with 10× objective.

Samples containing cervical ventral roots were processed following Transmission electron microscopy (TEM) protocol (see below). Semi-thin cross-sections (300 nm) were obtained and stained with toluidine blue. Images of whole ventral roots cross-sections from WT and BACHD mice were captured using a 20× objective in a ZEISS Axio Lab.A1 microscope. The cross-sectional area of the ventral roots was measured using ImageJ plugins (NIH), and the total number of axons counted. To quantify axonal myelination we used the G-ratio, which was calculated measuring the axonal inner diameter and dividing it by the outer diameter following the formula: $G = d/D$, where G is the G-ratio, d is the inner diameter and D is the outer diameter (Chau *et al.*, 2000). The size adopted to classify large myelinated fibers was >4.5 µm, according to the evaluation criteria described by Kong & Xu (1999).

Skeletal muscle fiber typing

The STM muscle fiber typing was performed according to the protocol described by Valdez *et al.* (2012). Mice were sacrificed and the STM muscles were dissected. Samples were put in freezing molds covered with OCT freezing medium (Easy Path) and was fresh frozen in isopentane (Sigma-Aldrich) cooled in liquid nitrogen and stored at -80 °C. The muscle was cut on a cryostat (Leica CM3050S) and the cross-sections (10 µm) were collected on glass slides coated with gelatin (Sigma-Aldrich). First, slides containing muscle sections passed through blockade step with 3% BSA, 5% goat serum and 0.1% Triton X-100, 30 min at room temperature. The muscle sections were then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies all diluted in 3% BSA, 5% goat serum: anti-MyHC I (NCL-Novocastra, Leica 1 : 250); anti-MyHC IIA (SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB 1 : 100), anti-MyHC IIX (BF-35 which recognizes all types of muscles fibers except fast IIX, DSHB 1 : 100) and anti-MyHC IIB (BF-F3, DSHB 1 : 100). Slides were washed three times with PBS 1× and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies Alexa 488 goat anti-mouse IgG1 (recognizes type I, IIA and IIX antibodies) and Alexa 488 goat anti-mouse IgM (recognizes IIB antibody). The slides were then washed three times with PBS 1× and coverslipped using ProLong® Gold antifade (Thermo Scientific). Images were acquired in a fluorescence microscope (Leica DM2500) coupled to a Leica DFC 345FX camera and visualized in a microcomputer using the Leica Application Suite software (LAS). The microscope was equipped with air objective (10×, 0.25 NA). Excitation light came from a 100W Hg lamp and a FITC filter was used to collect emitted light. We imaged the whole STM muscle cross-sections. Each fiber type was expressed as a percentage of the total number of fibers counted.

Cervical spinal cord immunofluorescence

To evaluate the expression of caspase-3 in BACHD spinal cords, cervical segments (C1–C3) were dissected, and immediately immersed in neutral-buffered formalin (NBF) for 24 h. Thereafter, samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70, 80, 90, 95, and 100%), cleared in xylene and embedded in paraffin. Sections (5 µm) were obtained using a microtome (model HM335E; Microm, Inc., Minneapolis, MN). Nonspecific antibody binding was blocked by incubation of the samples in a solution of 2% BSA with 0.1% Tween-20 for 1 h in a moist chamber. Sections were incubated with primary antibody (polyclonal rabbit anti-caspase-3, 1 : 100; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) diluted in blocking solution overnight at 4 °C in a moist chamber. Sections were then washed 3 Xs with PBS

and incubated with secondary antibody (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit 1 : 1000; Invitrogen, Eugene, OR) for 1 h. Subsequently, sections were washed 3 Xs with PBS, and in the last wash, stained with DAPI to allow identification of cells nuclei (1 : 1000; Invitrogen, Eugene, OR). The stained slides were imaged using NIKON ECLIPSE Ti microscope (100× objective, N.A: 1.49). All digital images were quantitatively analyzed using IMAGE J software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

For specific labeling of putative motoneurons, cervical spinal cord segments (C1–C3) were removed and fixed with 4% PFA for 48 h. Subsequently these segments were kept in 30% sucrose for 24 h. Then, the samples were oriented in freezing molds covered with freezing medium OCT (Easy Path) and were fresh frozen in isopentane (Sigma-Aldrich) cooled in liquid nitrogen and stored at –80 °C. The cervical spinal cords were cut on a cryostat (Leica CM3050S) and the cross sections (30 µm) were collected on gelatin coated slides. The slides containing sections of the cervical segments were blocked 60 min at room temperature with 3% BSA, 5% donkey serum and 0.1% Triton X-100. Then, the sections were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibody diluted in 3% BSA, 5% donkey serum: ChAT anti-goat, AB 144P Millipore Corporation (1 : 100).

Slides were washed 3 Xs with PBS 1× and incubated for 2 h at room temperature with secondary antibody Alexa 488 donkey anti-goat IgG1 (1 : 800). The slides were washed again 3Xs with PBS 1× and mounted using ProLong[®] Gold antifade (Thermo Scientific Invitrogen[™]). Images were acquired using a 63× oil immersion (N.A: 1.4) objective attached to a laser-scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Jena, Germany). An Argon (488 nm) laser was used for excitation of motor neurons marked with anti-ChAT and Alexa 488. The Z series optical sections were collected at 2.0 µm intervals. All digital images were quantitatively analyzed using IMAGE J software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), to determine both the number and Ferret diameter of putative motoneurons. The total number of putative motoneurons located in the ventral horn of the cervical spinal cord segments (C1–C3) were counted and had their diameter measured.

NMJ immunofluorescence and confocal microscopy analysis

Mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 mL/20 g) and left ventricular transcardiac perfused with ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Muscles were dissected and blocked in 3% BSA + 5% goat serum + 0.5% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Next, primary antibody anti-synaptotagmin was added (Anti-synaptotagmin, anti-mouse, IgG2A, DSHB, 1 : 250) in the blocking solution, and incubated overnight at 4 °C. Muscles were washed 3× with PBS and incubated 1 h at room temperature with Alexa 555- α -bungarotoxin (α -btx) 1 : 1000 (Molecular Probes, Eugene, OR) together with secondary antibody 1 : 1000 (Alexa-488 goat anti-mouse IgG2A; Invitrogen). Muscles were then washed 3× with PBS and whole-mounted slides using Vectashield (Vector Laboratories, Eching, Germany).

Images of NMJs stained with anti-synaptotagmin and bungarotoxin (α -btx) were acquired using a 63× oil immersion (N.A: 1.4) objective attached to a laser-scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Jena, Germany). Argon (Ar 488 nm) and helium-neon (He–Ne, 543 nm) lasers were used for excitation of terminals stained with anti-synaptotagmin and acetylcholine receptors (nAChR) clusters marked with (α -btx), respectively. The Z series optical sections were collected at 2.0 µm intervals and the whole STM muscle samples were scanned. The nerve terminals

were identified considering their colocalization with nAChR clusters. Images were converted to gray scale format (8 bits) and each synaptic element was individually evaluated. We used the method of particles analysis to obtain the NMJs fragmentation index, based on the pixels presented in each image. Briefly, the images were converted into a binary image pattern and were skeletonized. Next, to describe the connectivity for each pixel in the image, a histogram was generated using the BinaryConnectivityClass plugin from IMAGEJ (Pratt *et al.*, 2013). We analyzed the degree of fragmentation in pre- and postsynaptic elements comparing the muscle samples from WT and BACHD mice. The parameters adopted for fragmentation were defined according to the evaluation criteria described by Valdez *et al.* (2010), which establishes fragmentation by five or more islands both in the presynaptic and postsynaptic membranes.

Transmission electron microscopy (TEM)

For ultrastructure analyses, we used the protocol previously described by our research group (Rodrigues *et al.*, 2013). Briefly, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.1 mL/20 g), left ventricular transcardiac perfused with ice-cold modified Karnovsky fixative (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4 °C) and maintained in this solution for at least 24 h at 4 °C. Cervical spinal cord segments (C1–C3) and the STM muscles from WT and BACHD mice were then removed. After fixation, samples were washed with cacodylate buffer (0.1 M), cut into several fragments, post-fixed in reduced osmium (1% osmium tetroxide containing 1.6% potassium ferrocyanide), contrasted *en bloc* with uranyl acetate (UA, 2% in deionized water), dehydrated through an ascending series of ethanol solutions and embedded in EPON. Blocks were sectioned (50 nm) and collected on 200 or 300 mesh copper grids and contrasted with lead citrate. Sections were viewed with a Tecnai- G2-Spirit FEI/Quanta electron microscope (120 kV Philips). The same protocol was used to obtain semi-thin sections of cervical ventral roots. Images of the semi-thin sections encompassing whole ventral roots were acquired using ZEISS Axio Lab.A1 (20× objective, N.A: 0.45) and analyzed qualitatively and quantitatively as described previously. We analyzed a total of 3.222 axons in WT animals and 1.937 in BACHD.

For the quantification of lipofuscin granules, 30 electron micrographs of the motoneurons from the cervical spinal cord were used for each genotype. The counting of beads was performed using the software IMAGEJ plugins (NIH). Data are presented as granules/area using the GRAPHPAD PRISM 6.

Statistical analysis

All Data were analyzed using Microsoft Excel and plotted using the program GRAPHPAD PRISM 6. Statistical significance was evaluated using the un-paired Student's *t*-test and represent the mean \pm Standard deviation (mean \pm SD) or (median), as described in the text. When data were not normally distributed, we applied the Mann–Whitney test, as described in the text. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Changes in BACHD STM muscle fibers area, MyHC expression and ultrastructure

Previous studies suggested that limb and trunk muscle of HD patients are affected during disease progression, causing significant

postural instability (Tian *et al.*, 1992; Brožová *et al.*, 2011). Based on this observation, we began our investigation by searching for morphology changes in a neck muscle directly involved in head posture, the STM muscle, in a mouse model for HD disease (BACHD).

Figure 1(A–B) shows representative transverse section images of STM muscle fibers from 12 months control (WT) and diseased (BACHD) mice. An initial analysis of the STM muscle fiber show no signs of degeneration in both genotypes at the age indicated. However, when compared to WT muscles fiber CSA, BACHD mice presented a reduction in approximately 40% in CSA suggesting a possible muscle fibers atrophy (BACHD: $1333 \mu\text{m}^2$ vs. $2772 \mu\text{m}^2$ for WT (Median); $P = 0.0001$; We have analyzed ~3000 muscle fibers per genotype, $n = 3$ individual animals per genotype; Mann–Whitney test) (Fig. 1H).

As we noted atrophy of the STM muscle, our next step was to investigate whether this atrophy was associated to shifts in MyHC isoforms expression. Skeletal muscle fibers are characterized as slow-twitch fiber (type I) and three types of fast-twitch fibers (type IIA, type IIX and type IIB) (reviewed by Wang & Pessin, 2013). For this purpose, we performed an immunostaining for fiber types using specific monoclonal antibodies against the different MyHC isoforms. The representative images in Fig. 1C show cross-sections of the STM muscle fibers from WT. Figure 1C–C'' shows the staining for type I, IIA, IIX, and IIB muscle fibers respectively. Figure 1D–D'' shows the same staining for BACHD muscle fibers. Compared to WT, we observed more fibers stained for the IIA fibers in BACHD (Fig. 1D'). Indeed our quantification showed that the percentage of IIA fibers were in fact increased in BACHD STM muscle fibers [BACHD: $44.0 \pm 4.0\%$ vs. WT: $34.2 \pm 1.7\%$ (Mean \pm SD); $t_4 = 3.8$; $P = 0.01$; We counted each fiber type in one muscle section in $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test]. In addition, BACHD mice presented less staining for the IIX muscle fibers in STM compared to WT (Fig. 1D''). Quantification of several muscle fibers from both genotypes stained for IIX showed a reduction in the percentage of these fibers in the BACHD STM muscle [BACHD: $18.7 \pm 4.0\%$ vs. WT: $28.0 \pm 4.1\%$ (Mean \pm SD); $t_4 = 2.8$; $P = 0.04$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test]. These data showed that there was a significant fiber-typing switch in BACHD STM muscles.

We next performed a qualitative ultrastructure analysis of STM muscle fibers from BACHD mice (Fig. 1E–G, 90 images analyzed per genotype from 3WT and 3 BACHD animals). In comparison to WT muscle (Fig. 1E), analysis of the ultrastructure of the STM in BACHD mice revealed: (i) sarcoplasmic reticulum (SR) significantly enlarged, invading spaces (demarcated area in F) that were previously occupied by myofibrils (Fig. 1G, red arrows); (ii) Mitochondria containing abnormal vacuoles within the mitochondria matrix (Fig. 1G, blue arrow); (iii) increase in inter-myofibrillar glycogen deposits (Fig. 1G, yellow arrows) and (iv) areas with dramatic decrease in myofibrils (Fig. 1F, asterisk). Together, the ultrastructure

alterations can be an indicative that muscle fibers are under a degenerative process, corroborating the muscle histology data.

NMJs alterations in BACHD mice

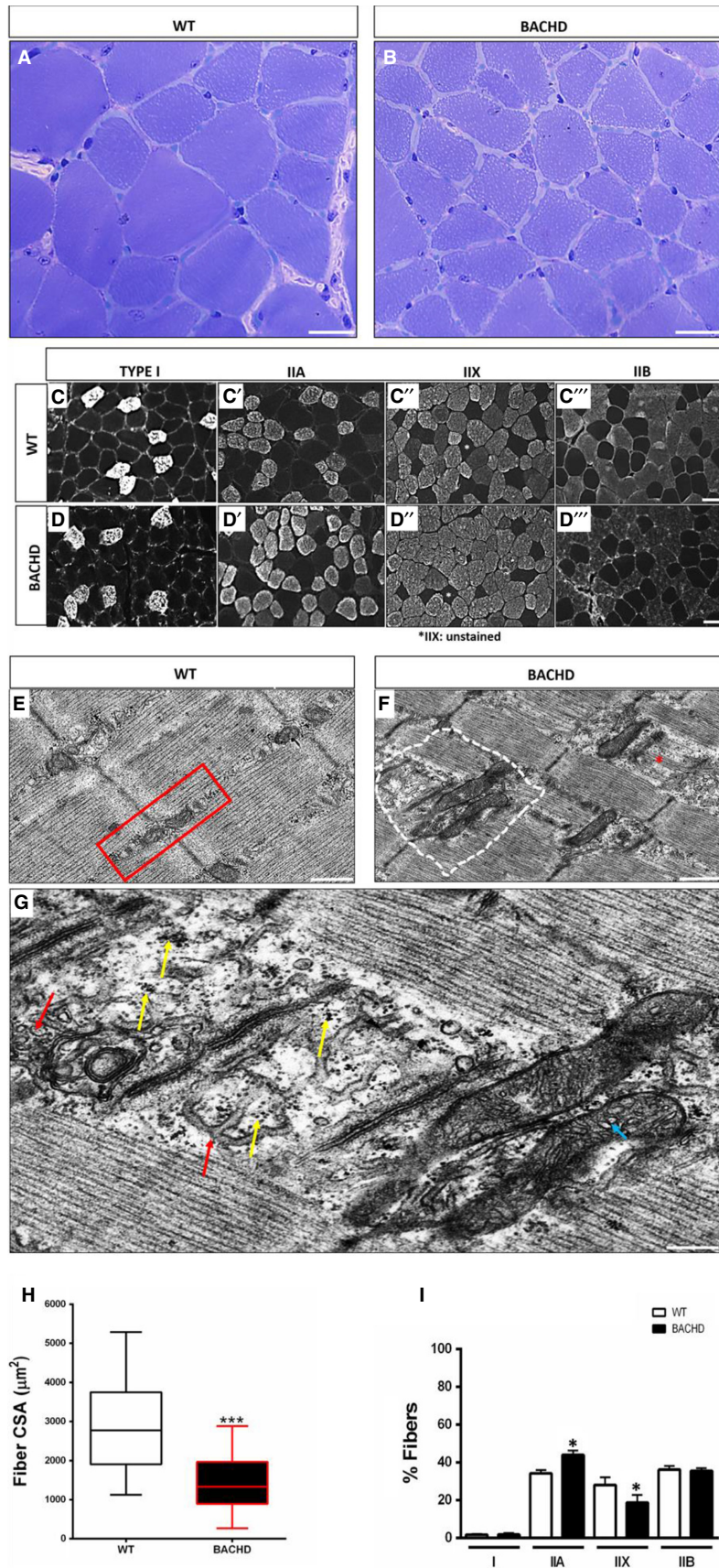
Given the degree of STM- muscle atrophy and the pronounced changes observed in BACHD muscle fibers, our next step was to investigate whether muscle damage could be related to alterations at neuromuscular junctions. To address this question, STM- muscle whole mounts from WT and BACHD mice were stained with pre-(synaptotagmin) and postsynaptic (α -btx) markers and the NMJs morphology were examined by confocal microscopy.

Figure 2 shows representative images of presynaptic nerve terminals from 12 months WT (Fig. 2A) and BACHD (Fig. 2C) STM muscles. Figure 2A' and C' shows the postsynaptic AChRs stained with α -btx in the same WT and BACHD muscle fibers respectively. The Fig. 2B and D shows representations of the particle analysis of NMJs of WT and BACHD. Figure 2B' and D' shows the skeletonization of NMJs of WT and BACHD. Our analyzes showed normal structure and synaptic elements colocalization in the NMJs from WT animals. In contrast, we observed that in BACHD STM muscles the presynaptic axon terminals did not completely co-localized with the postsynaptic AChRs [BACHD: $87.3 \pm 2.0\%$ for vs. $98.4 \pm 1.6\%$ for WT (mean \pm SD); $t_4 = 8.0$; $**P = 0.001$ unpaired student *t*-test] (Fig. 2C and C' and 2E for quantification), supporting the view of an ongoing degenerative process like denervation. We next analyzed the degree of denervation in NMJs and observed that many NMJs from BACHD STM muscles were partially denervated [BACHD: $20.0 \pm 4.0\%$ vs. $2.7 \pm 2.3\%$ for WT (mean \pm SD); $t_4 = 6.5$; $**P = 0.002$ unpaired student *t*-test] (Fig. 2F for quantification and 2C''), with patches of postsynaptic AChRs showing no presynaptic partner associated to them (arrow). Additionally, we found that the areas of the pre- and postsynaptic terminals in the BACHD NMJs were smaller than WT [Presynaptic area- BACHD: $923 \mu\text{m}^2$ vs. $1655 \mu\text{m}^2$ for WT (median); $***P = 0.0001$ (Fig. 2G); Postsynaptic area- BACHD: $1011 \mu\text{m}^2$ vs. $1669 \mu\text{m}^2$ for WT (median); $***P = 0.0005$ (Fig. 2H)]. In general, the pre- and postsynaptic elements were significantly fragmented in BACHD but not in WT [BACHD: $81.7 \pm 4.7\%$ vs. $58.0 \pm 2.6\%$ for WT (mean \pm SD); $t_4 = 7.6$; $**P = 0.001$ unpaired student *t*-test (Fig. 2I)]. We have analyzed 75 NMJs per genotype in $n = 3$ individual animals per genotype.

Axonal abnormalities in BACHD mice

We next evaluated whether the changes described here in BACHD NMJs could be a consequence of damage in motor axons close to the spinal cord. Thus, our next set of experiments aimed to investigate axons exiting the ventral roots. Semi-thin cross-sections of the cervical ventral roots were obtained and stained with toluidine blue (see methods). Qualitative analysis showed that, compared to WT

FIG. 1. Decreased CSA, reduction in IIB fiber typing and ultrastructure abnormalities in BACHD STM muscle fibers. (A–B) Representative images of STM skeletal muscle fibers from 12 months old WT and BACHD mice. Scale bar: $50 \mu\text{m}$; C–C'' to D–D'': Representative images of STM fiber typing from 12 months old WT and BACHD mice. Note that the STM from BACHD presented less staining for the IIX fibers in comparison to WT (C'' and D''). The IIA fibers are also increased in this muscle (C' and D'). Scale bar: $50 \mu\text{m}$. (E–F) Representative electron micrographs of STM fibers from WT and BACHD animals. Observe a normal triad in WT (red box). Note a reduction in the number of myofibrils in the sarcomere (asterisk) in BACHD. (G) High magnification view of the area shown in F depicting enlargement and invasion of the sarcoplasmic reticulum (demarcated area). Also note the presence of vacuoles within the inner space of mitochondrial organelles (blue arrow), abnormal deposition of glycogen in inter-myofibrillar space (yellow arrows) and atypical SR (red arrows). Scale bar: 500 nm . We have analyzed 90 images for WT and 90 images for BACHD from three individual animals per genotype. (H) The box plot shows the CSA median values for WT and BACHD STM muscle fibers. These results represent the median \pm SD of more than 3,000 muscle fibers per genotype ($***P < 0.0001$; Man–Whitney test; $n = 3$ individual animals per genotype). (I) Quantitative analysis of the fiber typing showing decreased expression of IIX isoform and an increase in the expression of the IIA in 12 months old BACHD STM muscle fibers compared to WT. The results represent the mean \pm SD (unpaired Student's *t*-test, $*P < 0.05$, $n = 3$ animals per genotype).



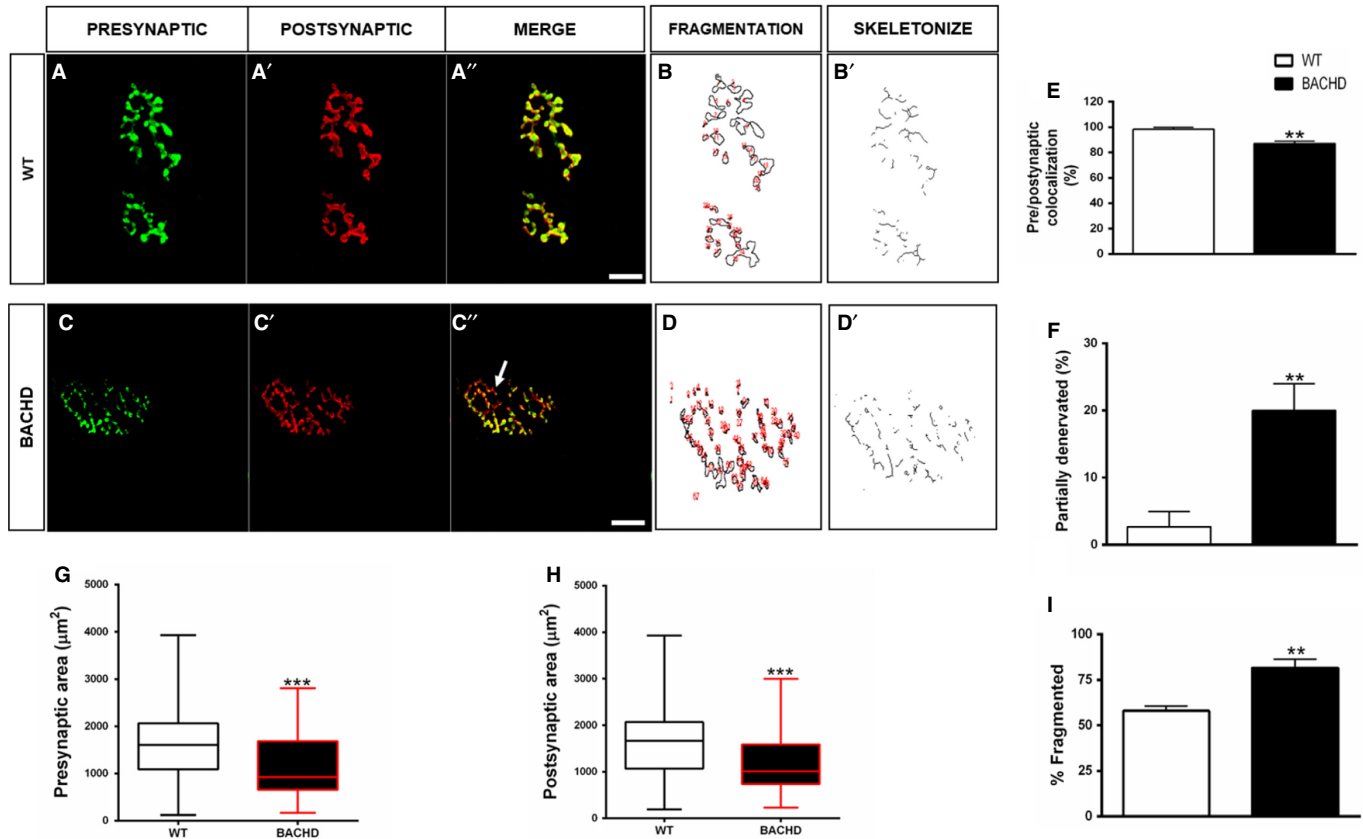


FIG. 2. Fragmentation and denervation in NMJs from BACHD. (A–C'') Representative images of STM-NMJs from 12 months WT and BACHD mice. (A and C) Presynaptic terminals labeled with Alexa-488 anti-synaptotagmin antibody (green). (A' and C') Postsynaptic AChRs labeled with Alexa-555 α -bungarotoxin (red). (A'' and C'') Overlapping images showing partial denervation (arrow). Scale bar: 10 μ m. (B and D) Representation of particle analysis of fragmentation in endplates from WT and BACHD. (B' and D') Skeletonization rendering of fragmentation in endplates from WT and BACHD. (E–I) Graphs showing the degree of colocalization (E) $**P = 0.001$ unpaired student *t*-test], partial denervation (F) $**P = 0.002$ unpaired student *t*-test], pre-synaptic area (G) $***P = 0.0001$), post-synaptic area (H) $***P = 0.0005$) and fragmentation of the endplates (I) $**P = 0.001$ unpaired student *t*-test]. The results represent the mean \pm SD from 75 NMJs per genotype ($n = 3$ individual animals per genotype).

(Fig. 3A), axons from BACHD mice presented severe morphology changes (Fig. 3B red arrows). The quantitative analysis of the ventral roots demonstrated a reduction in the number of axons per area in BACHD [BACHD: 0.08 ± 0.03 axons/ μ m² vs. 0.2 ± 0.02 axons/ μ m² for WT (mean \pm SD); $t_4 = 5.7$; $**P = 0.004$ unpaired student *t*-test] (Fig. 3E). The histogram in Fig. 3F shows a reduction in the number of larger myelinated fibers (>4.5 μ m) in BACHD [Interval between 5–6 microns-BACHD: 48.7 ± 3.8 μ m vs. 90.7 ± 12.7 μ m for WT (mean \pm SD); $t_4 = 5.5$; $**P = 0.005$ unpaired student *t*-test; interval between 6–7 microns- BACHD: 41.3 ± 3.0 μ m vs. 84.3 ± 6.1 μ m for WT (mean \pm SD); $t_4 = 10.1$; $***P = 0.0004$ unpaired student *t*-test; interval between 7–8 microns- BACHD: 40.0 ± 6.5 μ m vs. 70.3 ± 6.0 μ m for WT (mean \pm SD); $t_4 = 6.0$; $**P = 0.004$ unpaired student *t*-test and interval between 8 and 9 microns- BACHD: 20.7 ± 4.1 μ m vs. 33.3 ± 5.0 μ m for WT (mean \pm SD); $t_4 = 3.3$; $*P = 0.02$ unpaired student *t*-test, $n = 3$ individual animals per genotype (Fig. 3F)]. However, the *G*-ratio (relationship between axonal inner and outer diameter) [BACHD: 0.6 ± 0.1 vs. 0.7 ± 0.1 for WT (mean \pm SD); $t_4 = 0.7$; $P = 0.5$ unpaired student *t*-test] and the thickness of the myelin sheath ratio [BACHD: 1.5 ± 0.1 μ m vs. 1.5 ± 0.1 μ m for WT (mean \pm SD); $t_4 = 0.4$; $P = 0.7$ unpaired student *t*-test, $n = 3$ individual animals per genotype] were not different from control, (Fig. 3G–H). We have analyzed one semi-thin section per animal in

$n = 3$ mice per genotype. Ultrastructure analyses confirmed the histological observations and showed that axons from BACHD presented various degenerative features such as structural breakdown of the myelin sheath with lamellar separations (Fig. 3D, yellow arrows) and vacuoles within the axoplasm (blue arrows). We have qualitatively analyzed 30 images for each animal in $n = 3$ mice per genotype.

Motoneurons loss and atrophy in the spinal cord from BACHD mice

We next looked at the morphology and number of cervical spinal cord motoneurons. To identify putative spinal cord motoneurons we used an antibody that recognizes the enzyme ChAT. We found that there were ChAT-positive neurons clustered in the ventral horn of the cervical spinal cord segments in both genotypes. Figure 4 shows representative images of cervical segments stained with anti-ChAT from WT (Fig. 4A) and BACHD (Fig. 4B). Figure 4C shows an example of an atrophic ChAT-positive putative motoneuron in BACHD (white arrow). Confirming this observation, quantitative analysis of putative motoneurons' diameters showed statistically significant reduction in this parameter in BACHD compared to WT [BACHD: 26.4 ± 1.4 μ m vs. 32.8 ± 2.8 μ m for WT (mean \pm SD); $t_4 = 3.5$; $*P = 0.02$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test] (Fig. 4L). In addition, we detected

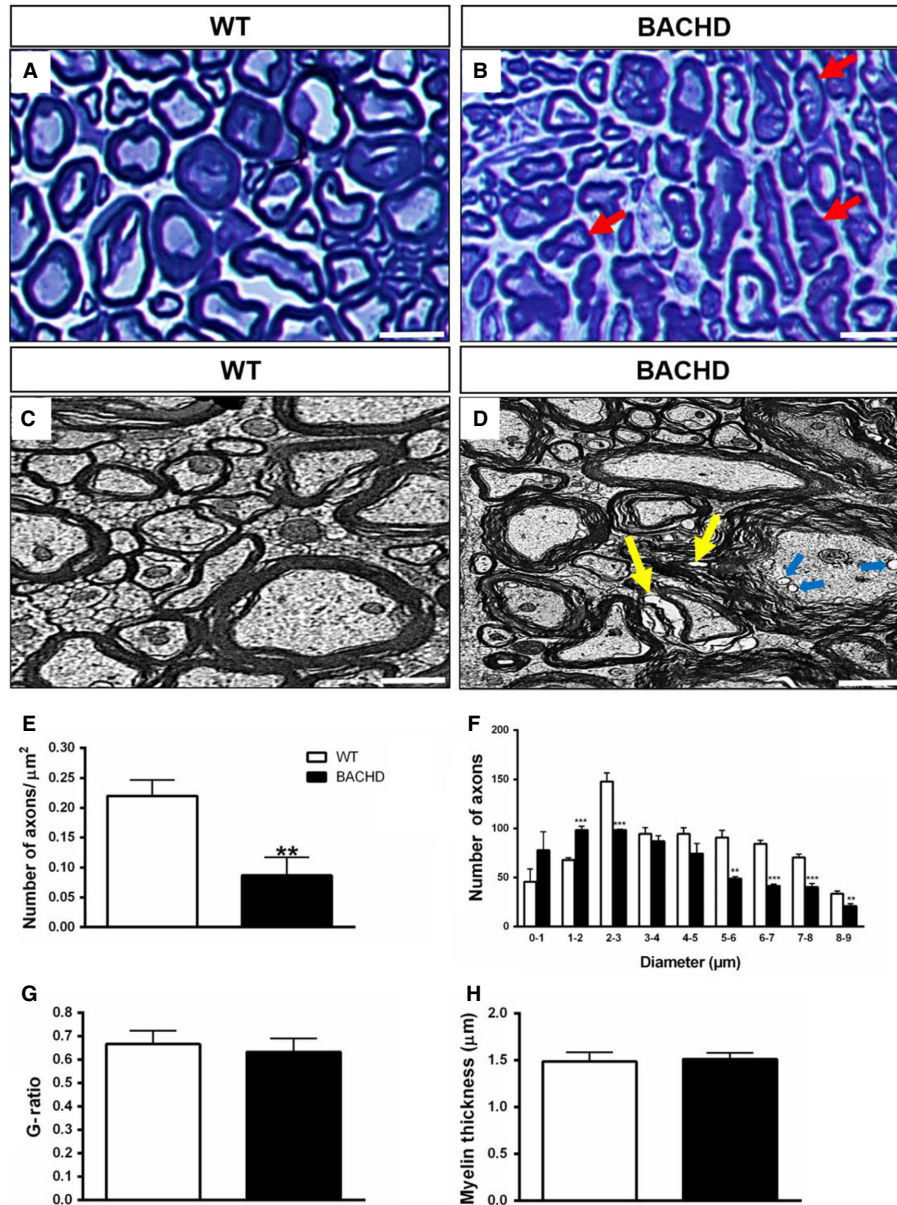


FIG. 3. Axonal changes in BACHD. (A–B) Representative images of axons from 12 months WT and BACHD respectively. Note in A typical axons with preserved structure and shape whereas in B note the presence of atypical axons in degeneration with morphological abnormalities (red arrows). The axons were stained by toluidine blue. Scale bar: 40 μm . (C–D) Electron micrograph of the axons from WT and BACHD. Note in D axons with signs of degeneration like lamellar separation (yellow arrows) and vacuolization in the axoplasm (blue arrows). We analyzed 90 electron micrographs per genotype. Scale bar: 2 μm . (E–H). Quantification of the number of axons by nerve area, number of large axons ($>4.5 \mu\text{m}$), G-ratio and myelin thickness, respectively. We have analyzed 9 semi-thin sections per genotype and a total of 3.222 axons in WT and 1.937 in BACHD (*, **, *** $P < 0.05$, unpaired Student's *t*-test, $n = 3$ individual animals per genotype).

a reduction in the number of putative ChAT-positive motoneurons in sections of the cervical spinal cord segments [BACHD: 270 ± 22.6 vs. 342.3 ± 29 for WT; (mean \pm SD); $t_4 = 3.4$; * $P = 0.02$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test] (Fig. 4K). A similar reduction in the total number of cells was observed in cervical spinal cord segments stained with toluidine blue [BACHD: 128.7 ± 11.7 vs. 177.0 ± 26.5 for WT (mean \pm SD); $t_4 = 2.9$; * $P = 0.04$; $n = 3$ individual animals per genotype; unpaired student *t*-test] (Fig. 4M).

Comparing to WT motoneurons, qualitative analysis of TEM micrographs showed atypical atrophic nuclei in a BACHD motoneuron (Fig. 4H-white arrow). We also observed an increase in the number of lipofuscin granules in BACHD motoneurons (Fig. 4G – red arrows) compared to WT (Fig. 4F – red arrows) [BACHD:

0.2 ± 0.1 granules/area vs. 0.1 ± 0.03 granules/area for WT (mean \pm SD); $t_4 = 2.5$; * $P = 0.03$; $n = 3$ individual animals per genotype. We have analyzed 30 motoneurons per genotype, unpaired student's *t*-test]. Furthermore, we observed vacuolated mitochondria in BACHD motoneurons (Fig. 4J) that were not observed at WT counterparts (Fig. 4I).

To test whether putative motoneurons were undergoing apoptosis, we immunostained sections that contained C1–C3 cervical segments from WT and BACHD spinal cords with an antibody against caspase-3, a marker of cell death. Figures 4D–E show representative images of the caspase-3 in the cervical segments from BACHD and WT mice. Compared to WT, we observed approximately three times more putative motoneurons positive for caspase-3 in BACHD spinal cords (Fig. 4O) [BACHD: 126 ± 10.6 cells vs. 42 ± 13.1 for WT

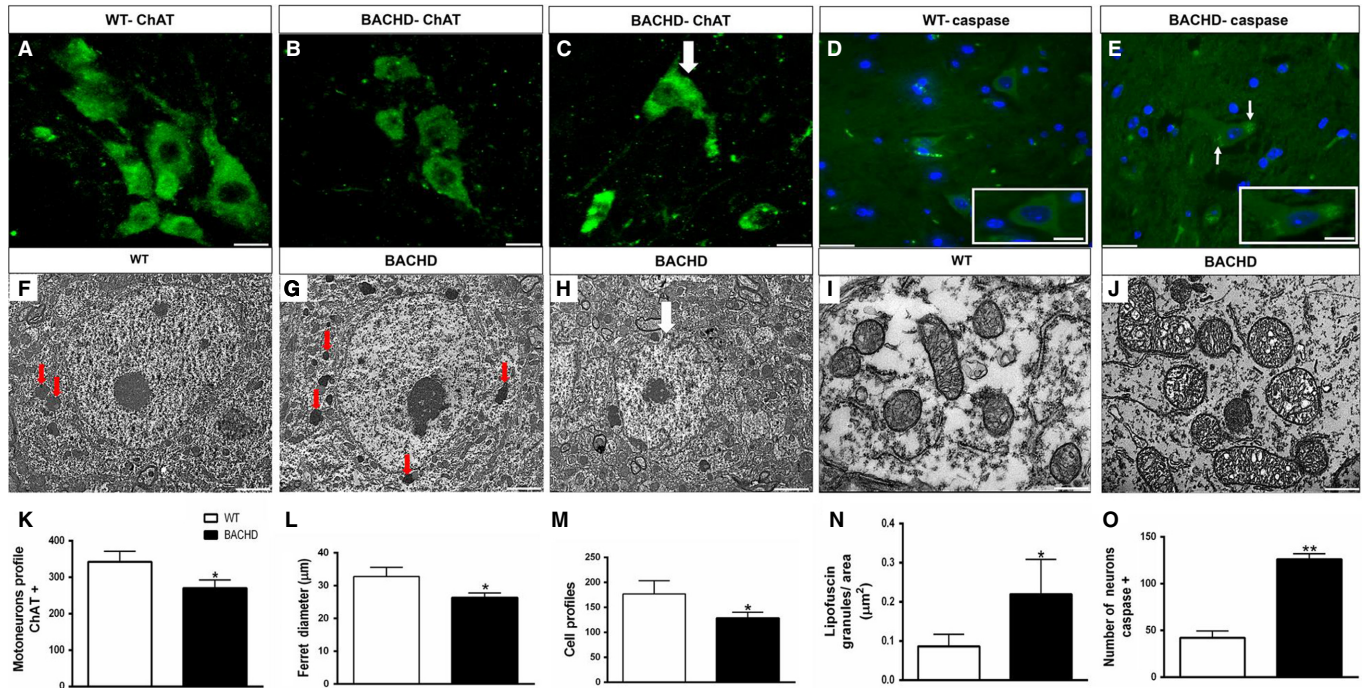


Fig. 4. Motoneurons atrophy in BACHD cervical spinal cords. (A–C) Representative images of putative motoneurons from cervical spinal cord sections stained for ChAT from 12 months WT (A) and BACHD (B). (C) Atypical motoneuron. Scale bar: 50 μm . (D–E) Fluorescence images of motoneurons stained for caspase-3 in WT (D) and BACHD (arrow). Nuclei were stained with DAPI. Inset: putative motoneuron positive for caspase-3 in BACHD. Scale bar: 50 μm . (F–G) Ultrastructural images showing motoneuron with more lipofuscin granules (red arrows) in BACHD compared to WT. (H) Representative images of an atrophic motoneuron from BACHD spinal cords. Scale bar: 5 μm . (I–J) Representative images normal and vacuolated mitochondria in WT and BACHD respectively. Scale bar: 500 nm. (K) Quantification of ChAT-positive motoneurons profiles in WT and BACHD cervical spinal cords (~150 neurons analyzed per genotype). (L) Ferret diameter. (M) Number of cell profiles in spinal cord sections from WT and BACHD stained with toluidine blue (~2,000 cells analyzed per genotype; unpaired student's *t*-test; **P* < 0.05; *n* = 3 animals per genotype). (N) Quantification of the number of lipofuscin granules/area in WT and BACHD motoneurons (Total analyzed 87 granules in WT and 224 granules in BACHD from 30 motoneurons per genotype; unpaired student's *t*-test; **P* < 0.05; *n* = 3 animals per genotype). (O) Graphical quantification of motoneurons stained positively for caspase-3 in WT and BACHD (~150 neurons analyzed per genotype; unpaired student's *t*-test; ***P* < 0.001; *n* = 3 animals per genotype). All results described here are from *n* = 3 individual animals per genotype and were expressed as mean \pm SD.

(mean \pm SD); $t_4 = 8.6$; ***P* = 0.001; *n* = 3 individual animals per genotype; unpaired student's *t*-test]. This result indicates that the activation of apoptotic cascades may be responsible for the putative motoneuron degeneration observed in BACHD spinal cords.

Discussion

Most scientific investigations on HD disease focused their studies mainly in the brain pathology and the neurological symptoms that arise from such alterations. From this perspective, and taking advantage of BACHD murine model for HD, we investigated putative alterations caused by mHtt in the motor unit (NMJs, axons and spinal cord motoneurons) that control muscle contraction.

We first investigated the impact of the mHtt on the last component of the MU: the skeletal muscle. It is well described that the motor symptoms in HD involve involuntary movements of the face and limbs and postural instability of the neck and trunk (Bates *et al.*, 2002). In this study, we evaluated possible changes in the STM, a neck muscle important for head control and posture (Kim, 2015). We found that many of the STM muscle fibers were significantly smaller in the HD mice than in the age-matched control fibers (WT mice) (Fig. 1 and schematic representation in Fig. 5). Consistent with our results, atrophy of skeletal muscles has been considered a hallmark for HD in humans (Farrer, 1985; Farrer & Meaney, 1985; Ribchester *et al.*, 2004; Trejo *et al.*, 2004). Mielcarek (2015) observed in R6/2 mice significant physiological alterations in the contractile properties of the extensor longus digitorum (EDL) and tibialis anterior (TA)

muscles, as well as a reduction in muscle mass. Although it has been suggested that mHtt has deleterious effects on muscles in R6/2 mice, via accumulation of poly-glutamine aggregates (Sathasivam *et al.*, 1999; Moffitt *et al.*, 2009) and formation of inclusions in myoblasts and myotubes (Orth *et al.*, 2003), the subjacent mechanism(s) of muscle atrophy is (are) not yet elucidated.

The ultrastructure analyses of STM muscle fibers from BACHD showed enlargement of the sarcoplasmic reticulum, invading the myofibrils region. We also observed the presence of vacuoles inside the mitochondria. Moreover, we observed the presence of inter-myofibrillar glycogen and disorganization of the triads (Fig. 1). These changes suggested a pathological ongoing process during muscle atrophy in BACHD mice. Furthermore, the mitochondrial defects reported here might be a key factor to the degenerative process seen in HD animal models and patients with this disease. Indeed, mHtt protein has been found to interfere with the normal function of mitochondria (Chaturvedi *et al.*, 2009; Chandra *et al.*, 2016).

Another ultrastructure change that caught our attention was the great amount of glycogen granules accumulated at the inter-myofibrillar spaces in the BACHD STM muscle fibers. It is known that glycogen accumulation at these spaces and in the intra-myofibrillar compartments are normal events and the deposits are used depending on the muscle energy demand (Marchand *et al.*, 2002). However, we cannot exclude the fact that the abnormally high levels of glycogen may be a consequence of energy imbalance caused by putative mitochondrial dysfunction. In addition, areas of degraded contractile structures together with invaded portions of the

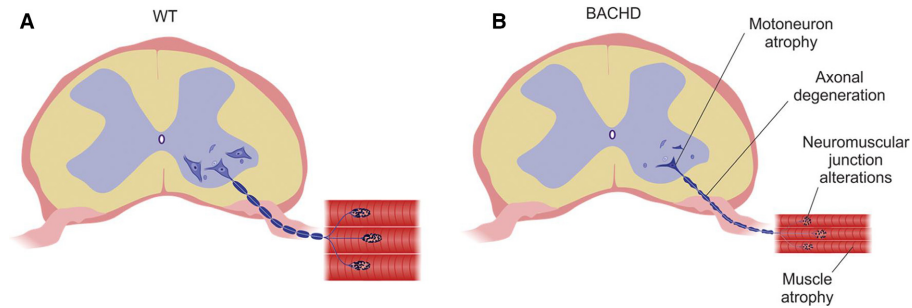


FIG. 5. Schematic representation of cervical spinal cords from WT and BACHD (A) Motor unit of WT mice showing preservation of all structures. (B) Changes seen in the motor unit of BACHD such as motoneurons atrophy, axonal degeneration, neuromuscular junction fragmentation and muscle fiber atrophy.

sarcoplasmic reticulum were described in denervated muscles (Pellegrino & Franzini, 1963). The authors also reported that, during atrophy, there was a reduction in the number of the contractile filaments similar to what we have reported here for BACHD STM muscle fibers (Fig. 1F). Here, we have also observed changes in sarcoplasmic reticulum and myofibrils. Moreover, it has been reported that there is a close relationship between the accumulation of inter-myofibrillar glycogen and SR function (Nielsen *et al.*, 2009).

We next performed the muscle fiber typing to confirm that the BACHD STM muscle fibers atrophy could be related to a decrease in the proportion of the largest IIX fiber type. We observed that STM muscles from BACHD mice presented a decrease in large fibers (IIX) and partial increase in smaller fibers (IIA) (Fig. 1). Such reduction in fast-twitch fibers (IIX) is in accordance with previous works from the literature showing that they are more vulnerable than slow-twitch fibers under a variety of atrophic conditions (reviewed by Wang & Pessin, 2013). Data from the literature have shown that motoneurons and their NMJs differ drastically in sizes with the biggest ones, with largest NMJs, innervating fast muscle fibers (Burke *et al.*, 1971; Mantilla *et al.*, 2007). We therefore hypothesized that the reduction in IIX muscle fibers in BACHD might also be associated to other alterations described here such as decrease in the area of pre- and postsynaptic elements (Fig. 2) and decreased size of putative motoneurons in BACHD (Fig. 4) (see also the cartoon in Fig. 5). However, we cannot rule out the possibility that the reduction in ChAT-positive cells diameter observed in BACHD spinal cords reflects putative motoneurons shrinkage before they die. Decrease in neuron's size has been recognized in other degenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's diseases and in ALS patients, where there is a depletion of large pyramidal neurons from the primary motor cortex (Betz cells) and large spinal cord motoneurons compared to control subjects (Kiernan & Hudson, 1991). Additional experiments are necessary to clarify if larger motoneurons selective die in BACHD spinal cords.

Our next experiments were designed to investigate whether BACHD mice showed alterations in the NMJs. STM-NMJs from BACHD presented several degenerative signs such as loss of colocalization between the pre- and postsynaptic elements, reduction in the synaptic area, endplates fragmentation and partial denervation (Fig. 2 and schematic representation in Fig. 5).

Many morphological studies on NMJs in neurodegenerative diseases (Sarantseva *et al.*, 2011; Valdez *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2012) or in age-related degenerative processes (Balice-Gordon, 1997; Courtney & Steinbach, 1981; Gutmann *et al.*, 1971; Valdez *et al.*, 2010) correlated similar alterations to the axonal denervation

process. For example, Ribchester *et al.* (2004) observed changes in NMJs from R6/2 mice such as denervation, reduction in the area of presynaptic terminals, increased acetylcholine sensitivity, and reduction in the sensitivity to μ -conotoxin (Ribchester). Therefore, it has been suggested that mHtt might alter synaptic components and then interfere with its structure affecting neurotransmission (Smith *et al.*, 2005). The results presented here are in line with this view.

After observing abnormalities in key components of the motor unit such as skeletal muscle and NMJs, we analyzed the ventral roots of the cervical spinal cord. The ultrastructural analysis of the ventral roots of the cervical segment of BACHD spinal cords showed lamellar separation and vacuoles in the myelin sheath and axoplasm (Fig. 3 and schematic representation in Fig. 5). Furthermore, we observed an intense process of axonal degeneration with decrease in diameter and number per area. We also observed that the myelinated fibers that were most affected in BACHD animals were of the highest caliber. Previous work demonstrated similar changes in ultrastructure preferable seen in large-caliber fibers in the sciatic nerve of the R6/2 mice (Wade *et al.*, 2008). Sobue *et al.* (1981) also found higher incidence of large-caliber fibers at the expense of smaller caliber in cervical ventral roots of patients with ALS. These data suggested that large myelinated fibers, corresponding to α -motoneurons fibers, were selectively affected and that the small myelinated fibers, corresponding to γ -motor neurons fibers, were preserved to some extent (Sobue *et al.*, 1981; Biscoe *et al.*, 1982).

Previous studies performed in R6/2 mice models for HD showed marked atrophy of skeletal muscles like TA and EDL and they related these findings on skeletal muscle atrophy to possible alterations in the α -motoneurons. However, none of these studies investigated what might be happening to α -motoneurons (Ribchester *et al.*, 2004; Mielcarek, 2015). Furthermore, Mielcarek (2015) showed, through functional tests, that the physiological evaluation of the motor unit of the R6/2 mice presented a progressive loss in the number of motor units in the EDL muscle. Our findings might contribute to a better understanding of muscle atrophy in this mice model for HD as we observed death and atrophy of putative motoneurons.

As we demonstrated neuronal loss in the cervical segment of the spinal cord, our next experiments aimed to investigate whether these neurons were undergoing apoptosis. A quantitative analysis of the number of caspase-3 positive neurons revealed that cervical spinal cords from BACHD mice had three times more neurons positive for Caspase-3 than their WT counterparts (Fig. 4). Our data suggest that the reported neuronal death in the cervical spinal cord in BACHD might be occurring by an activation of the apoptotic cascade.

These data are in accordance to previous studies using mouse models for HD that showed neuronal death by apoptosis in other regions of the CNS (Dragunow *et al.*, 1995). Other works also suggested that the Htt could be a substrate to caspase-3, leading to an increase in the cleavage rate of Htt, causing additional stress to the cell and consequently the cell death by apoptosis (Wellington *et al.*, 2002). Furthermore, Toulmond *et al.* (2004) showed that the inhibition of the activity of caspase-3 by its reversible inhibitor (M-826), resulted in a significant reduction in the neuronal death in rat models for HD.

We next investigated through TEM possible alterations at the ultrastructural level in motoneurons from cervical spinal cords of BACHD mice. Mitochondria are vital organelles that generate energy to all cellular processes and regulate cell function, thus, any impairment in these structures can lead to generation of reactive oxygen species that can induce cell death by necrosis or apoptosis (Benard *et al.*, 2007). It has been shown that mitochondria dysfunction plays an important role in the pathogenesis of HD (Browne & Beal, 2004; Reddy *et al.*, 2009). In our study, we observed cristae disruption and vacuoles in mitochondria (Fig. 4). Previous *in vivo* studies showed that N-terminals Htt fragments could directly interfere with mitochondria functioning, resulting in calcium related abnormalities and subsequent energy deficit (Panov *et al.*, 2002). It is interesting to note that neurons are the first cells to be affected by mitochondria alterations as they are very sensitive to oxidative stress, excitotoxic stress, expression of inflammatory signals, proapoptotic signals and energy depletion that might play a role in the observed neuronal death in HD (Kim *et al.*, 2010a, b).

Another feature that we observed in the EM images was the presence of lipofuscin granules (Fig. 4H) in BACHD motoneurons. It is well-described that the accumulation of these granules in neurons during aging is a normal process (Samorajski *et al.*, 1965). However, there are evidences that this deposition may also be related to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis (Mchholm *et al.*, 1984; Cataldo *et al.*, 1994). Furthermore, it is known that oxidative stress caused by mitochondrial damage in brain of HD patients leads to the increase in lipofuscin granules (Brown, 1999). Based on these evidences, we suggested that the accumulation of lipofuscin granules observed in motoneurons from BACHD might be a sign of degeneration. In addition, we suggested that the mitochondria observed in motoneurons at the ultrastructure level might be related to cell atrophy and death by apoptosis in cervical spinal cord from BACHD mice.

In conclusion, our study provides evidences of significant alterations at the spinal cord motoneurons, ventral roots, NMJs, and STM muscle in a mouse model for HD (see Fig. 5). We suggest that although this disease is caused by damage in the upper CNS structures that control movement, the motor unit, which is the final pathway of the motor system, also suffers significant changes in BACHD. Further experiments are necessary to identify mechanisms involved in these alterations. Therefore, our data may open new routes of investigation and could help in establishing new directions in the therapeutics of HD.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPEMIG (#00271-13), CNPq (#467220/2014-0 and #475735/2013-7) and CAPES. Cristina Guatimosim is a Bolsista de Produtividade em Pesquisa (CNPq). The authors would like to acknowledge the Center of Acquisition and Processing of Images (CAPI) – ICB – Universidade Federal de Minas Gerais and Microscopy Center at Universidade Federal de Minas Gerais for providing the equipments and technical support for experiments involving confocal and electron microscopy

respectively. The authors thank Isadora Souza Furtado for her work on maintaining the BACHD colonies used in this study; Isabella Guimarães Olmo and Juliana Guimarães Dória for the assistance in genotyping the animals, Leonardo Sawakuchi for the assistance in statistical analysis and Carla Morais for her work in Schematic representation of cervical spinal cords.

Abbreviations

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CNS, central nervous system; CSA, cross-sectional area; EDL, extensor longus digitorum; FF, fast fatigable; HD, Huntington's disease; htt, Huntingtin; mHtt, mutated huntingtin; MU, motor unit; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; NMJs, neuromuscular junctions; PGC-1 α , proliferator-activated receptor γ co activator 1 alpha; RT, room temperature; SR, sarcoplasmic reticulum; STM, sternomastoid; TA, tibialis anterior; TEM, transmission electron microscopy; WT, wild type; α -btx, α -bungarotoxin.

References

- Ballice-Gordon, R.J. (1997) Age-related changes in neuromuscular innervation. *Muscle Nerve Suppl.*, **5**, S83–S87.
- Bates, G.P. (2005) History of genetic disease: the molecular genetics of Huntington disease – a history. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 766–773.
- Bates, G.P., Harper, P.S. & Jones, A.L. (2002) *Huntington's Disease*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 429–472.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T. & Rossignol, R. (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.*, **120**, 838–848.
- Biscoe, T.J., Nickels, S.M. & Stirling, C.A. (1982) Numbers and sizes of nerve fibres in mouse spinal roots. *Exp. Physiol.*, **67**, 473–494.
- Brown, G.C. (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *BBA-Bioenergetics*, **1411**, 351–369.
- Browne, S.E. & Beal, M.F. (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochem. Res.*, **29**, 531–546.
- Brožová, H., Štochl, J., Klempf, J., Kucharík, M., Růžička, E. & Roth, J. (2011) A sensitivity comparison of clinical tests for postural instability in patients with Huntington's disease. *Gait Posture.*, **34**, 245–247.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Zajac, F.E.D., Tsairis, P. & Engel, W.K. (1971) Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science*, **174**, 709–712.
- Cataldo, A.M., Hamilton, D.J. & Nixon, R.A. (1994) Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. *Brain Res.*, **640**, 68–80.
- Chandra, A., Sharma, A., Calingasan, N.Y., White, J.M., Shurubor, Y., Yang, X.W. & Johri, A. (2016) Enhanced mitochondrial biogenesis ameliorates disease phenotype in a full-length mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 2269–2282.
- Chaturvedi, R.K., Adhietty, P., Shukla, S., Hennessy, T., Calingasan, N., Yang, L., Starkov, A., Kiaei, M. *et al.* (2009) Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 3048–3065.
- Chau, W.K., So, K.F., Tay, D. & Dockery, P. (2000) A morphometric study of optic axons regenerated in a sciatic nerve graft of adult rats. *Restor. Neurol. Neuros.*, **16**, 105–116.
- Courtney, J. & Steinbach, J.H. (1981) Age changes in neuromuscular junction morphology and acetylcholine receptor distribution on rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, **320**, 435–447.
- Dragunow, M., Faull, R.L.M., Lawlor, P., Beilharz, E.J., Singleton, K., Walker, E.B. & Mee, E. (1995) In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *NeuroReport*, **6**, 1053–1057.
- Farrer, L.A. (1985) Diabetes mellitus in Huntington disease. *Clin. Genet.*, **27**, 62–67.
- Farrer, L.A. & Meaney, F.J. (1985) An anthropometric assessment of Huntington's disease patients and families. *Am. J. Phys. Anthropol.*, **67**, 185–194.
- Gray, M., Shirasaki, D.I., Cepeda, C., André, V.M., Wilburn, B., Lu, X.H. & Li, X.J. (2008) Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *J. Neurosci.*, **28**, 6182–6195.
- Gutmann, E., Hanzlikova, V. & Vysokocil, F. (1971) Age changes in cross striated muscle of the rat. *J. Physiol.*, **216**, 331–343.
- Harjes, P. & Wanke, E.E. (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Cell Press*, **28**, 425–433.

- Holmes, A., Yang, R.J., Murphy, D.L. & Crawley, J.N. (2002) Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology*, **27**, 914–923.
- Hoogeveen, A.T., Willemsen, R., Meyer, N., De Rooij, K.E., Roos, R.A., Van Ommen, G.J.B. & Galjaard, H. (1993) Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 2069–2073.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, **72**, 971–983.
- Kazantsev, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D. & Housman, D. (1999) Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 11404–11409.
- Kiernan, J.A. & Hudson, A.J. (1991) Changes in sizes of cortical and lower motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, **114**, 843–853.
- Kim, M.S. (2015) Neck kinematics and sternocleidomastoid muscle activation during neck rotation in subjects with forward head posture. *J. Phys. Ther. Sci.*, **27**, 3425.
- Kim, J., Moody, J.P., Edgerly, C.K., Bordiuk, O.L., Cormier, K., Smith, K., Beal, M.F. & Ferrante, R.J. (2010a) Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3919–3935.
- Kim, J., Moody, J.P., Edgerly, C.K., Bordiuk, O.L., Cormier, K., Smith, K. & Ferrante, R.J. (2010b) Mitochondrial loss, dysfunction, and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3919–3935.
- Kong, J. & Xu, Z. (1999) Peripheral axotomy slows motoneuron degeneration in a transgenic mouse line expressing mutant SOD1 G93A. *J. Comp. Neurol.*, **412**, 373–380.
- Li, S.H., Schilling, G., Young, W., Margolis, R.L., Stine, O.C., Wagster, M.V. & Hedree, N.J.C. (1993) Huntington's disease gene (IT15) is widely expressed in human and rat tissues. *Neuron*, **11**, 985–993.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C. & Bates, G.P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, **87**, 493–506.
- Mantilla, C.B., Rowley, K.L., Zhan, W.Z., Fahim, M.A. & Sieck, G.C. (2007) Synaptic vesicle pools at diaphragm neuromuscular junctions vary with motoneuron soma, not axon terminal, inactivity. *Neuroscience*, **146**, 178–189.
- Mantovani, S., Gordon, R., Li, R., Christie, D.C., Kumar, V. & Woodruff, T.M. (2016) Motor deficits associated with Huntington's disease occur in the absence of striatal degeneration in BACHD transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 1780–1791.
- Marchand, I., Chorneyko, K., Tarnopolsky, M., Hamilton, S., Shearer, J., Potvin, J. & Graham, T.E. (2002) Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. *J. Appl. Physiol.*, **93**, 1598–1607.
- Mchalm, G.B., Aguilar, M.J. & Norris, F.H. (1984) Lipofuscin in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.*, **41**, 1187.
- Menalled, L., El-Khodori, B., Patry, M. & Suarez-Farinas, M. (2009) Systematic behavioral evaluation of transgenic and knock-in mouse models of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, **35**, 319–336.
- Mielcarek, M. (2015) Huntington's disease is a multi-system disorder. *Rare Dis.*, **3**, e1058464.
- Moffitt, H., McPhail, G.D., Woodman, B., Hobbs, C. & Bates, G.P. (2009) Formation of polyglutamine inclusions in a wide range of non-CNS tissues in the HdhQ150 knock-in mouse model of Huntington's disease. *PLoS One*, **30**, e8025.
- Nielsen, J., Schröder, H.D., Rix, C.G. & Ørtenblad, N. (2009) Distinct effects of subcellular glycogen localization on tetanic relaxation time and endurance in mechanically skinned rat skeletal muscle fibres. *J. Physiol.*, **587**, 3679–3690.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S. *et al.* (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature*, **399**, 263–267.
- Orth, M., Cooper, J.M., Bates, G.P. & Schapira, A.H. (2003) Inclusion formation in Huntington's disease R6/2 mouse muscle cultures. *J. Neurochem.*, **87**, 1–6.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J. & Greenamyre, J.T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.*, **5**, 731–736.
- Pellegrino, C. & Franzini, C. (1963) An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle fibres. *J. Cell Biol.*, **17**, 327–349.
- Pratt, S.J., Shah, S.B., Ward, C.W., Inacio, M.P., Stains, J.P. & Lovering, R.M. (2013) Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *J. Physiol.*, **591**, 559–570.
- Reddy, P.H., Mao, P. & Manczak, M. (2009) Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain Res. Rev.*, **61**, 33–48.
- Ribchester, R.R., Thomson, D., Wood, N.I., Hinks, T., Gillingwater, T.H., Wishart, T.M., Court, F.A. & Morton, A.J. (2004) Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 3092–3114.
- Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A. *et al.* (2000) Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J. Neurosci.*, **20**, 3705–3713.
- Rodrigues, H.A., Fonseca, M.D.C., Camargo, W.L., Lima, P.M., Martinelli, P.M., Naves, L.A. & Guatimosim, C. (2013) Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter and neurotransmitter content affects synaptic vesicle distribution and shape in mouse neuromuscular junction. *PLoS One*, **8**, e78342.
- Samorajski, T., Ordy, J.M. & Keefe, J.R. (1965) The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. *J. Cell Biol.*, **26**, 779–793.
- Sarantseva, S.V., Kislik, G.A., Tkachenko, N.A., Vasil'ev, A.N. & Shvartsman, A.L. (2011) [Morphological and functional abnormalities in neuromuscular junctions of *Drosophila melanogaster* induced by the expression of human APP gene]. *Tsitologiya*, **54**, 421–429.
- Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., Wanker, E.E., Doherty, P. *et al.* (1999) Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 813–822.
- Smith, R., Brundin, P. & Ly, J.Y. (2005) Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1901–1912.
- Sobue, G., Matsuoka, Y., Mukai, E., Takayanagi, T. & Sobue, I. (1981) Pathology of myelinated fibers in cervical and lumbar ventral spinal roots in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, **50**, 413–421.
- Tian, J.R., Herdman, S.J., Zee, D.S. & Folstein, S.E. (1992) Postural stability in patients with Huntington's disease. *Neurology*, **42**, 1232.
- Toulmond, S., Tang, K., Bureau, Y., Ashdown, H., Degen, S., O'donnell, R., Tam, J., Han, Y. *et al.* (2004) Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. *Brit. J. Pharmacol.*, **141**, 689–697.
- Trejo, A., Tarrats, R.M., Alonso, M.E., Boll, M.C., Ochoa, A. & Velásquez, L. (2004) Assessment of the nutrition status of patients with Huntington's disease. *Nutrition*, **20**, 192–196.
- Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G. & Agid, Y. (1995) Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, **378**, 403–406.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Kang, H., Clemenson, G.D.J.R., Gage, F.H., Lichtman, J.W. & Sanes, J.R. (2010) Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 14863–14868.
- Valdez, G., Tapia, J.C., Lichtman, J.W., Fox, M.A. & Sanes, J. (2012) Shared resistance to aging and ALS in neuromuscular junctions of specific muscles. *PLoS One*, **7**, e34640.
- Van Der Burg, J.M., Björkqvist, M. & Brundin, P. (2009) Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.*, **8**, 765–774.
- Wade, A., Jacobs, P. & Morton, A.J. (2008) Atrophy and degeneration in sciatic nerve of presymptomatic mice carrying the Huntington's disease mutation. *Brain Res.*, **1188**, 61–68.
- Wang, Y. & Pessin, J.E. (2013) Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr.*, **16**, 243–250.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Gutekunst, C.A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R.K., Loubser, O., Van Raamsdonk, J. *et al.* (2002) Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, **22**, 7862–7872.
- Xia, R., Liu, Y., Yang, L., Gal, J., Zhu, H. & Jia, J. (2012) Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a *Drosophila* model of Fus-mediated ALS. *Mol. Neurodegener.*, **7**, 10.
- Yang, X.W. & Gray, M. (2011) Mouse models for validating preclinical candidates for Huntington's disease. In Lo, D.C. & Hughes, R.E. (Eds),

- Neurobiology of Huntington's Disease: Applications to Drug Discovery*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, FL. Chapter 7.
- Yang, X.W., Model, P. & Heintz, N. (1997) Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nature Biotechnol.*, **15**, 859–865.
- Zielonka, D., Piotrowska, I., Marcinkowski, J.T. & Mielcarek, M. (2014) Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. *Front. Physiol.*, **5**, 1–5.
- Zuccato, C., Valenza, M. & Cattaneo, E. (2010) Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol Ver.*, **90**, 905–981.