

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

KIVIA BARRETOS SOARES SANTOS

A ativação do adrenoceptor- β_2 pelo formoterol induz a excitose cálcio-dependente de vesículas sinápticas na junção neuromuscular de camundongos

Belo Horizonte

2022

KIVIA BARRETOS SOARES SANTOS

A ativação do adrenoceptor- β_2 pelo formoterol induz a exocitose de vesículas sinápticas na junção neuromuscular de camundongos

Versão final

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr. Cristina Guatimosim

Coorientador: Dr. Matheus de Castro Fonseca

Belo Horizonte

2022

043

Santos, Kivia Barretos Soares.

A ativação do adrenoceptor- β 2 pelo formoterol induz a exocitose de vesículas sinápticas na junção neuromuscular de camundongos [manuscrito] / Kivia Barretos Soares Santos. – 2022.

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

Orientador(a): Dr. Cristina Guatimosim. Coorientador: Dr. Matheus de Castro Fonseca.

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

1. Biologia Celular. 2. Transmissão Sináptica. 3. Junção Neuromuscular. 4. Fumarato de Formoterol. I. Fonseca, Cristina Guatimosim. II. Fonseca, Matheus de Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE KIVIA BARRETOS SOARES SANTOS

Às quatorze horas do dia 19 de dezembro de 2022, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO ADRENOCEPTOR-BETA 2 NA TRANSMISSÃO SINÁPTICA NEUROMUSCULAR DE CAMUNDONGOS", requisito final para obtenção do grau de Mestre 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 à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Cristina Guatimosim Fonseca	UFMG/ICB	Aprovada
Dr. Matheus de Castro Fonseca	CALTECH	Aprovada
Dr. Walter Cavalcante	UFMG	Aprovada
Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes	FM USP-Ribeirão Preto	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2022.**

Dr^a. Cristina Guatimosim Fonseca

Dr. Matheus de Castro Fonseca

Dr. Walter Cavalcante

Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Walter Luis Garrido Cavalcante, Subchefe**, em 21/12/2022, às 16:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 21/12/2022, às 17:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Matheus de Castro Fonseca, Usuário Externo**, em 21/12/2022, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543 de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1983159 e o código CRC 2110625F.

APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia da Neurotransmissão do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Centro de Microscopia da UFMG. Todo o estudo foi orientado pela Profa. Dra. Cristina Guatimosim Fonseca e com apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2018/20014-0);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**PARTE DOS RESULTADOS DESTA DISSERTAÇÃO FOI APRESENTADA NOS
SEGUINTE EVENTOS:**

- 3º Congresso da Federação das Sociedades de Neurociências da América Latina e do Caribe (FALAN) e o XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio que me deram sempre em todas as escolhas que eu fiz na vida. Não poderia pedir por pessoas melhores para ter por perto desde o meu desenvolvimento até a minha vida adulta. À minha mãe, Darci, por estar lá por mim sempre que eu precisei e por ser a mãe mais amorosa, gentil e acolhedora do mundo. Ao meu pai, Enius, pelo incentivo a carreira científica, por ser totalmente peculiar do melhor jeito possível e por ser este excelente pai. Ao meu irmão, Guilherme, pelo companheirismo e por ter sido meu grande aliado nas lutas da vida desde que nasci. À minha tia Luiza por ser essa tia muito mais que especial que me acompanha em cada passo que eu dou sempre me oferecendo suporte e incentivo.

Aos meus amigos mais antigos, os quais a palavra amigo parece completamente inapropriada pois somos muitos mais que isso. Somos família. Somos irmãos. Ao Bruno, que é com certeza um dos melhores seres humanos que eu conheço e sempre traz mais leveza para a minha vida. À Leticia, pelo apoio todos esses anos, pela fé que coloca em tudo que eu falo relacionado a ciência e por ter diluído comigo a minha timidez. À Ana, minha amiga mais antiga, que esteve comigo praticamente a vida toda e a qual sei que posso contar pra qualquer coisa, inclusive me emprestar um computador depois do meu ter estragado nos meses finais do mestrado. Muito obrigada, amiga, não estaria digitando isso agora se não fosse por você. E ao Gabriel, que me fez muita falta nestes últimos anos por estar morando tão longe, mas sempre vai ser a minha pessoa preferida de conversar.

Aos meus amigos mais recentes, que são a minha maior companhia na vida adulta, que me escutam reclamar diariamente sobre o mestrado e sobre a vida, que não me deixam desistir, que secam minhas lágrimas, que me fazem rir e que enchem meu copo. Vocês são incríveis. Não esperava encontrar amigos tão bons assim na faculdade. Em especial, a Bibi, meu anjinho nessa UFMG, a Leticia, melhor apatamentmatemate do mundo, ao Peroba, por ouvir sobre cada passo que eu dou diariamente e pelo resto todo, à Júlia, por ser minha única amiga da área da saúde e por compartilhar sempre as minhas frustrações acadêmicas e não acadêmicas, ao Eric, por tornar meus dias tão melhores, ao Vitu, por ser essa pessoa tão incrível que ganhou tão rápido meu coração, e ao Dantinho, por ser tão estranho, sempre me fazer sorrir e sempre me deixar sem saber do que ele está falando.

Aos meus gatinhos, Duds, Draquinho e Tutu, que fazem a minha vida muito melhor, me acompanham todos os dias, são meu descanso e meu conforto. Ao meu cachorro chechewie, que mesmo não morando mais comigo me traz alegria só de pensar. Aos meus demais 18 gatos que moram com meus pais e que são muitos pra citar aqui mas que são amados imensamente.

À minha orientadora Cristina, que me aceitou em seu laboratório em 2016 e me guiou desde realmente o início da minha graduação até onde estou hoje. Aos meus amigos do LabNeuro por fazerem as horas de trabalho serem mais divertidas: Leo, Babi, Gabriel Marques, Gabriel Adler, Gabriel Chaimowicz,

Natália e Leticia. À Prica, por ser uma grande orientadora pra mim desde o início. À Thati, uma amizade que começou no LabNeuro e foi pra vida. Ao Matheus Proença por sempre estar disposto a tirar as minhas dúvidas. Ao meu co-orientador, Matheus de Castro, por me ensinar a técnica e se mostrar disponível para me ajudar em eventuais dificuldades.

A todos os colegas e professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, à Universidade Federal de Minas Gerais e às agências financiadoras que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho. Enfim, à todos que de alguma forma impactaram positivamente a minha vida e me ajudaram a chegar ao fim deste mestrado com este trabalho desenvolvido. Muito obrigada!

“Não há razão para sermos menos tocados pela natureza ao nosso redor simplesmente porque ela revela ter mais camadas de complexidade do que observamos inicialmente.”

Robert Sapolsky

RESUMO

O sistema noradrenérgico tem uma ampla gama de efeitos em diferentes sistemas fisiológicos e os efeitos no músculo esquelético ocorrem principalmente por meio da ativação de receptores da família β . Os receptores β_2 são os mais abundantes e sua ativação promove diversas vias de sinalização que resultam em processos anabólicos e hipertrofia. O uso de agonistas- β_2 no músculo esquelético tem sido considerado uma droga potencial para o tratamento de patologias que podem gerar atrofia muscular. Entretanto, seus efeitos na junção neuromuscular e nas sinapses colinérgicas ainda são pouco explorados. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos pré-sinápticos do fármaco agonista- β_2 específico fumarato de formoterol na transmissão sináptica neuromuscular em preparações *ex-vivo* de diafragma de camundongos.

Para este estudo, foi isolado o músculo diafragma e nervo frênico de camundongos C57 machos e fêmeas com 3 meses de idade. A exocitose de vesículas sinápticas nas junções neuromusculares foi visualizada e monitorada através do uso da sonda fluorescente FM1-43. Estas preparações, após o protocolo de marcação com FM1-43, foram incubadas com fumarato de formoterol em concentrações crescentes (0,01, 0,1, 0,25, 1, 10 e 50 μM) com o objetivo de construir uma curva dose-resposta. Nossos resultados mostram que o formoterol induz a exocitose de vesículas sinápticas nas junções neuromusculares diafragmáticas, tanto em machos quanto em fêmeas. Este agonista apresenta efeito considerável já na concentração de 0,1 μM , com queda de fluorescência de aproximadamente 40% nos machos. A taxa de exocitose vesicular é diretamente proporcional ao aumento da concentração da droga nos machos. As fêmeas se mostraram menos sensíveis aos efeitos do formoterol, já que todas as concentrações testadas superiores a 0,01 μM tiveram o mesmo efeito. Esses resultados sugerem que o formoterol é capaz de evocar a exocitose de vesículas sinápticas nas junções neuromusculares.

Para investigar os mecanismos de ação pelos quais a droga induz a exocitose de vesículas, avaliamos os efeitos do formoterol associado ao KCl, um composto indutor de exocitose independente de sódio. Observamos um efeito aditivo do KCl e do formoterol, visto que a taxa de decaimento do sinal fluorescente aumentou com o aumento da concentração de formoterol. Com base nisso, levantamos a hipótese de que o formoterol e o KCl induzem a exocitose por mecanismos diferentes. Este estudo demonstra que o formoterol tem ações pré-sinápticas e é capaz de aumentar tanto a exocitose espontânea quanto a evocada. Os resultados obtidos podem abrir caminhos para possíveis estudos futuros que irão elucidar os mecanismos de ação dos β_2 agonistas no músculo esquelético e consolidar esta classe de fármacos como estratégia terapêutica para o tratamento de miastenias e diversas outras patologias neuromusculares.

Palavras-chave: Biologia Celular; Transmissão Sináptica; Junção Neuromuscular.; Formoterol.

ABSTRACT

The noradrenergic system has a wide range of effects in different physiological systems and the effects on skeletal muscle mainly occur via the activation of β -family receptors. In the skeletal muscle, the β_2 receptors are the most abundant and their activation promotes several signaling pathways that result in anabolic processes and hypertrophy. The use of β_2 -adrenergic agonists in skeletal muscle has been considered a potential drug for treatment of pathologies that can generate muscle atrophy. Meanwhile, its effect on the neuromuscular junction and on the cholinergic synapses are still poorly explored. Thus, the objective of this work is to evaluate the presynaptic effects of the specific β_2 -agonist drug formoterol fumarate on neuromuscular synaptic transmission in mice diaphragm *ex-vivo* preparations.

For this study, the diaphragm muscles associated with the phrenic nerve from three-month-old male and female C57 mice were isolated. Synaptic vesicles exocytosis at the neuromuscular pre-synaptic terminals was visualized and monitored with the use of the vital dye FM1-43 and fluorescence microscopy. After stained preparations were incubated with formoterol fumarate at increasing concentrations (0.01, 0.1, 0.25, 1, 10 e 50 μ M) in order to build a dose-response curve. Our results show that formoterol evokes exocytosis of synaptic vesicles in the diaphragmatic neuromuscular junctions in both male and female animals. Formoterol presented a considerable effect in the concentration of 0.1 μ M, with a fluorescence decay of approximately 40% in males. The rate of decay of the fluorescent signal which reflects exocytic activity is directly proportional to the increase of the drug concentration in males. Females appear to be less sensitive to the effects of formoterol since in all concentrations the effect observed was similar. These results suggest that formoterol evokes the exocytosis of synaptic vesicles at neuromuscular junctions.

To go deeper into the mechanisms by which formoterol can evoke synaptic vesicles exocytosis, we co-stimulated the preparations with formoterol plus KCl, a sodium-independent exocytosis-inducing compound. We observed an additive effect of KCl and formoterol, given that the rate of decay of the fluorescent signal increased as the concentration of formoterol increased. Therefore, we hypothesized that formoterol and KCl induced exocytosis through different mechanism. This study demonstrates that formoterol has presynaptic actions and increases both spontaneous and evoked exocytosis. The results obtained may pave the way for future studies that will elucidate the mechanisms of action of β_2 agonists in skeletal muscle and consolidate this class of drugs as a therapeutic strategy for the treatment of myasthenia and several other neuromuscular pathologies.

Keywords: Cell Biology; Synaptic Transmission; Neuromuscular Junction.; Formoterol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Junções neuromusculares de camundongos	18
Figura 2- Exocitose de vesículas sinápticas	21
Figura 3- Modelo das principais etapas da exocitose de vesículas sinápticas	22
Figura 4- Três modelos para endocitose de vesículas sinápticas	25
Figura 5- Representação esquemática do adrenoceptor- β_2	31
Figura 6- Sequência de aminoácidos e topologia do adrenoceptor β_2 em humanos	31
Figura 7- Adrenoceptor β_2 no músculo esquelético	32
Figura 8- Estrutura química do simpatomimético fumarato de formoterol	36
Figura 9- A sonda fluorescente FM1-43 é utilizada para o monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas	40
Figura 10- Junções neuromusculares contendo vesículas marcadas com a sonda fluorescente FM1-43	41
Figura 11- Representação esquemática ilustrativa do modo de obtenção dos fragmentos de diafragma fixados para os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão	44
Figura 12- Curva dose-resposta da exocitose induzida pelo simpatomimético fumarato de formoterol em machos	48
Figura 13- Quantificação da exocitose induzida pelo formoterol em machos	49
Figura 14- Curva dose-resposta da exocitose induzida pelo simpatomimético fumarato de formoterol em fêmeas	50
Figura 15- Quantificação da exocitose induzida pelo formoterol em fêmeas	51
Figura 16- Curva dose-resposta de machos e fêmeas	53
Figura 17- Quantificação da exocitose na presença e ausência do simpatomimético formoterol em machos WT e β_2 -KO	55
Figura 18- Curva dose-resposta do efeito do simpatomimético fumarato de formoterol na exocitose induzida por KCl em machos	58
Figura 19- Quantificação da exocitose induzida pelo simpatomimético formoterol associado a KCl em machos	59
Figura 20- Curva dose-resposta do efeito do simpatomimético fumarato de formoterol na exocitose induzida por KCl em fêmeas	60
Figura 21- Quantificação da exocitose induzida pelo simpatomimético formoterol associado a KCl em fêmeas	61
Figura 22- Formoterol estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente do Ca^{2+} extracelular em fêmeas	64

Figura 23- Formoterol estimula a excitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente do Ca^{2+} extracelular em machos	65
Figura 24- Efeito do formoterol em fêmeas associado a droga bloqueadora dos canais para Ca^{2+} dos tipos P/Q, ω-Agatoxina IVA	69
Figura 25- - Efeito do formoterol em machos associado a droga bloqueadora dos canais para Ca^{2+} dos tipos P/Q, ω-Agatoxina IVA	71
Figura 26- Imagens representativas dos elementos sinápticos de junções neuromusculares diafragmáticas após estímulo com formoterol [10 μM] e KCl [60 mM]	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ω -Aga IVA	Omega- Agatoxina IVA
ACh	Acetilcolina
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AChE	Acetilcolinesterase
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca ²⁺	Íons cálcio
CSSV	Canais para sódio sensíveis à voltagem
CCSV	Canais para cálcio sensíveis à voltagem
CO ₂	Dióxido de carbono
EGTA	Etilenoglicol-bis- β -amino etil éster
EPM	Erro padrão médio
FM1-43	N-(3-triethylammonium-propyl)-4-(4(dibutylamino)styryl)pyridinium dibromide
JNM	Junção neuromuscular
KCl	Cloreto de potássio
K ⁺	Íons potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Munc13	<i>Mammalian uncoordinated-13</i>
Na ⁺	Íons Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
nAChR	Receptor nicotínico para acetilcolina
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion
O ₂	Oxigênio
Rab3	Ras-related in brain - 3
RIM	Rab-interacting molecule

SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNARE	<i>Soluble NSF attachment protein receptor</i>
SNAP-25	Proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma
	<i>Target SNARE</i>
t-SNARE	Proteína de membrana associada à vesícula
VAMP	Vesicular SNARE
v-SNARE	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 A Junção Neuromuscular	17
1.2 A sinapse e o ciclo de vesículas sinápticas	20
1.3 Sistema adrenérgico e o músculo esquelético.....	27
1.3.1 O adrenoceptor β_2	27
1.3.2 O adrenoceptor- β_2 na junção neuromuscular	34
1.3.3 Os simpatomiméticos agonistas β_2 gerais.....	35
1.3.4 O simpatomimético Fumarato de Formoterol	36
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Animais	38
3.2 Soluções	39
3.3 Reagentes e toxinas	39
3.4 Marcação e monitoramento de vesículas sinápticas com a sonda fluorescente FM1-43	39
3.5 Exposição dos tecidos marcados com a sonda ao simpatomimético Formoterol....	43
3.6 Aquisição e análise das imagens marcadas com FM1-43	43
3.7 Análise estatística dos experimentos com FM1-43.....	43
3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	43
3.8.1 Obtenção das elétrôn-micrografias de transmissão.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1 Efeitos do simpatomimético fumarato de formoterol na exocitose espontânea de vesículas sinápticas em JNMs.....	47
4.1.1 Diferença entre machos e fêmeas.....	53
4.1.2 Efeito do Formoterol via a ativação específica do adrenoceptor- β_2	55
4.4 Efeito do Formoterol na exocitose induzida por KCl	57
4.5 Formoterol estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente do Ca^{2+} extracelular.	63
4.6 Formoterol estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente dos canais para Ca^{2+} do tipo P/Q.....	68
4.6 Plano ultraestrutural das junções neuromusculares estimuladas com formoterol verificado através de microscopia eletrônica de transmissão	74
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8. ANEXO 1: Artigo publicado durante o mestrado.....	96
9. ANEXO 2: Artigo publicado durante o mestrado.....	114

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Junção Neuromuscular

As sinapses são contatos especializados entre duas células nos quais neurônios transduzem sinais específicos a uma célula alvo de maneira profundamente regulada. Essa transdução de sinal pode acontecer através de uma sinapse química ou de uma sinapse elétrica (ZHAI & BELLEN, 2004). As sinapses elétricas são uma forma mais simples e rápida de comunicação que acontece em regiões especializadas dos neurônios que permitem a passagem intracelular de íons carregando correntes elétricas, chamadas *gap junctions* (BENNET, 1977). Estas junções celulares representam agrupados de canais intercelulares formados por proteínas chamadas conexinas (GOODENOUGH AND PAUL, 2009). A transmissão elétrica é uma forma de comunicação altamente dinâmica já que seu estado funcional está em constante influência de vários processos regulatórios (PEREDA *et al.*, 2013; O'BRIEN, 2014).

Em mamíferos, as sinapses químicas são a forma de comunicação nervosa mais abundante. A transdução do sinal é alcançada através da conversão do sinal elétrico em um sinal químico que se difunde entre as células. Essa conversão de sinal acontece nas zonas ativas dos terminais pré-sinápticos (ZHAI & BELLEN, 2004). O estímulo gerado chega ao neurônio seguinte através de uma corrente de íons que despolariza sua membrana plasmática causando a abertura de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. O influxo de cálcio provoca um rápido acúmulo intracelular deste íon, e consequente, liberação do neurotransmissor na fenda sináptica, o qual se liga a seu receptor específico no terminal pós-sináptico (PARNAS & PARNAS, 2006).

Um tipo especializado de sinapse química é a junção neuromuscular (JNM) que é responsável pela comunicação entre o sistema nervoso e o sistema musculoesquelético. A JNM de mamíferos (FIGURA 1) é um dos principais modelos de estudo usados para elucidar os processos neuroquímicos e neurofisiológicos que compreendem uma sinapse química, dada a sua simplicidade, seu tamanho e sua fácil acessibilidade (KUMMER *et al.*, 2005). Estas estruturas são assimétricas sendo formadas por um terminal pré-sináptico preenchido por vesículas sinápticas (de aproximadamente 50 nm de diâmetro) contendo acetilcolina (ACh), uma fenda sináptica e o aparato pós-sináptico na célula muscular. A região da membrana plasmática pré-sináptica onde as vesículas ancoram, fusionam-se com a membrana, e liberam seus neurotransmissores é denominada zona ativa. Na região pós-sináptica encontram-se aglomerados de receptores para ACh e canais iônicos (GARNER *et al.*, 2000). As fibras motoras, em suas regiões especializadas do aparato pós-sináptico, incluem dobras

juncionais por onde se espalham os receptores nicotínicos para ACh. As cristas das dobras juncionais estão precisamente alinhadas com as zonas ativas pré-sinápticas (HALL AND SANES, 1993). Além desta comunicação nervo-músculo, as células de Schwann também são especializadas nas JNM. Enquanto nas regiões pré-terminais as células de Schwann formam a mielina, nos terminais estas células recobrem os terminais nervosos de modo a protegê-los de impulsos químicos e mecânicos, além de participar de processos de remodelação axonal (REYNOLDS AND WOOLF, 1992). As células de Schwann terminais também possuem um transiente de cálcio em resposta aos potenciais de ação axonais (JAHROMI *et al.*, 1992; REIST AND SMITH, 1992), além de serem capazes de sintetizar e secretar ACh em caso de denervação (BIRKS *et al.*, 1960).

As JNM de camundongos possuem um aspecto circunscrito e arborizado (FIGURA 1A e FIGURA 1C). Graças ao advento da microscopia eletrônica de transmissão, podemos observar no plano ultraestrutural um terminal pré-sináptico contendo muitas vesículas sinápticas (essas preenchidas por ACh) e mitocôndrias, uma fenda sináptica, e a membrana pós-sináptica da fibra muscular, apresentando dobras juncionais com cristas cobertas por receptores nicotínicos para ACh (FIGURA 1B).

Toda estrutura formadora das JNM garante uma comunicação precisa e coordenada entre as terminações nervosas de neurônios motores e as células do músculo esquelético, além de ser um eficaz modelo de estudo para o ciclo de vesículas sinápticas e de fonte para possíveis estratégias farmacológicas que atuam nestes processos.

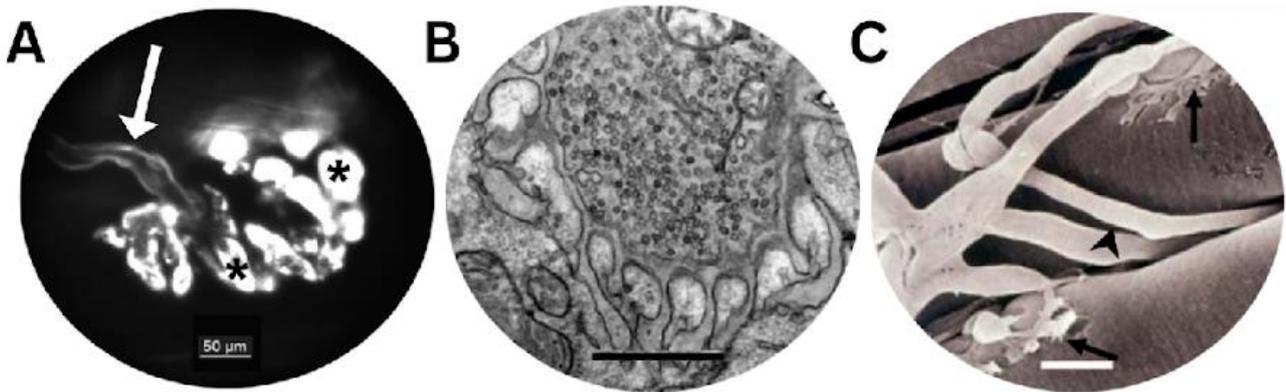


Figura 1- Junções neuromusculares de camundongo.

(A) Imagem de microscopia de fluorescência de uma junção neuromuscular de camundongo marcada com a sonda fluorescente FM1-43 (Kivia B. S. Santos). É possível observar o axônio mielinizado se ligando ao terminal pré-sináptico da placa motora (seta) e o terminal pré-sináptico de aspecto arborizado (asteriscos). (B) Micrografia eletrônica de transmissão de uma junção neuromuscular de camundongo (Hermann A. Rodrigues). O componente pré-sináptico apresenta diversas vesículas sinápticas e mitocôndrias. O componente pós-sináptico é a célula muscular que apresenta dobras juncionais. Os componentes pré e pós-sinápticos são separados por uma fenda sináptica (Barra de escala: 1 μm). (C) Micrografia eletrônica de varredura de uma junção neuromuscular de camundongo. O axônio motor (cabeça de seta) se dispõe de forma circular ao redor de uma fibra muscular estriada esquelética e se liga a ela formando placas motoras (setas) (TORREJAIS *et al.*, 2002) (Barra de escala: 10 μm).

1.2 A sinapse e o ciclo de vesículas sinápticas

A comunicação química que acontece nas células nervosas depende da disponibilidade de vesículas sinápticas preenchidas por neurotransmissores e prontas para serem liberadas. No sistema nervoso central (SNC), apesar de um terminal sináptico típico possuir na ordem de $\sim 10^2$ vesículas por zona ativa, a atividade neuronal frequentemente necessita de um potencial de ação forte e sustentado na faixa de 10-100 Hz (SCHEWEIZER & RYAN, 2006).

Para suportar as altas taxas de liberação que acontece nos neurônios do sistema nervoso central e periférico, as sinapses necessitam de um constante abastecimento de vesículas sinápticas preenchidas. Esse abastecimento é mantido primariamente através da endocitose compensatória de membrana, triagem de carga e recarga rápida das vesículas recém-formadas com o neurotransmissor. Este processo de reconstituição das vesículas sinápticas após a fusão é chamado de reciclagem de vesículas (CHANADAY *et al.*, 2019). Dessa forma, o ciclo de vesículas sinápticas é composto por dois grandes eventos: exocitose e a endocitose compensatória.

Durante um estímulo prolongado, a secreção de neurotransmissor se inicia através da entrada dependente de despolarização do íon cálcio (Ca^{2+}) no terminal do neurônio (HEUSER, 1989). As proteínas do terminal pré-sináptico que atuam como sensores dos níveis intracelulares de Ca^{2+} são as denominadas sinaptotagmina 1 e 2 em conjunto com uma proteína auxiliar chamada complexina (SÜDHOF, 2014). Sinaptotagminas são proteínas sinápticas secretórias que possuem uma única região N-terminal transmembrana e dois domínios de ligação a Ca^{2+} C-terminal (PERIN *et al.*, 1990). A exocitose de vesículas sinápticas compartilha muitos princípios básicos e proteínas homólogas com outros eventos de fusão de membrana nas células secretoras. Os principais agentes de todos os eventos de fusão de membrana são a superfamília de proteínas denominadas *soluble NSF attachment receptors* (SNAREs), caracterizada por um domínio α -helicoidal de ~ 60 aminoácidos (ROTHMAN, 1994; JHAN & SÜDHOF, 1999). Estas proteínas foram caracterizadas como v-SNAREs e t-SNAREs baseado na sua localização na vesícula ou membrana da célula alvo, respectivamente, que participam das fases de ancoragem e fusão das vesículas (FIGURA 2) (ROTHMAN, 1994). A exocitose de vesículas sinápticas requer três SNAREs neuronais: a proteína de membrana associada a vesícula VAMP2, também chamada de sinaptobrevinina, a syntaxina 1, e a proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma, SNAP-25 (LI & CHIN, 2003). VAMP2 é uma proteína integral de membrana de vesículas sinápticas (TRIMBLE, COWAN & SCHELLER, 1988). Syntaxina 1 é uma proteína da membrana plasmática neuronal que atua como ligante da sinaptotagmina e dos canais para cálcio do tipo N (BENNETT, CALAKOS & SCHELLER, 1992). VAMP2 e a syntaxina contêm, cada uma, um

único motivo SNARE adjacente ao domínio transmembrana carboxiterminal, enquanto SNAP-25 contém dois motivos SNARE conectados por uma região de resíduo de cisteína palmitoilado (WEIMBS, 1997). Esses quatro motivos SNARE presentes nessas três proteínas se posicionam formando um feixe helicoidal paralelo de quatro fitas para formar um complexo ternário extremamente estável chamado complexo SNARE (FIGURA 3A, FIGURA 3B e FIGURA 3C) (SÖLLNER *et al.*, 1993; SUTTON, JAHN & BRUNGER, 1998). Assim, as proteínas SNARE catalisam a fusão da vesícula sináptica através da formação do complexo que conecta a membrana da vesícula à membrana do terminal (FIGURA 3D e FIGURA 3E). Além das proteínas SNARE, a exocitose sináptica acontece graças a participação das proteínas Sec1/Munc18 (SM) que parecem atuar na organização dos complexos SNARE espaço-temporalmente (SÜDHOF & ROTHMAN, 2009). Dessa forma, seis proteínas formam o cerne da maquinaria de exocitose dependente de Ca^{2+} : três proteínas SNARE (VAMP2, sintaxina 1 e SNAP25), a sinaptotagmina, uma proteína SM (Munc18) e a complexina.

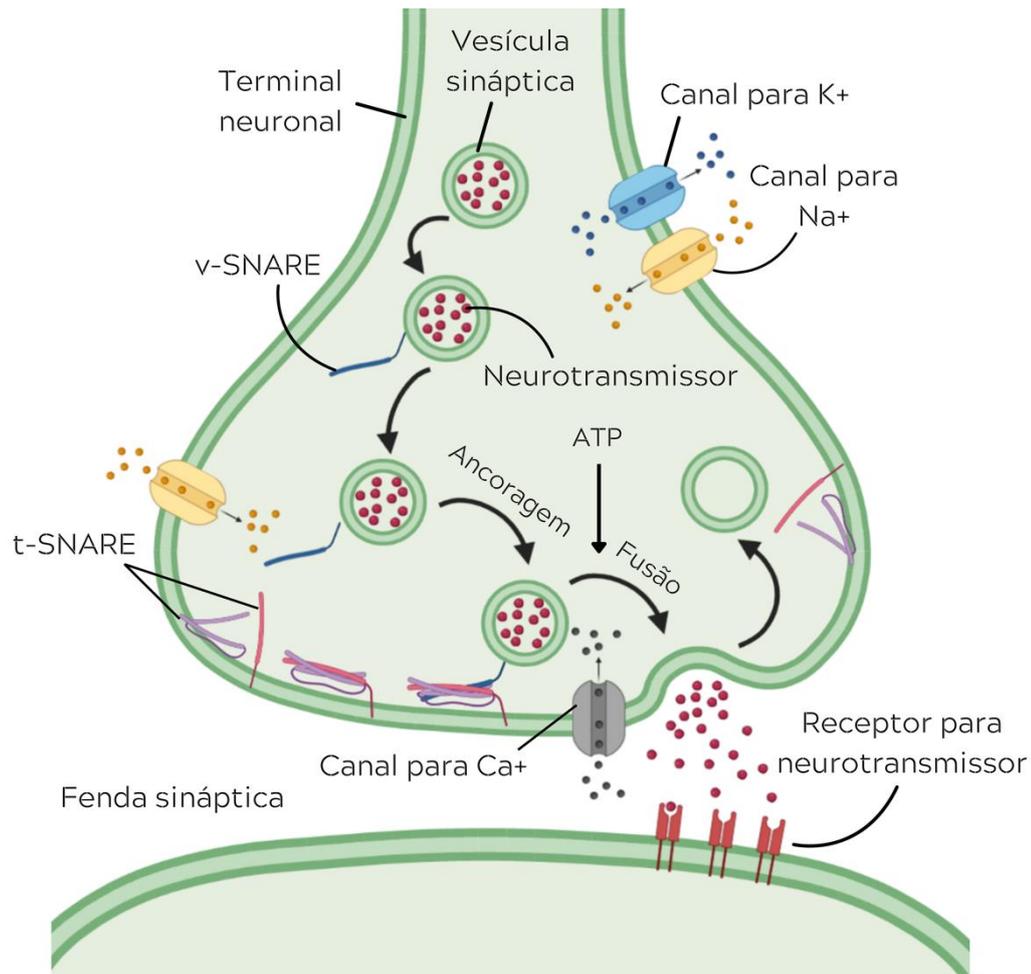


Figura 2- Exocitose de vesículas sinápticas.

O estímulo chega ao neurônio pré-sináptico através do influxo de sódio (Na^+) no terminal que gera uma mudança no potencial de membrana da célula, tornando-o menos negativo e tendendo a valores mais positivos. Essa mudança de potencial abre os canais iônico para e Ca^{2+} sensíveis à voltagem e posteriormente o para potássio (K^+). O influxo de K^+ tem como objetivo o reestabelecimento do potencial de repouso da membrana e o influxo de Ca^{2+} é responsável por desencadear as cascata de sinalização celular responsável pelos processos de exocitose de vesículas sinápticas. A exocitose é um processo dependente de diversas proteínas incluindo as proteínas SNARE. Após a ancoragem das vesículas, fusão e liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica, porções de membranas são endocitadas para a formação de novas vesículas funcionais prontas para serem repletas com neurotransmissores e liberadas novamente. (Modificado de JAHN, R., FASSHAUER, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11320>)

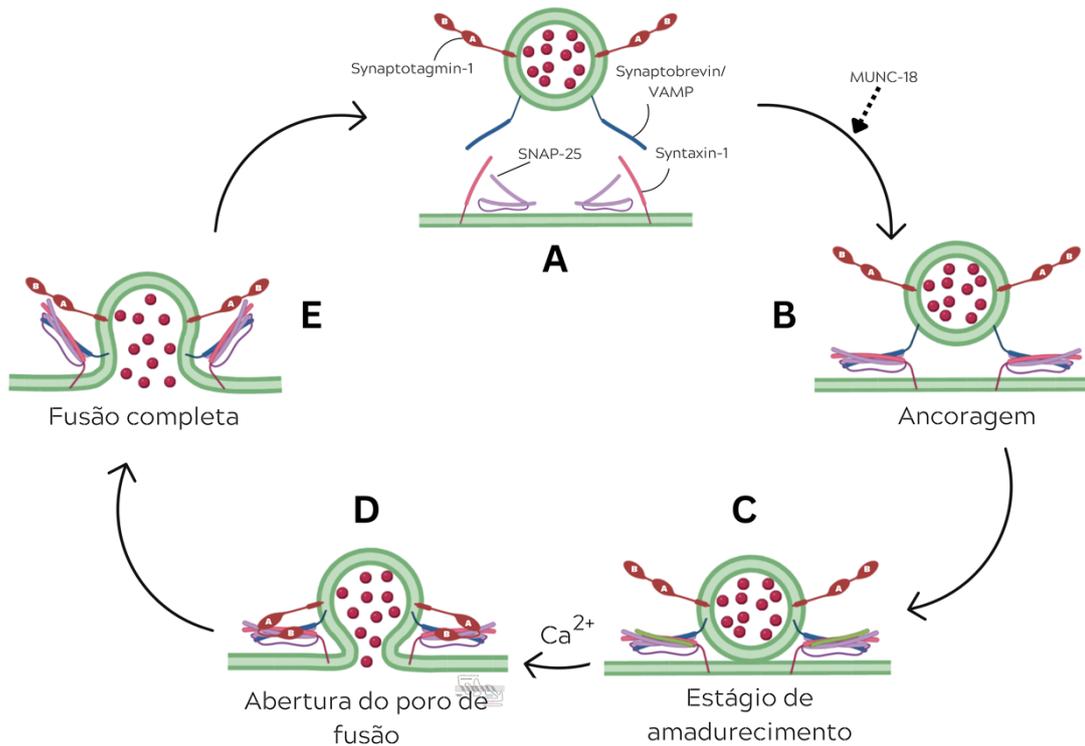


Figura 3- Modelo das principais etapas da exocitose de vesículas sinápticas.

As vesículas sinápticas são ancoradas na zona ativa do terminal pré-sináptico após a despolarização da membrana e influxo de Ca^{2+} . (A) A estrutura de uma vesícula pronta para ser liberada com todas as proteínas envolvidas no processo de exocitose. (B) Ancoragem da vesícula através da formação do complexo SNARE catalisada pela proteína Munc18. (C) As vesículas terminam seu processo de ancoragem com a organização do complexo SNARE pela ligação com as conexinas. (D) Este estágio é sensível ao íon Ca^{2+} gerando a abertura de um poro de fusão. (E) A fusão completa acontece e o neurotransmissor é liberado na fenda sináptica. (Modificado de PANG & SUDHOF. Cell biology of Ca^{2+} -triggered exocytosis. Current Opinion in Cell Biology, Volume 22, Issue 4, August 2010, Pages 496–505.)

Após o processo de exocitose e consequente liberação de neurotransmissor na fenda sináptica, os componentes das vesículas sinápticas são recuperados da membrana plasmática do terminal através de endocitose e são transformados novamente em uma vesícula sináptica funcional (RIZZOLI, 2014). A taxa de endocitose é um fator limitante para a exocitose em sinapses muito estimuladas. A endocitose e reciclagem de vesículas acontece através de três vias: (a) endocitose mediada pela formação da cobertura de clatrina (FIGURA 4A) - o primeiro passo do brotamento da vesícula é a formação de uma invaginação na membrana plasmática do terminal. As clatrininas são proteínas de cobertura que são recrutadas para o sítio de invaginação da membrana e são responsáveis pela estabilização da curvatura e deslocamento para a borda da vesícula em formação (SORKINA *et al.*, 1996). A cobertura de clatrina é composta por estruturas contendo três cadeias pesadas e três cadeias leves da molécula de clatrina, denominada “*triskelia*” (Heuser and Reese, 1973; RIZZOLI, 2014). (b) Endocitose do modelo *kiss-and-run* (FIGURA 4B) - este é um caso especial de fusão de vesículas sinápticas, no qual a vesícula funde-se de forma incompleta e transiente com a membrana plasmática, formando apenas um poro de fusão temporário para liberação do neurotransmissor. Neste modelo de liberação de neurotransmissor, há pouca alteração da estrutura da vesícula em si e ela pode rapidamente ser reciclada e repleta no próprio sítio do poro de fusão (CECARELLI B. 1973, FESCE *et al.*, 1994; ALABI & TSIEN, 2013). (c) endocitose via grande invaginação de membrana e formação de cisterna (FIGURA 4C) - essa via não recupera de forma seletiva as proteínas de vesículas sinápticas, mas serve como uma resposta emergencial para prevenir o colapso da arquitetura pré-sináptica e o bloqueio da neurotransmissão (Richards et al 2000; NICHOLSON-FISH *et al.*, 2015). Esse modelo de endocitose é ativado apenas em situações de intensa atividade neuronal. Nele são gerados endossomos diretamente da membrana plasmática e desses endossomos brotam as vesículas sinápticas (KOKOTOS & COUSIN, 2015).

Após a endocitose, as vesículas sinápticas recém-formadas devem ser repletas com neurotransmissor para estarem preparadas novamente para sofrer exocitose. Independentemente do modelo de endocitose, cada vesícula deve ser recarregada rapidamente (RIVEROS *et al.*, 1986). Os principais componentes responsáveis pelo preenchimento das vesículas são H^+ -ATPase (vATPase) e os transportadores vesiculares de neurotransmissores. A vATPase é um complexo multiprotéico que consiste em um domínio integral V_0 , que transloca prótons através da membrana, e um domínio V_1 periférico responsável pela hidrólise de ATP (STEVENS & FORGAC, 1997; TOEI *et al.*, 2010). Os transportadores vesiculares determinam o conteúdo de neurotransmissor. Estes dois grupos de proteínas medeiam dois

processos distintos: a vATPase gera um gradiente eletroquímico ($\Delta\mu_{H^+}$) através da membrana ao bombear prótons para o lúmen da vesícula; já os transportadores usam deste gradiente para lançar moléculas de neurotransmissor dentro das vesículas sinápticas (BLAKELY & EDWARDS, 2012).

Todo esse ciclo gera vesículas heterogêneas e *pools* funcionais dentro do terminal pré-sináptico. As vesículas são organizadas em quatro *pools* funcionais no terminal pré-sináptico: o *pool* de vesículas prontas para serem liberadas (RRP), o *pool* de reciclagem, o *pool* de reserva e o *pool* de repouso. As vesículas ancoradas localizadas próximas a zona ativa constituem o RRP que está prontamente preparado para fusão com a chegada do potencial de ação (HOLDERITH *et al.*, 2012). Para manter a liberação de neurotransmissores, o RRP deve se manter sempre estocado através do reuso rápido das vesículas ou através do recrutamento de novas vesículas do *pool* de reserva após períodos prolongados de atividade. O *pool* de reciclagem é formado por todas as vesículas que participam da transmissão sináptica dependente de atividade (RRP e uma fração do *pool* de reserva) (DENKER & RIZZOLI, 2010). As demais vesículas sinápticas são chamadas de *pool* de repouso, pois se mostram relutantes a mobilização mesmo após estímulo (CHANADAY & KAVALALI, 2018).

Todos esses passos acontecem nas JNM possibilitando a comunicação entre o sistema nervoso e o sistema músculo esquelético. Após a exocitose e a liberação de ACh na fenda sináptica, ocorre a ativação dos receptores nicotínicos do terminal pós-sináptico presente na membrana das fibras musculares. A ativação dos receptores nicotínicos leva a abertura dos canais para sódio (Na^+) e potássio (K^+), gerando a entrada do sódio e saída do potássio. Essa troca iônica causa a despolarização da membrana do sarcolema e a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. Esse aumento de Ca^{2+} desencadeia os processos de contração muscular. Após a ativação dos receptores, a ACh é hidrolisada em colina e acetato pela ação da enzima acetilcolinesterase (AChE) presente na fenda sináptica. A colina é reciclada para o interior do terminal pré-sináptico através do seu transportador específico de membrana (CHT1) para ser usado novamente na síntese de ACh (BIRKS & MACINTOSH, 1961; COLLIER AND KATZ, 1974).

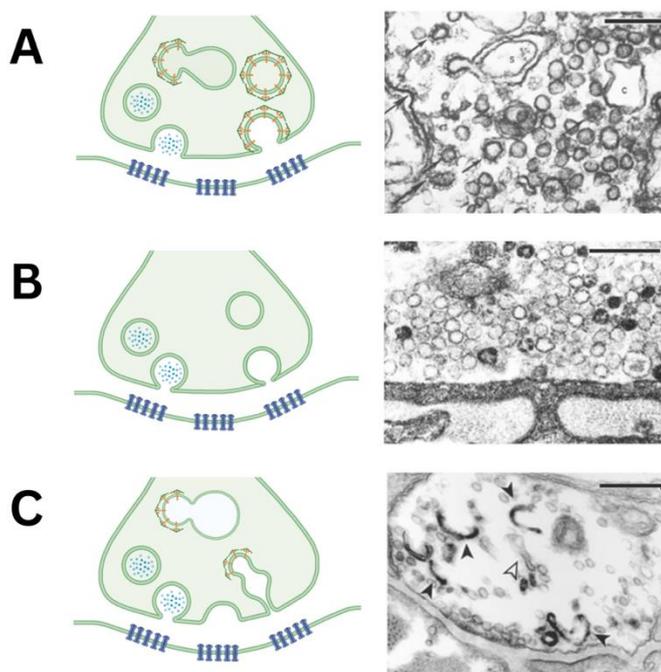


Figura 4- Três modelos para endocitose de vesículas sinápticas.

(A) Modelo representativo de endocitose mediada por cobertura de clatrina (painel à esquerda). Modelo proposto por HEUSER & REESE no qual ocorre a fusão completa das vesículas sinápticas à membrana da zona ativa do terminal pré-sináptico e posteriormente são recicladas com o auxílio de proteínas denominadas clatrina. Micrografia eletrônica (painel à direita) demonstrando a presença de invaginações da membrana recobertas por capa de clatrina (setas) em terminação motora submetida a estímulo elétrico. (B) Modelo representativo de *kiss-and-run* (painel à esquerda) proposto por Ceccarelli no qual não há a fusão completa da vesícula à membrana do terminal, mas apenas a abertura de um poro de fusão transitório pelo qual o neurotransmissor é liberado e a vesícula é rapidamente reciclada no próprio sítio de liberação. Micrografia eletrônica (painel à direita) de terminação motora estimulada eletricamente em baixa frequência durante duas horas. Destaca-se ausência de vesículas recobertas por clatrina e cisternas. (C) Modelo representativo de endocitose via grandes invaginações de membrana e formação de cisternas (painel à esquerda) no qual, sob estímulos intensos, vesículas recobertas por clatrina brotam de grande endossomos. Micrografia eletrônica (painel à direita) mostrando invaginações de membrana contendo FM1-43 fotoconvertido (setas pretas) ou desprovidas do marcador (setas vazadas). (Modificado de TAKEI et al., 1996; RICHARDS et al., 2000) (revisado por ROYLE & LAGNADO, 2003).

1.3 Sistema adrenérgico e o músculo esquelético

Já é bem estabelecido o papel facilitador das catecolaminas, como a epinefrina e a norepinefrina, na performance física através de mecanismos seguramente elucidados. O aumento da frequência cardíaca e da contratilidade do miocárdio, broncodilatação, regulação eletrolítica e redistribuição do fluxo sanguíneo são alguns deles (ZOUHAL *et al.*, 2008; HOSTRUP *et al.*, 2014). No músculo esquelético especificamente, sabe-se que o sistema nervoso simpático é capaz de aumentar a contratilidade através de um efeito inotrópico positivo que aumenta a potenciação da força de pico, e um efeito lusitrópico positivo, facilitando o relaxamento. Os efeitos das catecolaminas liberadas pela medula adrenal ou pelos nervos simpáticos variam em natureza e magnitude de acordo com os tipos de fibras que compõe o músculo, a espécie em questão, a concentração do agente, a condição do músculo, dentre outros (CAIRNS & BORRANI, 2015). A adrenalina e a noradrenalina atuam através da ativação de receptores de membrana acoplados a proteína G (AHLQUIST, 1948). Existem adrenoceptores do tipo α , divididos nos subtipos α_1 e α_2 , e do tipo β , divididos nos subtipos β_1 , β_2 e β_3 (LANDS *et al.*, 1967; GAUTHIER *et al.*, 1996). Os receptores do tipo β são os mais abundantes nos músculos e sua ativação é responsável por todos os efeitos do sistema adrenérgico no músculo esquelético descritos até agora.

Este trabalho trata especificamente do receptor β_2 devido a sua abundância no músculo esquelético e devido a sua íntima relação com as JNMs. Já foi mostrado que a inervação simpática está presente na maior parte das JNMs, através de marcação de imunofluorescência para tirosina hidroxilase (enzima precursora de catecolamina), e que há uma co-localização entre os receptores nicotínicos para acetilcolina e os receptores β_2 do sistema adrenérgico (KHAN *et al.*, 2016). Isto gera a pergunta: qual o papel desse receptor na transmissão colinérgica neuromuscular? Para começarmos nos aproximar da resposta, precisamos conhecer a fundo o receptor β_2 , tanto em relação a sua estrutura quanto a suas funções já elucidadas.

1.3.1 O adrenoceptor β_2

O β_2 é um receptor adrenérgico acoplado a proteína G estimulatória (G_s). Dessa forma, sua estrutura consiste em uma cadeia polipeptídica única de 400-500 resíduos de aminoácidos composta por regiões amino- e carboxi-terminais formando sete domínios α -hélices transmembrana acoplados a uma proteína ligada à molécula GTP (FIGURA 5) (DAAKA, LUTTRELL & LEFKOWITZ, 1997; STROSBURG, 1993). O gene do adrenoceptor- β humano está situado no braço longo do

cromossomo 5 (FIGURA 6) (KOBILKA *et al.*, 1987). As regiões do adrenoceptor- β_2 que são importantes para o acoplamento com seu ligante e sua ativação já foram identificadas. O sítio ativo deste receptor é um resíduo de aspartato 113 (contando a partir da região N-terminal) localizado no terceiro domínio; dois resíduos de serina, 204 e 207, localizados no quinto domínio; e dois resíduos de fenilalanina, 259 e 290, localizados no sexto domínio (FIGURA 6) (STRADER, 1989). O ligante se acopla nas hélices transmembranas em suas regiões hidrofóbicas e se ancora graças a interações moleculares específicas. O aspartato se liga ao nitrogênio, enquanto os dois resíduos de serina interagem com grupos hidroxilas no anel fenólico da molécula β -agonista (STRADER, 1989). Assim, a exposição aos agonistas β leva a uma rápida ativação da proteína G estimulatória e, como resultado, da adenilato ciclase, com o conseqüente aumento dos níveis intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina - 3',5' (cAMP). A ativação da proteína G envolve a dissociação entre suas subunidades α e β - γ . A atividade da adenilato ciclase é aumentada graças a uma ação direta da subunidade α da proteína G na unidade catalítica da adenilato ciclase (NORTHUP *et al.*, 1983).

No músculo esquelético, quando os adrenoceptores- β_2 presentes no sarcolema são ativados, a dissociação das subunidades da proteína Gs ativa a adenilato ciclase que converte ATP em cAMP. Na presença de adrenalina ou de agonistas β_2 , os níveis mioplasmáticos de cAMP aumentam de duas a três vezes em músculos de mamíferos (AL-JEBOORY & MARSHALL, 1978). Este segundo mensageiro é capaz de amplificar o sinal e ativa diversas proteínas quinases dependentes de cAMP (PKA) que fosforilam proteínas alvo para alterar processos celulares (CAIRNS & BORRANI, 2015). A PKA inativa é um tetrâmero formado por subunidades regulatórias e catalíticas. Ao se ligar a cAMP, suas subunidades regulatórias permitem a liberação de suas subunidades catalíticas, que se tornam assim livres para catalisar a fosforilação de resíduos de serina e treonina em diversas proteínas alvo (BRANDON, IDZERDA & MCKNIGHT, 1997). Diferentes isoformas de PKA estão localizadas em microdomínios espaciais distintos, como próximo ao sarcolema, ao túbulo-t e ao retículo sarcoplasmáticos (RÖDER *et al.*, 2009). Essa compartimentalização é importante para o controle dos processos desencadeados pela ativação do adrenoceptor.

A ativação de PKA desencadeia diversos processos intracelulares no músculo esquelético. A adrenalina/agonistas β_2 estimula a atividade do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC). A atividade de NKCC influencia nas concentrações iônicas e potencial de membrana fisiológicos de todas as células musculares (WONG *et al.*, 2001). Além disso, os adrenoceptores possuem outro efeito nos níveis iônicos intracelulares através da sua atuação na bomba de Na^+/K^+ . PKA é capaz de fosforilar um de seus componentes regulatórios aumentando a afinidade intracelular por Na^+ . O músculo esquelético perde potássio para o meio extracelular durante a contração muscular graças à inabilidade

da bomba de Na^+/K^+ de neutralizar o fluxo iônico através da membrana durante a propagação dos potenciais de ação. O aumento da concentração extracelular de potássio diminui a excitabilidade da célula. A presença da epinefrina é capaz de potencializar a atividade da bomba de Na^+/K^+ e, assim, atenuar a fadiga muscular (CLAUSEN, 2003). O sistema adrenérgico também tem grandes impactos nos níveis de Ca^{2+} intracelular das fibras musculares através de diferentes mecanismos, sendo eles: (1) facilitação do esvaziamento de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático através da ativação da fosfolambano, proteína associada à bomba de Ca^{2+} do retículo; (2) ativação do canal de Ca^{2+} presente na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (RUDOLF *et al.*, 2006); (3) ativação de canais de Ca^{2+} localizados nas membranas dos túbulos-t (DHPR) (GARCIA *et al.*, 1990). Todos estes processos que possuem influência no balanço iônico das fibras musculares culminam em uma maior força de contração e um efeito inotrópico positivo (FIGURA 7).

Além das implicações nos níveis iônicos intracelulares, a ativação do adrenoceptor β_2 possui efeitos diretos no metabolismo proteico das fibras musculares esqueléticas. Já foi observado um aumento da degradação proteica muscular causada por simpatectomia química induzida por guanetidina, sendo este um indício da importância do tônus adrenérgico para o controle da proteólise (NAVEGANTES *et al.*, 1999). Existem diversos sistemas encarregados pela proteólise nas células musculares e por garantir o balanço adequado entre a síntese e a degradação de proteínas em uma célula em homeostase. As proteinases dependentes de Ca^{2+} , denominadas calpaínas, juntamente com seu inibidor específico, a calpastatina, constituem um destes sistemas proteolíticos altamente regulado (MURACHI, 1989; JOHNSON, 1990). BARDSLEY *et al.* (1991) mostram que a administração de agonistas β_2 gera um aumento da atividade da calpastatina. Isto nos indica que a ativação do sistema adrenérgico via receptor β_2 é capaz de suprimir a proteólise dependente de Ca^{2+} . Outro mecanismo proteolítico que desempenha um papel importante no músculo esquelético é o sistema ubiquitina/proteassoma. Neste, a ubiquitina é ativada e transferida a um substrato através de uma cascata enzimática, onde atua como um marcador. Assim que reconhecida pelo proteassoma, as cadeias da ubiquitina são removidas e recicladas e o substrato é clivado (BILODEAU, COYNE & WING, 2016). YINLAMAI *et al.* (2005) demonstrou que a administração do clenbuterol, um fármaco agonista específico β_2 , foi capaz de reduzir os níveis de conjugados de ubiquitina no músculo esquelético que passou por um protocolo de desgaste. Estes resultados foram corroborados por GONÇALVES *et al.* (2011), no qual, além do sistema ubiquitina-proteassoma, o clenbuterol inibe um terceiro mecanismo proteolítico, a proteólise lisossomal. Neste último sistema, um lisossoma é formado, e em seu lúmen preenchido por enzimas proteases, acontece a quebra das proteínas. Estes

dados mostram um claro papel do adrenoceptor β_2 na proteólise total do músculo, tendo impactos em diversos sistemas proteolíticos diferentes.

Além da inibição da degradação proteica, os efeitos anabólicos do β_2 no músculo são também devido a estimulação da síntese proteica. GONÇALVES *et al.* (2019) esclarece que a sinalização de insulina/IGF-1, ativada via a administração de Formoterol, possui um papel crucial na regulação da proteostase no músculo esquelético. Uma única injeção deste agonista- β_2 altamente seletivo gerou uma ativação de Akt e ERK1/2 que são os maiores sinais anabólicos intracelulares da cascata de insulina/IGF1. Os efeitos da ativação do β_2 na síntese proteica foi dependente do estado alimentado dos murinos testados, já que não houve aumento no contexto em jejum. O efeito estimulatório de Akt via agonistas β_2 é mediado através do acoplamento direto do adrenoceptor a uma proteína Gs (OHNUKI *et al.*, 2014). A ativação de Akt induz a ativação do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e esta via estimula a tradução e síntese proteica (BODINE *et al.*, 2001; ROMMEL *et al.*, 2001). Dessa forma, a estimulação do adrenoceptor β_2 acoplado a proteína Gs aumenta a produção de cAMP, ativa a adenilato ciclase e, por fim, aumenta a fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB). CREB está envolvido na ação hipertrófica dos agonistas β_2 , já que animais mutantes CREB *null* apresentam defeitos miogênicos severos (CHEN *et al.*, 2005). Esses estudos mostram a importância deste fator de transcrição na regulação da expressão gênica no músculo esquelético. Já foi mostrado que CREB interage com a proteína determinadora de mioblasto 1 (MyoD) no promotor da folistatina promovendo sua expressão (LEZZI *et al.*, 2004). A folistatina é conhecida por induzir a hipertrofia muscular por atuar como um antagonista da miostatina (GILSON *et al.*, 2009). Além disso, o uso de agonistas β_2 aumentou a expressão do receptor ativado proliferador de peroxissomo- γ (PPAR γ) co-ativador 1 α (PGC-1 α) 1 que também gera hipertrofia (KOOPMAN *et al.*, 2010; PEAREN *et al.*, 2008). PGC-1 α 1 diminui a perda de massa muscular através da interação com o fator de transcrição de FoxO3, reduzindo a capacidade de FoxO3 de transcrever os promotores das ubiquitina-ligases MAFbx/atrogin-1 e MuRF1 (BRAULT *et al.*, 2010; SANDRI *et al.*, 2006). Os efeitos hipertróficos induzidos por formoterol também foram associados a um crescimento específico de determinados tipos de fibras, principalmente das fibras glicolíticas rápidas do tipo IIB (Gonçalves *et al.*, 2019).

Diretamente associado à ativação do adrenoceptor β_2 , está o processo autorregulatório de dessensibilização que atua para evitar a superestimulação. A dessensibilização ocorre através do desacoplamento entre os receptores e a adenilato ciclase, da internalização de receptores e da fosforilação de receptores internalizados, através da β -adrenoceptor quinase (β ARK) e receptores acoplados a proteína G quinase (GRKs) (JOHNSON, 2001).

Os efeitos dos adrenoceptores- β_2 são há muitos anos estudados nos mais diversos sistemas do nosso corpo e, mais recentemente, vemos importantes impactos no músculo esquelético. Ao longo do tempo, foram elucidados alguns dos mecanismos da ativação dos receptores β_2 no que diz respeito ao mecanismo proteico mas ainda há muito a descobrir sobre o possível papel que esses receptores desempenham na transmissão colinérgica muscular como um todo. Ainda há muito a ser elucidado sobre os efeitos da ativação do β_2 no terminal pré-sináptico dos nervos motores levando em conta a íntima relação entre esses receptores e as JNMs.

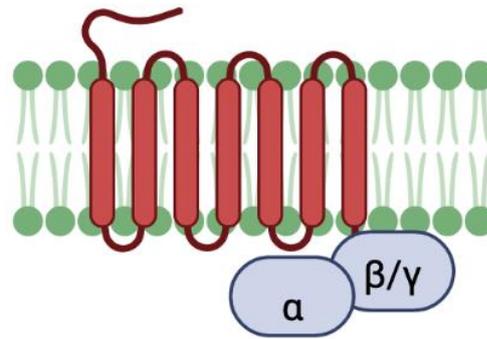


Figura 5- Representação esquemática do adrenoceptor- β_2 .

Esquema mostrando a estrutura básica do adrenoceptor- β_2 com suas sete α hélices transmembranares acopladas a uma proteína G que possui as subunidades β/γ e a subunidade α .

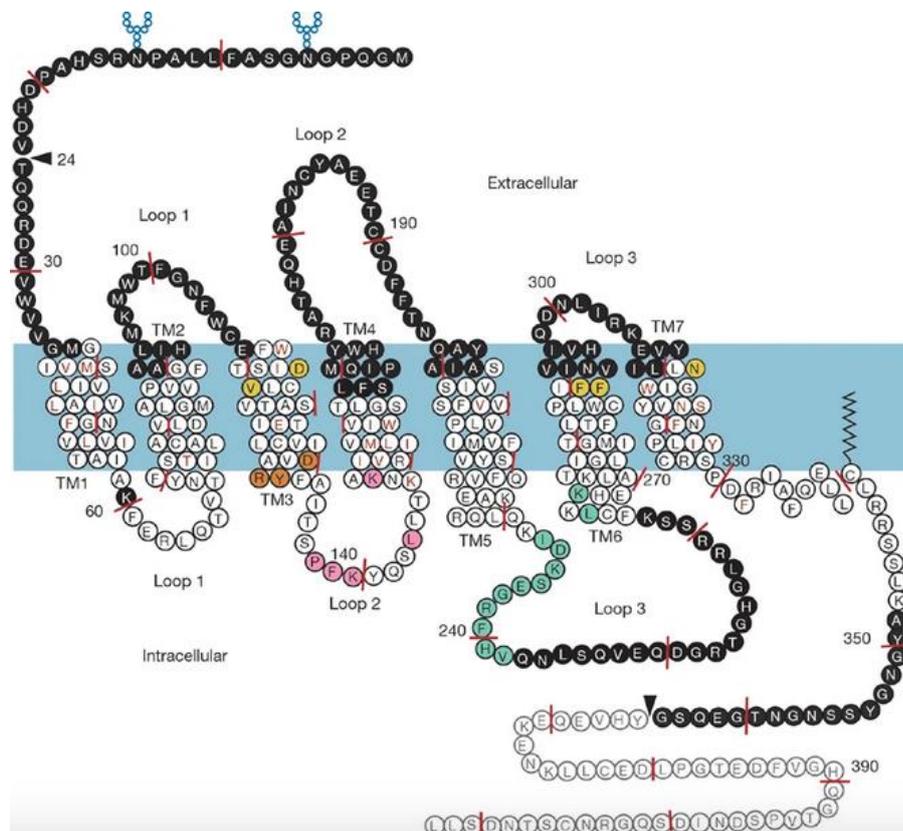


Figura 6– Sequência de aminoácidos e topologia do adrenoceptor β_2 em humanos.

Círculos pretos com letras brancas indicam resíduos desordenados não incluídos no modelo. Letras e círculos cinza indicam resíduos não incluídos na construção do receptor usada para cristalografia. As letras vermelhas indicam aminoácidos para os quais a densidade eletrônica da cadeia lateral não

foi modelada. Resíduos amarelos indicam aminoácidos implicados no acoplamento de ligantes em estudos de mutagênese. Resíduos laranja indicam a sequência DRY conservada. Os resíduos verdes formam o epítipo Fab5 e os resíduos rosa são empacotados contra o domínio constante Fab5. Pequenos círculos azuis indicam locais de glicosilação. As linhas vermelhas indicam incrementos de dez aminoácidos. (Rasmussen, S., Choi, HJ., Rosenbaum, D. *et al.* Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387 (2007). <https://doi.org/10.1038/nature06325>)

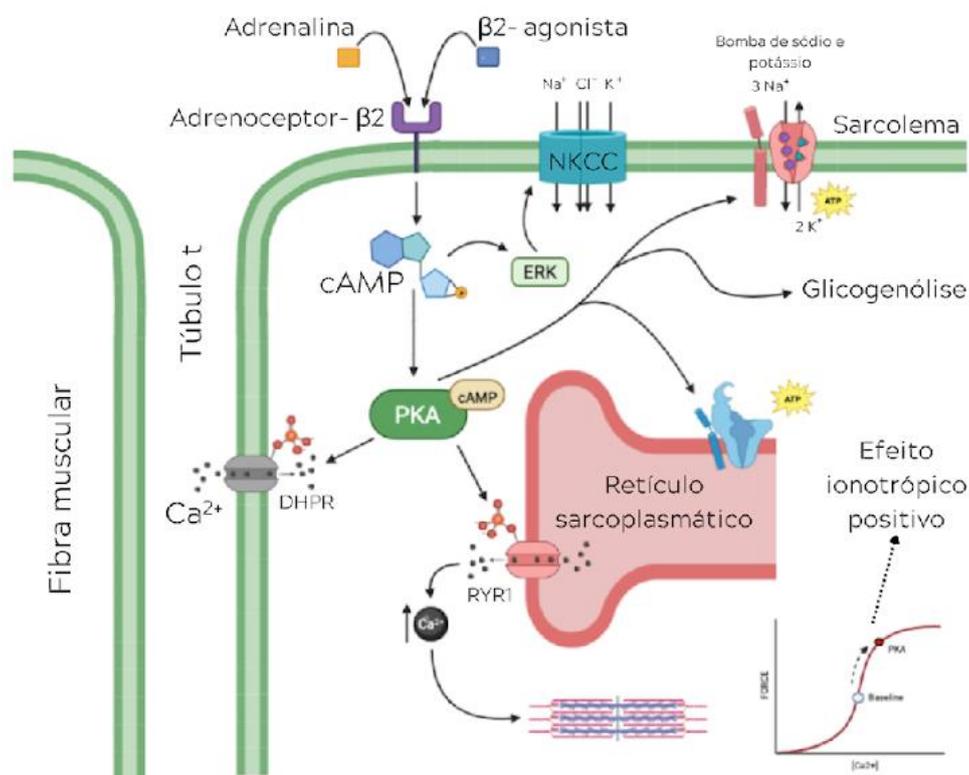


Figura 7- Adrenoceptor - β_2 no músculo esquelético.

A ativação do receptor β_2 na junção neuromuscular através da interação com a adrenalina ou com agonistas desencadeia uma cascata intracelular. Ocorre o aumento dos níveis de cAMP que ativa PKA. PKA é uma proteína que possui efeitos diversos na célula, dentre eles abertura dos canais para cálcio DHPR, aumento da liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, glicogenólise e aumento da atividade da bomba de sódio e potássio. Dessa forma, a ativação do receptor β_2 no músculo esquelético gera um efeito inotrópico positivo com o aumento da força de contração. (Modificado de CAIRNS, SIMEON P.; BORRANI, FABIO. β -Adrenergic modulation of skeletal muscle

contraction: key role of excitation-contraction coupling. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 593, n. 21, p. 4713-4727, 29 out. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jp270909>.

1.3.2 O adrenoceptor- β_2 na junção neuromuscular

A transmissão na JNM é mediada por um terminal nervoso que libera ACh que se liga nos seus receptores específicos na superfície de células musculares, ativando canais de Na^+ sensíveis à voltagem e dando início a um potencial de ação. Essa cascata de processos fisiológicos é alterada em diversas síndromes neuromusculares, como as miastenias. Nos últimos anos, tem sido reportado na literatura melhoras clínicas na transmissão neuromuscular em resposta ao tratamento com agonistas seletivos do adrenoceptor- β_2 (MCMACKEN *et al.*, 2018; CRUZ *et al.*, 2018; CLAUSEN *et al.*, 2018; LYNCH). CLAUSEN *et al.* (2018) demonstrou através de agrupados de receptores para ACh formados em cultura de células, que a administração de salbutamol é capaz de aumentar significativamente estes agrupados de receptores. Em condições fisiológicas, os receptores para ACh são formados no músculo como resultados de uma complexa cascata de sinalização, na qual agrina, MuSK e DOK7 são moléculas chave. *In vitro*, o terminal pré-sináptico e os componentes da matriz extracelular estão ausentes. Dessa forma, a complexa comunicação entre o pré- e o pós-sináptico não acontece. Entretanto, este modelo de cultura de células musculares é bem aceito e é um grande indício dos efeitos da ativação do adrenoceptor- β_2 diretamente na placa motora e possível alvo de tratamento para doenças caracterizadas pela disrupção da estrutura da placa motora. Existem estudos, utilizando *zebrafish* como modelo, que nos dão indícios de que há um papel importante do receptor- β_2 na modulação da formação da placa motora durante o desenvolvimento (MCMACKEN *et al.*, 2018). Além disso, uma simpatectomia revelou uma diminuição do tamanho das JNMs sem alteração na co-localização entre terminal pré- e pós-sináptico.

Os efeitos dos agonistas- β_2 na placa motora têm sido atribuídos primariamente a modulação pós-sináptica, mas uma potencial ação pré-sináptica ainda não foi completamente explorada. Existem alguns estudos na literatura que indicam alterações eletrofisiológicas causadas pela administração de agonistas β_2 . RODRIGUES *et al.* (2019), mostrou que tanto o salbutamol quanto o clenbuterol são capazes de aumentar a frequência de MEPP e o conteúdo quântico de EPP. Ainda reportaram que este efeito é dependente dos canais para Ca^{2+} do tipo P/Q. Ainda assim, precisamos entender como estes resultados nos ajudam a elucidar a relação entre os neurônios motores e neurônios simpáticos na JNM, entender completamente o efeito do adrenoceptor- β_2 na liberação de vesículas sinápticas no músculo esquelético e se estes agentes simpatomiméticos podem ser usados para o tratamento de doenças caracterizadas pela transmissão neuromuscular prejudicada.

1.3.3 Os simpatomiméticos agonistas β_2 gerais

Os agonistas β possuem uma estrutura semelhante à da adrenalina para que possa haver a interação com os sítios ativos dos receptores. Todos os β -agonistas possuem um centro assimétrico devido a presença de um grupo β -OH. Este centro assimétrico resulta em moléculas que são pares de isômeros ópticos, conhecidos como enantiômeros R e S. Alguns agonistas, como o fenoterol, procaterol e formoterol, possuem dois centros assimétricos, produzindo assim quatro enantiômeros. Entretanto, as reações de ligação são estereoespecíficas e são predominantemente nos enantiômeros R (JOHNSON, 2001). No salbutamol, os enantiômeros R são pelo menos 100 vezes mais potentes que os enantiômeros S. Já no formoterol, a diferença entre as formas RR e SS é de mais de 1000 vezes (JOHNSON, BUTCHERS, COLEMAN, 1993).

A função de um agonista é definida por parâmetros como afinidade e eficácia. A afinidade depende da força com a qual o agonista se liga ao receptor. Essa força varia bastante entre os agonistas do mesmo receptor. O salbutamol possui uma afinidade relativamente baixa para adrenoceptores β_2 , enquanto o formoterol possui uma afinidade quatro vezes maior. Já a eficácia é outro parâmetro que modula a atividade do agonista no corpo e varia de acordo com a densidade de receptores e com capacidade de um acoplamento adequado. Agonistas ditos como completos são capazes de mover o equilíbrio completamente para o estado de ativação dos receptores, possuindo assim uma alta eficácia. A maior parte dos agonistas possuem uma afinidade intermediária e o número de receptores permitirá que eles ajam como agonistas completos (JOHNSON, 2001). A dessensibilização dos receptores é outro aspecto relacionado à eficácia do agonista, já que um agonista parcial estaria menos susceptível a induzir uma dessensibilização que um agonista completo (JOHNSON, BUTCHERS, COLEMAN, 1993; JOHNSON & COLEMAN, 1995).

Os agonistas β_2 foram inicialmente desenvolvidos para facilitar a broncodilatação e são classicamente usados na clínica para o tratamento de asma (SOLIS-COHEN, 1900). Entretanto, nas últimas décadas ficaram claros os seus efeitos no músculo esquelético e estes simpatomiméticos começaram a ser estudados na perda de massa muscular em diversos modelos animais. Alguns agonistas estão sendo testados na clínica como possível estratégia terapêutica para o tratamento de doenças neuromusculares (MARTUNEAU *et al.*, 1992; KISSEL *et al.*, 2001; FOWLER *et al.*, 2004). Mas para que esta classe de fármacos seja de fato consolidada como tratamento de doenças neuromusculares, é necessário compreender a fundo seus efeitos. Alguns mecanismos desencadeados

pela ativação do β_2 no músculo esquelético propriamente dito já foram elucidados, entretanto muito pouco se sabe sobre estes efeitos no nervo motor e no terminal pré-sináptico.

1.3.4 O simpatomimético Fumarato de Formoterol

O simpatomimético fumarato de formoterol é um análogo de catecolamina que atua como um inovativo agonista do adrenoceptor- β_2 . Possui alta seletividade para adrenoceptores- β_2 , um início de reação rápido e uma duração de ação de no máximo 12 horas, com um ótimo perfil de segurança e tolerabilidade (HEKKING *et al.*, 1990; PAUWELS, 1990). Este simpatomimético é um derivado de feniletanolamina cuja estrutura está esquematizada na FIGURA 8. Na clínica, a formulação usada é um diastereômero puro dos enantiômeros RR e SS de 2-hidroxi-5-[(1RS)-1-hidroxi-2-][(1RS)-2-(p-metoxifenil)-1-metiletilamino] paramanilida preparada como sal de fumarato diidratado. Formoterol é moderadamente lipofílico, mas solúvel em água em pH fisiológico (ANDERSON, 1993). Classicamente associado ao tratamento de asma, no presente trabalho é utilizado como ferramenta para o estudo dos efeitos da ativação do adrenoceptor β_2 nas JNM diafragmáticas de camundongos.

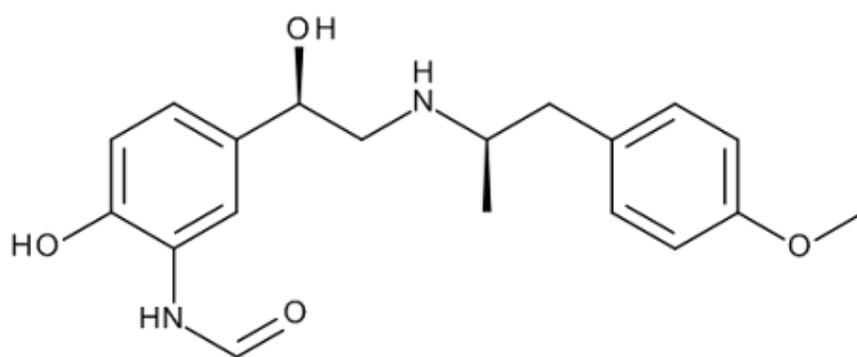


Figura 8- Estrutura química do simpatomimético fumarato de formoterol.

(Modificado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação do (s) possível (is) efeito (s) pré-sináptico (s) do fármaco simpatomimético agonista β_2 específico fumarato de formoterol na transmissão neuromuscular de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do fármaco simpatomimético fumarato de formoterol na exocitose espontânea de vesículas sinápticas na junção neuromuscular, através da ativação dos receptores β_2 presentes na placa motora;

- Investigar o efeito do formoterol na exocitose induzida por estímulos despolarizantes dependentes de Na^+ na JNM;

- Investigar o papel do Ca^{2+} extracelular e dos subtipos de canais iônicos para Ca^{2+} no efeito da ativação dos receptores β_2 nas JNMs.

- Comparar o efeito do formoterol nas junções neuromusculares entre machos e fêmeas.

-Caracterização ultraestrutural do efeito da ativação do adrenoceptor- β_2 nas JNMs

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste estudo, utilizamos camundongos machos e fêmeas da linhagem C57 com idade média de 3 meses. Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBio) da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com o protocolo CETEA-UFMG 81-2021.

Além disso, foram utilizados como controle animais da linhagem C57BL/6J com expressão depletada do adrenoceptor β_2 (β_2 KO) na idade adulta (3 meses), geradas por CHURUSCINSKI *et. al.* (1999) através da técnica de *targeting gene* que inativou seletivamente o gene do adrenoceptor- β_2

em camundongos. Os animais encontram-se no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG e estão sob a responsabilidade da Profa. Silvia Guatimosim Fonseca.

3.2 Soluções

-Solução Ringer:

Composição: 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.

- Solução Ringer modificada (sem Ca²⁺):

Composição: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 3mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4.

- Solução Ringer Alto Potássio (60 mM):

Composição: 80 mM NaCl, 60 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 11 mM D-glicose, com pH em 7.4.

- Solução aquosa de Fumarato de Formoterol:

O simpatomimético Fumarato de Formoterol Di-hidratado (Sigma-Aldrich ®) foi obtido de forma liofilizada. Os 10 mg do frasco foram dissolvidos em 500 µL de DMSO e, posteriormente, diluídos em solução salina. Obtivemos um volume final de 11,9 mL a uma concentração de 2000µM. Em seguida, essa solução foi separada em alíquotas de 10µL e 100µL e estocadas a -20° C. Em nosso protocolo experimental, uma alíquota contendo nossa solução estoque é diluída em mouse Ringer com o objetivo de se alcançar as diferentes concentrações testadas nos experimentos subsequentes de microscopia de fluorescência.

3.3 Reagentes e toxinas

- FM1-43 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA);
- ω-Agatoxina IVA (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA));
- EGTA (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA));
- Toxina d-Tubocurarine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.4 Marcação e monitoramento de vesículas sinápticas com a sonda fluorescente FM1-43

O monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas pode ser feito através do uso de sondas fluorescentes que são internalizadas durante a endocitose e liberadas durante a exocitose.

(LICHTMAN et al., 1985; BETZ, MAO, BEWICK, 1992; RIBCHESTER, MAO, BETZ, 1994). Dessa forma, as sondas fluorescentes são uma ferramenta importante na neurociência que nos permite visualizar e quantificar a exocitose e a reciclagem de vesículas em um terminal nervoso.

Dentre as diversas sondas disponíveis, existem as sondas do tipo FM, como o FM1-43, que são moléculas como uma estrutura semelhante a um lipídio de membrana. Assim, possuem estruturas anfipáticas com uma cabeça polar carregada positivamente e uma cauda lipofílica (FIGURA 9A). A cabeça polar impede que a sonda atravesse passivamente a membrana plasmática. Quando um tecido é colocado em um meio contendo o FM1-43 toda superfície de membrana exposta é marcada, entretanto, devido a sua estrutura, a sonda se mantém exclusivamente no folheto externa da bicamada lipídica da membrana plasmática. Dessa forma, as vesículas em processo de reciclagem aprisionam a sonda em seu interior. Como as sondas do tipo FM1-43 são 350 vezes mais fluorescentes quando em ambiente hidrofóbico de membrana do que em meio aquoso (BETZ et al., 1996; BRUMBACK et al., 2004), a fluorescência representa as vesículas no terminal pré-sináptico que foram capazes de capturar o marcador em seu processo de endocitose compensatória (FIGURA 9B). Assim, o protocolo de marcação com FM1-43 envolve dois ciclos de exocitose: o primeiro para induzir a endocitose compensatória e o segundo para a quantificação da exocitose de vesículas sinápticas a partir do decaimento da fluorescência.

Em nossos experimentos, o músculo diafragma associado ao nervo frênico foi isolado de animais da linhagem C57 de 3 meses. Esse músculo foi seccionado no meio, resultando em dois hemidiafragmas que foram montados em placas cujo fundo era coberto gel de silicone Sylgard®, fixados com alfinetes entomológicos micro sem cabeça e banhados em solução Ringer, pH em 7.4, e aerada com uma mistura de 5% CO₂/ 95% O₂. Essas preparações passaram pelo protocolo de marcação do FM1-43 que inclui a exposição do tecido a um meio contendo o marcador e a estimulação das JNMs através de uma solução Ringer alto K⁺ que possui KCl a uma concentração de 60mM. A associação da sonda com a membrana é reversível. Dessa forma, o último passo do protocolo é a lavagem do tecido em um meio sem FM1-43 com o objetivo de retirar o excesso de marcador das membranas e da mielina dos nervos, garantindo que a fluorescência seja apenas das vesículas que foram capazes de internalizar o corante. Em seguida, esses músculos são levados ao microscópio de fluorescência e uma segunda etapa de estimulação é feita com o objeto de estudo. O decaimento da fluorescência é consequência das vesículas sinápticas que sofreram exocitose e liberaram o FM1-43, que estava em suas membranas, para um meio aquoso, fazendo com que a sonda perca sua capacidade fluorescente. Em todas as fases do processo, os tecidos foram incubados com

d-tubocurarina (16 μM) que é um bloqueador de receptor nicotínico de ACh, com o objetivo de evitar contrações musculares durante a estimulação, desmarcação e aquisição de imagens.

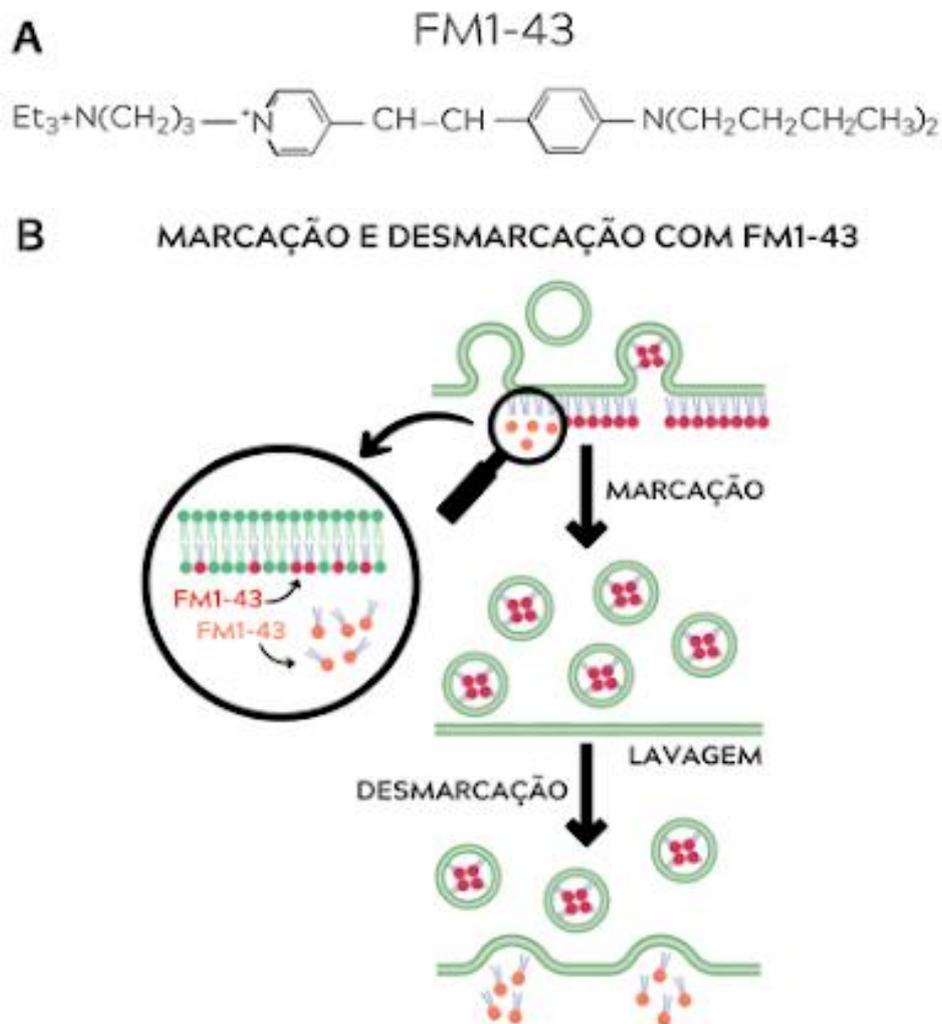


Figura 9- A sonda fluorescente FM1-43 é utilizada para o monitoramento do ciclo de vesículas sinápticas.

(A) Estrutura química da sonda fluorescente FM1-43 (Modificado de Basic Neurochemistry, seventh edition. Edited by SIEGEL et. al., 2006) (B) Imagem esquemática mostrando a exposição das membranas do terminal pré-sináptico a um meio composto de solução salina e FM1-43. A preparação foi estimulada para que as vesículas sofressem exocitose e, conseqüente, reciclagem. Em maior aumento, vemos que a sonda no meio externo aquoso não possui fluorescência devido a seu baixo rendimento quântico, podendo ser só visualizada quanto aderida à membrana. As novas vesículas formadas pelo processo de reciclagem já estão marcadas com a sonda fluorescente. Uma

lavagem em meio desprovido de corante retira o seu excesso das membranas das células musculares e nervosas e da mielina dos nervos. Um segundo ciclo de excitação resulta na liberação da sonda que foi internalizada durante a endocitose. (Modificado de GUATIMOSIM and VON GERSDORFF. Optical monitoring of synaptic vesicle trafficking in ribbon synapses. *Neurochemistry International* Volume 41, Issue 5, November 2002, Pages 307–312) (A) American Society for Neurochemistry. 2006).

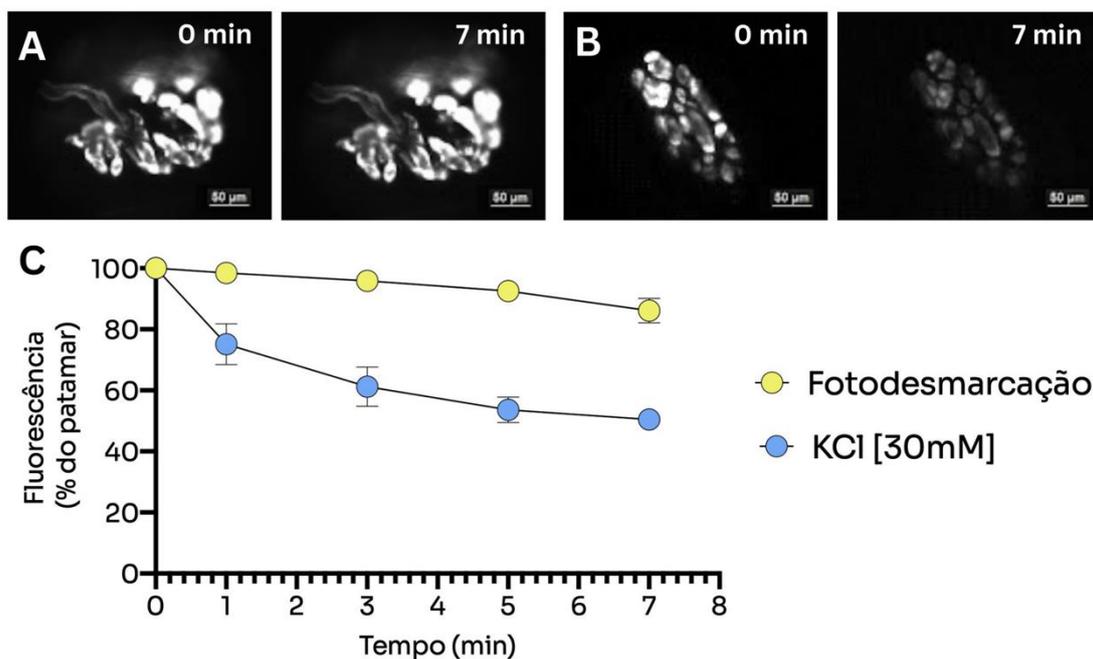


Figura 10- Junções neuromusculares contendo vesículas marcadas com a sonda fluorescente FM1-43.

(A) Imagens representativas de uma terminação nervosa motora diafragmática marcada com FM1-43 submetida à fotodesmarcação, que é o controle da perda natural da fluorescência devido a exposição à luz em um contexto sem estímulos durante sete minutos. À esquerda: imagem no tempo 0 mostrando a fluorescência inicial; à direita: fluorescência após sete minutos. (B) Imagens representativas de uma JNM estimulada com Ringer alto K⁺. À esquerda: imagem da fluorescência inicial tirada no tempo 0; à direita: imagem representando a queda da fluorescência após sete minutos de estímulo com KCl a uma concentração de 60mM. (C) Quantificação da perda de sinal fluorescente devido a fotodesmarcação (~10%) e ao estímulo com KCl (~50%). 20 pontos fluorescentes analisados para cada grupo experimental.

3.5 Exposição dos tecidos marcados com a sonda ao simpatomimético Formoterol

As preparações nervo-músculo marcadas com FM1-43 foram incubadas na presença do simpatomimético Fumarato de Formoterol nas concentrações de 0,01 μM , 0,1 μM , 0,25 μM , 1 μM , 10 μM e 50 μM com o objetivo de construir uma curva-dose resposta.

3.6 Aquisição e análise das imagens marcadas com FM1-43

As imagens foram adquiridas (Leica DM 2500) acoplado a uma câmera CCD Micromax refrigerada (-20 °C) Leica DFC345FX nos tempos 0, 1, 3, 5 e 7 minutos após a exposição ao fármaco. A aquisição foi feita através do programa Leica Application Suite 4.0 que permite o ajuste do ganho e tempo de exposição para que os parâmetros fiquem adequados evitando saturações e distorções na análise. Foi utilizada uma lente objetiva de imersão com aumento de 63X e abertura numérica de 0,95. O fluóroforo foi excitado por uma lâmpada HXP R120/45C – VIS e filtrada (505/530nm) para selecionar o comprimento de onda excitação(488nm) /emissão (505-530nm) adequado ao marcador FM1-43. Todas as variáveis de ajuste de imagem foram mantidas constantes. Todos os experimentos possuem no mínimo três réplicas. As imagens foram analisadas e os níveis de fluorescência mensurados utilizando o programa Fiji ImageJ.

3.7 Análise estatística dos experimentos com FM1-43

Os dados obtidos através do ImageJ foram normalizados percentualmente utilizando o Microsoft Excel e convertidos em representações gráficas utilizando o GraphPad Prism 9.0. As diferenças estatísticas foram checadas através do teste t-student e ANOVA para a comparação dos dados de regressão não-linear. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para os experimentos de avaliação no plano ultra estrutural das junções neuromusculares, camundongos C57 de 3 meses tiveram seu diafragma isolado associado ao nervo frênico. Esses tecidos foram montados utilizando alfinetes entomológicos micro sem cabeça em placas com o fundo coberto por silicone Sylgard®. Em seguida, as preparações foram incubadas em uma solução de Formoterol 10 μ M por sete minutos. Nesses experimentos, usamos como controle positivo preparações que foram expostas a solução Ringer alto K⁺ [60 mM] para serem parâmetro de uma JNM que foram sofrerem um estímulo já conhecido. Após a exposição ao Formoterol ou ao Ringer alto K⁺, as preparações foram imediatamente fixadas por imersão em solução de tampão de cacodilato de sódio 0,1M, contendo paraformaldeído 4,0% e glutaraldeído 2,5% (pH 7.4) (solução fixadora de Karnovsky modificada) gelados na tentativa de interromper imediatamente qualquer atividade sináptica. Os tecidos foram mantidos em solução fixadora por pelo menos 12h à temperatura de 4°C. Após a fixação, os músculos foram recortados em fragmentos de 3mm de comprimento cada próximo à ramificação principal do nervo frênico (FIGURA 11). Esses fragmentos foram mantidos em solução de tampão cacodilato de sódio 0,1M até a segunda fase de processamento.

Em seguida, as amostras passaram pela fase de contrastação em bloco com acetato de uranila (UA, 2% em água deionizada). Houve uma lavagem em água deionizada por 10 minutos em temperatura ambiente e uma desidratação em uma série ascendente de etanol (35, 50, 70, 85, 95 e 100%) e acetona absoluta em temperatura ambiente. O próximo passo foi a pré-infiltração em resina Epon diluída em acetona nas proporções 1:2, 1:1 e 2:1 na ausência do polimerizador. Os fragmentos foram então infiltrados e incluídos na resina com o polimerizador DPM-30 por duas horas em temperatura ambiente, uma hora em estufa de 40°C e 48 horas em estufa de 60°C. Com as amostras já nos blocos de resina, foi realizada a microtomia com navalha de vidro gerando cortes de 300 nm de espessura. Em seguida, foi realizada a ultramicrotomia com navalha de diamante gerando cortes de 50 nm de espessura que foram montados em grades de cobre de 200 ou 300 *mesh* e para a coleta das seções seriada foram utilizadas telas de cobre sem grades cobertas com películas de formvar. As grades foram contrastadas com citrato de chumbo (solução de Reynolds) para posterior imageamento. Todos os passos dessa segunda fase do processamento de amostras para microscopia eletrônica de transmissão foram realizados no Centro de Microscopia da UFMG.

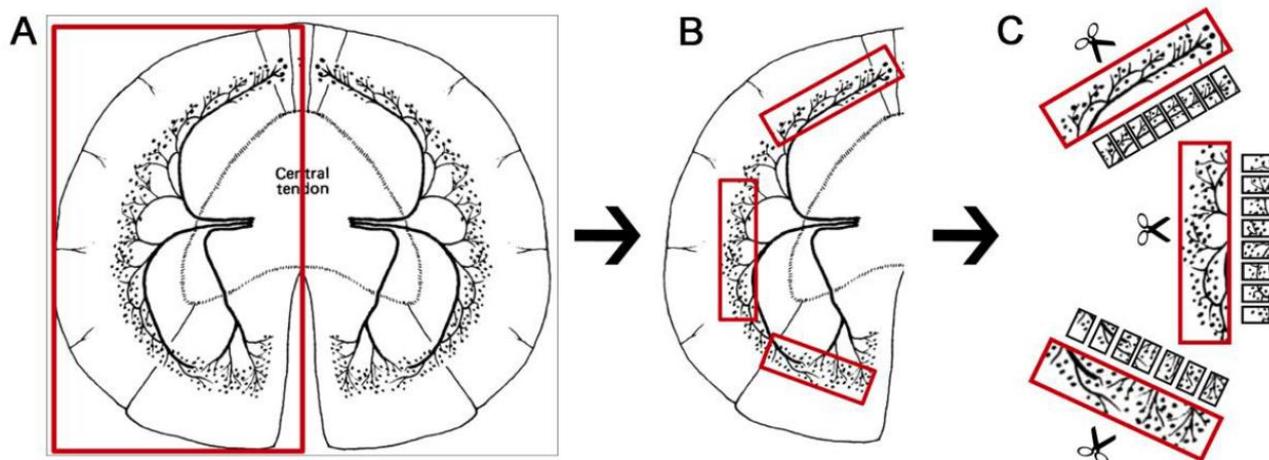


Figura 11- Representação esquemática ilustrativa do modo de obtenção dos fragmentos de diafragma fixados para os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

(A) Representação do músculo diafragma evidenciando a inervação bilateral pelo nervo frênico. O músculo é dividido ao meio, sendo cortado no centro tendíneo e formando assim dois hemidiafragmas. A área delimitada em vermelho é um hemidiafragma com sua inervação associada. (B) O hemidiafragma é recortado em regiões próximas ao tronco principal de inervação do nervo frênico. As áreas delimitadas em vermelho são regiões ricas em JNM. (C) As áreas selecionadas em B são recortadas em fragmentos regulares de 3mm de comprimento. (Desenho adaptado por Hermann A. Rodrigues a partir de COMERFORD AND FITZGERALD, 1986).

3.8.1 Obtenção das elétrón-micrografias de transmissão

A obtenção das elétrón-micrografias das amostras de diafragma foi feita no Microscópio Eletrónico de Transmissão Tecnai G2-12 - FEI SpiritBiotwin com voltagem de aceleração de 120 kV do Centro de Microscopia da UFMG.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos do simpatomimético fumarato de formoterol na exocitose espontânea de vesículas sinápticas em JNMs.

Neste trabalho, inicialmente investigamos o possível efeito do Fumarato de Formoterol na exocitose de vesículas sinápticas contendo ACh em JNMs diafragmáticas de camundongos machos. Para verificarmos esse efeito, as preparações músculo-nervo previamente marcadas seguindo o protocolo do FM1-43 foram expostas a luz polarizada durante sete minutos em meio Ringer para categorizarmos o padrão de decaimento da fluorescência na ausência do agonista simpatomimético (FIGURA 10A e C). Após essa padronização, o conjunto de experimentos seguintes consistia em expor as preparações do músculo diafragma marcadas com a sonda fluorescente a diferentes concentrações de formoterol (0,01 μ M, 0,1 μ M, 0,25 μ M, 1 μ M, 10 μ M e 50 μ M). Em todas as concentrações, os parâmetros experimentais se mantiveram os mesmos usados para o controle na ausência do formoterol. Todas as concentrações foram testadas tanto em animais machos quanto em fêmeas da mesma linhagem, C57, e da mesma idade, 3 meses.

A FIGURA 10 mostra o painel e a quantificação da fluorescência em machos nos diferentes contextos experimentais. No primeiro painel, vemos a perda de sinal fluorescente devido apenas a exposição a luz polarizada na ausência de qualquer estímulo, o que chamamos de fotodesmarcação (FIGURA 12A). Nesta condição vemos uma queda de sinal fluorescente de apenas aproximadamente 10%, tendo a imagem obtida após sete minutos de exposição (painel inferior) cerca de 90% da fluorescência inicial. Na figura 10B, vemos imagens representativas do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol em uma concentração de 0,01 μ M. Não houve diferença entre a taxa de decaimento da fluorescência entre a concentração de 0,01 μ M e o controle (fotodesmarcação). A dose de formoterol de 0,1 μ M foi a menor concentração testada a apresentar uma diferença no decaimento em relação à fotodesmarcação. Vimos um decaimento de aproximadamente 30%. Nas imagens representativas podemos perceber essa redução da fluorescência quando comparamos a imagem tirada no tempo zero (painel superior), antes da exposição ao fármaco, com a imagem tirada após sete minutos de exposição ao formoterol (painel inferior) (FIGURA 12C). A FIGURA 10D representa o sinal fluorescente antes (painel superior) e depois de sete minutos de exposição ao fármaco na concentração 0,25 μ M. Nesse contexto vemos um decaimento da fluorescência ainda maior, de aproximadamente 60%. A próxima concentração testada foi a de 1 μ M em que a redução do sinal fluorescente se manteve semelhante ao da concentração anterior de 0,25 μ M (FIGURA 12E). Já na concentração de 10 μ M, observamos uma desmarcação ainda maior,

indicando um aumento da exocitose induzida por este fármaco. Nessa concentração, o decaimento foi de cerca de 80% (FIGURA 12F). Não houve diferença entre a concentração de 10 μM e 50 μM (FIGURA 12G), atingindo assim o platô de efeito do fármaco. O gráfico da FIGURA 10H representa a quantificação do decaimento da fluorescência em consequência da exocitose de vesículas sinápticas em cada um desses contextos experimentais, gerando uma curva dose-resposta da ação do formoterol. Cada uma das curvas representa a média de pelo menos três experimentos independentes. Foram registradas e analisadas imagens no tempo 0, na ausência do simpatomimético, nos tempos 1 min, 3 min, 5 min e 7 min na presença do simpatomimético. O gráfico da FIGURA 13 representa a quantificação da exocitose total após os sete minutos de exposição ao fármaco. Cada barra representa a quantidade de fluorescência final em relação a fluorescência inicial em cada concentração.

A análise destes resultados nos permite observar um aumento da exocitose, indicado pela perda do sinal fluorescente, de acordo com o aumento da concentração da droga. Dessa forma, nossos resultados sugerem que o fumarato de formoterol é capaz de induzir a exocitose de vesículas sinápticas em junções neuromusculares diafragmáticas de animais machos e que esse efeito é dose-dependente.

Devido às diferenças entre machos e fêmeas já apresentadas na literatura em relação a liberação de neurotransmissores, executamos os experimentos em fêmeas seguindo os mesmos parâmetros usados para os machos para identificar possíveis disparidades sexuais entre os efeitos da ativação do adrenoceptor- β_2 . Na FIGURA 11 podemos observar o painel de imagens representativas das JNMs analisadas. O painel superior representa o tempo 0 antes da exposição e o painel inferior sete minutos após a exposição. Ao contrário do resultado encontrado para machos, não houve diferença estatística entre as diferentes doses do fármaco testadas, com exceção apenas da menor dose de 0,01 μM (FIGURA 14B) cujo decaimento se equiparou ao da fotodesmarcação. As concentrações de 0,1 μM (FIGURA 14-C), 0,25 μM (FIGURA 14D), 1 μM (FIGURA 14E), 10 μM (FIGURA 14 F) e 50 μM (FIGURA 14G) não possuíram diferença entre si com relação a perda do sinal fluorescente, entretanto todas estatisticamente se diferiram do contexto sem estímulo (FIGURA 14 A) e da dose sem efeito (FIGURA 14B). A FIGURA 14G representa a quantificação do decaimento da fluorescência em todos os contextos experimentais formando uma curva dose-resposta. Assim como nos machos, foi feita a análise de imagens obtidas no tempo 0, antes da exposição, e em seguida no tempo 1', 3', 5' e 7'. O gráfico da FIGURA 15 representa a quantidade total de exocitose sofrida com a estimulação feita durante sete minutos.

A análise destes resultados nos indica que a ativação do receptor β_2 , feita através da administração do agonista seletivo formoterol, também é capaz de induzir a exocitose de vesículas

sinápticas em junções neuromusculares de fêmeas. Entretanto, ao contrário do que acontece nos machos, este efeito alcança seu platô em concentrações muito mais baixas.

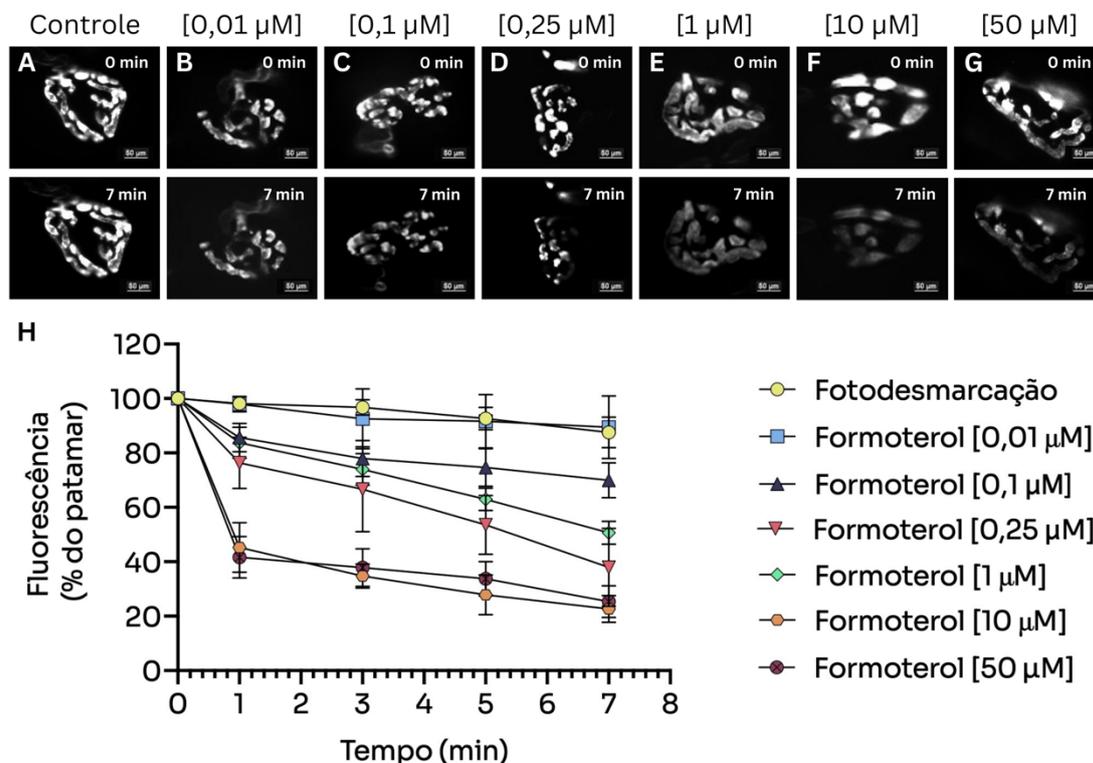


Figura 12- Aumento da excitose induzida pelo simpatomimético fumarato de formoterol em machos.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição à luz polarizada (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (0,01 μM) (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (0,1 μM) (painel inferior). (D) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (0,25 μM) (painel inferior). (E) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (1 μM) (painel inferior). (F) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (10 μM) (painel inferior). (G) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (50 μM) (painel inferior). (H) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência na ausência e na presença do simpatomimético em diferentes concentrações. Foram quantificadas as

fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência do formoterol, nos tempos 1', 3', 5' e 7' na presença de concentrações crescentes do fármaco. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso de pelo menos três animais individuais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 190 botões fluorescentes de 38 junções neuromusculares de 19 animais machos.

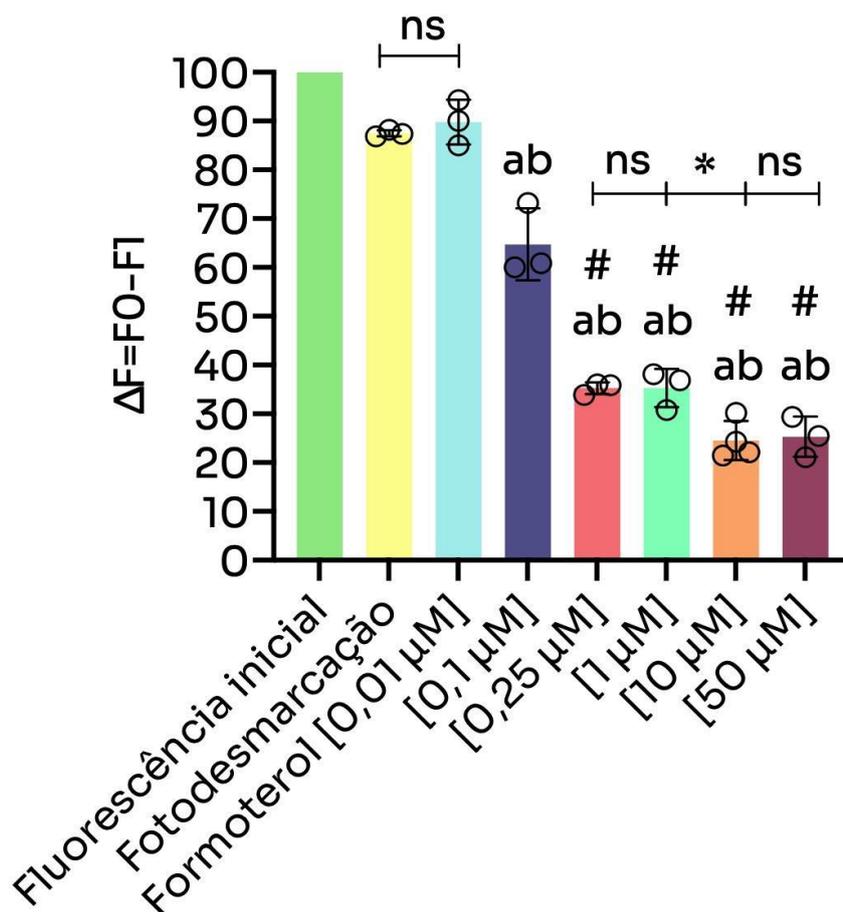


Figura 13- Aumento da exocitose induzida pelo simpatomimético formoterol em machos de forma dose-dependente.

Quantificação da exocitose evocada pelo formoterol após sete minutos de exposição ao fumarato de formoterol. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados dois terminais nervosos de cada animal. Foram analisados pelo menos três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 190 botões fluorescentes de 38 junções neuromusculares de 19 animais machos. * $p < 0,05$. $ab p < 0,05$ quando comparado com a segunda (fotodesmarcação) e a terceira barra (dose sem efeito). # $p < 0,05$ quando comparado com a quarta barra (Formoterol [0,1 μ M]). ns, $p > 0,05$. (ANOVA)

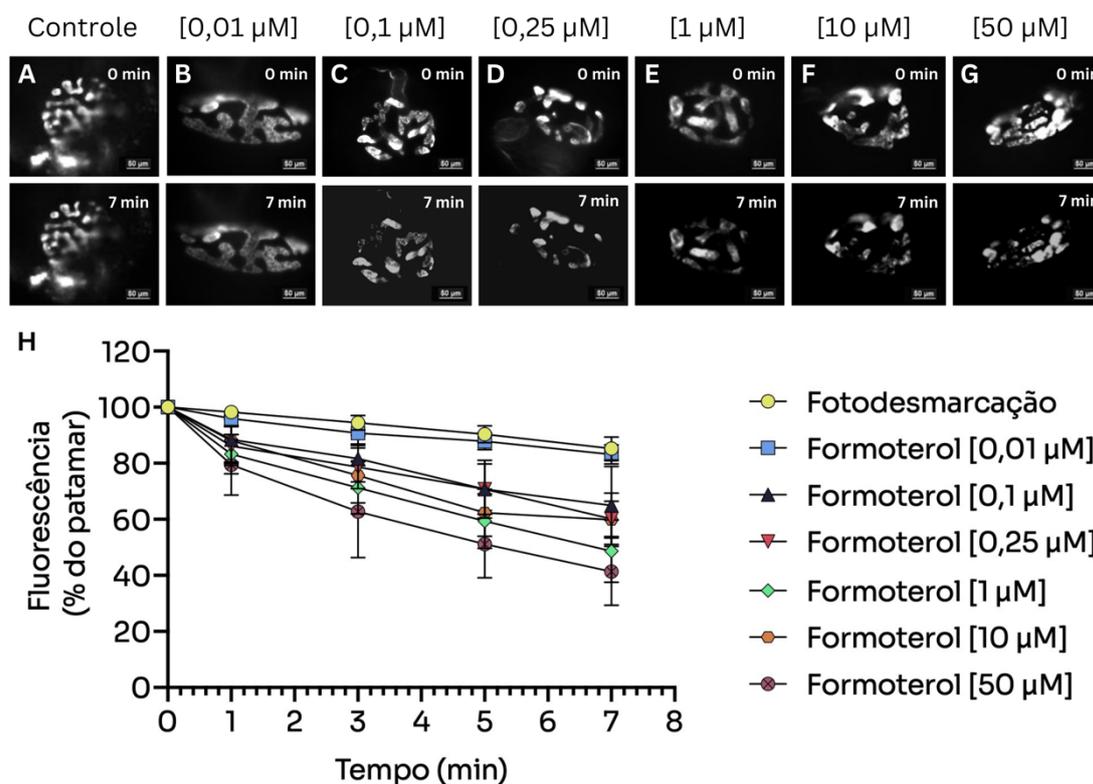


Figura 14- Aumento da exocitose induzida pelo simpatomimético fumarato de formoterol em fêmeas.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição à luz polarizada (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (0,01 μM) (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (0,1 μM) (painel inferior). (D) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (0,25 μM) (painel inferior). (E) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (1 μM) (painel inferior). (F) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (10 μM) (painel inferior). (G) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (50 μM) (painel inferior). (H) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência na ausência e na presença do simpatomimético em diferentes concentrações. Foram quantificadas as fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência do formoterol, nos tempos 1', 3', 5' e 7' na presença de concentrações crescentes do fármaco. Foram analisados cinco pontos fluorescentes

por terminal nervoso. Nesses experimentos, analisamos pelo menos três animais individuais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 180 botões fluorescentes de 36 JNM de 18 animais fêmeas.

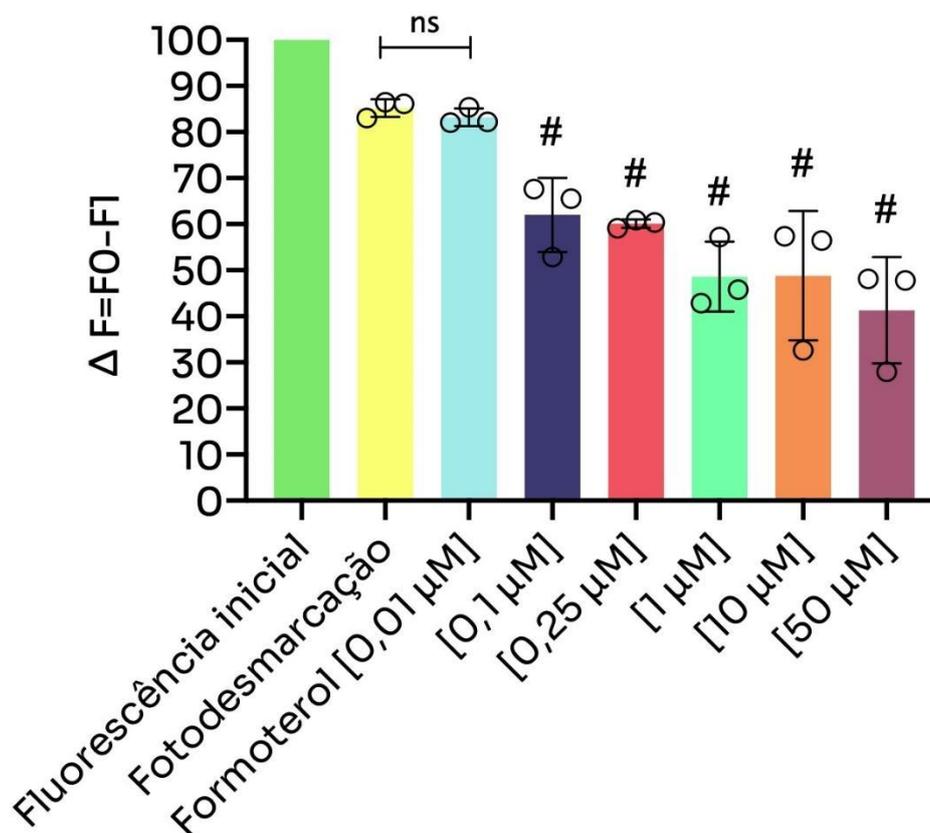


Figura 15- Aumento da exocitose induzida pelo simpatomimético formoterol em fêmeas de forma dose-dependente.

Quantificação da exocitose evocada após sete minutos de exposição ao fumarato de formoterol. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso por animal. Foram analisados três animais individuais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 180 botões fluorescentes de 36 JNMs de 18 animais fêmeas. #<0,05 quando comparado com a segunda barra (fotodesmarcação) e a terceira barra (dose sem efeito). ns, p>0,05 (ANOVA).

4.1.1 Diferença entre machos e fêmeas

Os resultados descritos acima sugerem uma diferença no efeito da ativação do adrenoceptor- β 2 na exocitose de vesículas sinápticas nas JNMs de machos e fêmeas. Pelos resultados apresentados até agora, as fêmeas pareciam ser menos sensíveis ao aumento da concentração do formoterol, comparando-se com os machos. Para confirmarmos essa hipótese, unimos as curvas dose-resposta de machos e fêmeas em um único gráfico e realizamos o teste estatístico ANCOVA que define a diferença estatística entre duas regressões não lineares. A comparação entre machos e fêmeas mostrou diferença estatisticamente significativa entre os sexos. Este resultado nos indica uma diferença relevante entre machos e fêmeas quanto aos efeitos do formoterol na exocitose. Essa diferença pode ser devido a uma menor sensibilidade na ativação do adrenoceptor- β 2 em fêmeas ou por uma maior liberação de neurotransmissores em machos. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo por trás desta disparidade de sexos encontrada.

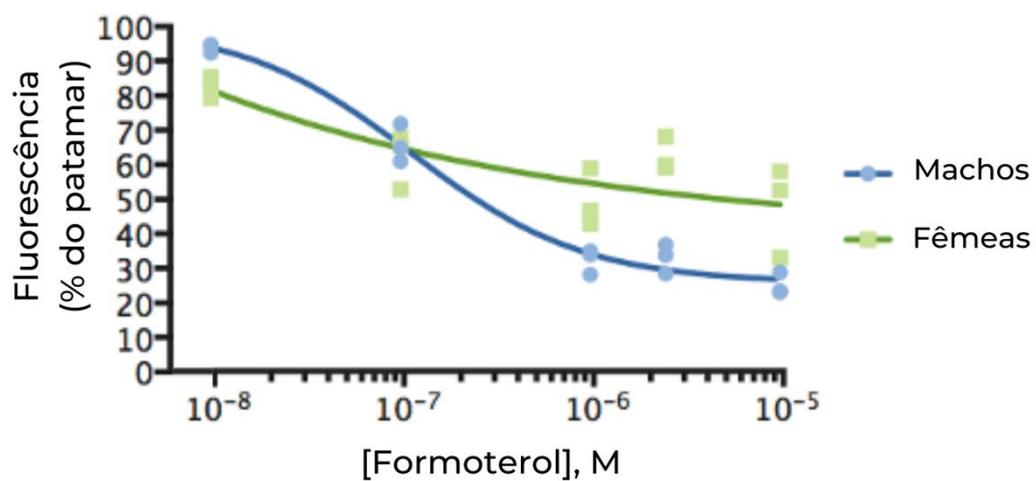


Figura 16- A curva dose-resposta dos animais machos é estatisticamente diferente dos animais fêmeas.

Gráfico contendo a curva dose-resposta de machos e fêmeas. Quantificação do decaimento da fluorescência em função da concentração de formoterol. ANCOVA F-Test- $p=0,038$.

4.1.2 Efeito do Formoterol via a ativação específica do adrenoceptor- β_2

Para determinar se a exocitose das vesículas sinápticas foi induzida especificamente pela ação do formoterol na ativação dos receptores β_2 , realizamos um experimento utilizando o modelo murino mutante com depleção sistêmica do receptor β_2 , os camundongos β_2 -KO. Dessa forma, foi possível responder a pergunta se exocitose induzida pelo formoterol seriam de fato resultante da ativação dos receptores e não por alguma outra variável. Os animais β_2 -KO machos foram submetidos ao mesmo protocolo de eutanásia, isolamento do diafragma associado ao nervo frênico e marcação com a sonda fluorescente FM1-43 dos demais experimentos. Em seguida, os hemidiafragmas isolados e marcados com FM1-43 foram submetidos a fotodesmarcação (primeiro hemidiafragma) e incubação com formoterol a uma concentração de 10 μ M (segundo hemidiafragma). Em ambos os contextos, foram registradas e analisadas imagens do tempo 0', 1', 3', 5' e 7'. A quantificação destes eventos gerou o gráfico da FIGURA 17. Observando estes resultados é possível verificar que a redução do sinal fluorescente após a exposição à luz polarizada (fotodesmarcação) foi em torno de ~15% e, na presença do fármaco formoterol na concentração de 10 μ M nos animais β_2 -KO, se manteve nesta faixa de decaimento. Para efeito comparativo, o gráfico da FIGURA 17 também apresenta a curva de decaimento da fluorescência de animais wild-type (WT) na presença do formoterol na mesma concentração testada nos animais β_2 -KO. É muito claro que o decaimento da fluorescência, consequência da exocitose de vesículas sinápticas, é muito mais pronunciado nos animais WT do que nos animais β_2 -KO na presença do formoterol. Inclusive, no contexto com o simpatomimético presente, a curva de decaimento da fluorescência dos β_2 -KO se equipara ao contexto sem estímulo, indicando que o formoterol não foi capaz de induzir a exocitose de vesículas sinápticas nas junções neuromusculares dos animais com a depleção sistêmica dos adrenoceptores- β_2 .

Estes resultados nos indicam que o efeito do formoterol sobre a transmissão colinérgica nas junções neuromusculares é exclusivamente via a ativação do adrenoceptor- β_2 , já que o efeito foi anulado quando o fármaco foi testado em animais *knockout* para este adrenoceptor.

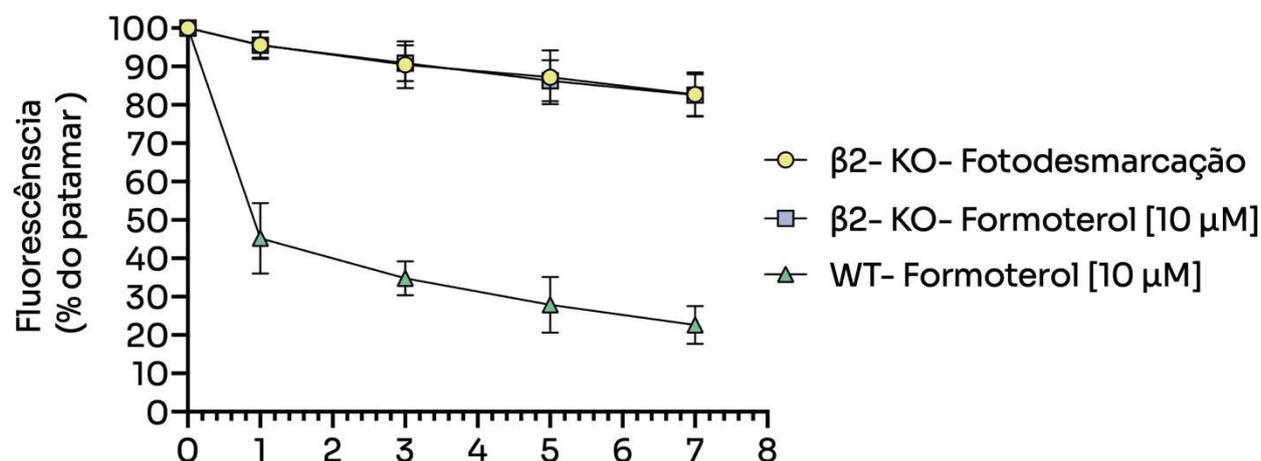


Figura 17- Formoterol não foi capaz de induzir a excitose nos animais modelo β_2 -KO.

Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência na ausência e na presença do simpatomimético fumarato de formoterol em diferentes concentrações. Foram quantificadas as fluorescências das imagens obtidas no tempo 0, na ausência do fármaco em todos os contextos, e nos tempos 1', 3', 5' e 7', sem o fármaco na fotodesmarcação e na presença do fármaco na concentração de 10 μ M nos demais contextos. O formoterol foi testado em animais machos WT e β_2 -KO. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Utilizamos três animais individuais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 90 botões fluorescentes de 18 JNMs de 9 animais.

4.4 Efeito do Formoterol na exocitose induzida por KCl

Após os experimentos que nos indicaram um aumento da exocitose espontânea em JNMs induzida pela ativação de adrenoceptor- β_2 , verificamos o efeito do agonista simpatomimético formoterol na exocitose induzida por solução Ringer alto KCl. KCl é um estímulo despolarizante capaz de evocar a exocitose de vesículas sinápticas de uma maneira independente de Na^+ (NICHOLLS, 1993). O aumento dos níveis extracelulares de K^+ despolariza a membrana celular e ativa os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. A ativação destes canais leva o influxo de Ca^{2+} para dentro do terminal nervoso e consequente exocitose de vesículas sinápticas.

Para tentar entender o mecanismo pelo qual o formoterol induz exocitose, nós investigamos se o formoterol era capaz de interferir na exocitose induzida por KCl (mM), através de um efeito aditivo ou não. Dessa forma, terminações nervosas foram marcadas com FM1-43 e analisadas após a exposição ao KCl, em concentração constante de 60 mM, associado ao formoterol, em concentrações crescentes de (1, 10 e 25 μM). Imagens representativas de terminações nervosas antes (painel superior) e depois (painel inferior) são exibidas na FIGURA 18, em que podemos ver o estímulo com KCl (60 mM) sozinho (FIGURA 18A), KCl (60 mM) + Formoterol (1 μM) (FIGURA 18B), KCl (60 mM) + Formoterol (10 μM) (FIGURA 18C), KCl (60 mM) + Formoterol (25 μM) (FIGURA 18D) em machos. Na FIGURA 18E temos a quantificação dessas imagens analisadas e observamos um decaimento da fluorescência dependente da concentração de formoterol. O formoterol na concentração de 1 μM associado ao KCl tem um efeito semelhante ao do KCl sozinho. Entretanto, em concentrações maiores é possível verificar um aumento gradual da desmarcação indicando uma somação dos efeitos do KCl e do formoterol na exocitose de vesículas sinápticas em machos. A gráfico da FIGURA 19 confirma este resultado mostrando que não há diferença estatística entre a primeira barra, KCl (60 mM) sozinho, e a segunda barra, KCl (60 mM) + formoterol (1 μM). Porém, há um aumento estatístico da exocitose quando a concentração de formoterol aumenta para 10 μM . Este aumento encontra seu platô na concentração de 50 μM para o formoterol.

Apesar de menos pronunciado, o formoterol teve efeito similar nas fêmeas quanto a exocitose induzida por KCl. No primeiro bloco de imagens da FIGURA 19 vemos imagens representativas de JNMs marcadas com FM1-43. Nos painéis superiores temos imagens das fluorescências iniciais antes de qualquer estímulo e nos painéis inferiores temos imagens registradas após sete minutos de estímulo. Os contextos experimentais foram iguais aos vistos nos machos (FIGURA 19A-D). As curvas dose-respostas, resultados da quantificação da fluorescência nos diversos contextos, mostram um aumento da exocitose a partir da segunda concentração de formoterol testada, a de 10 μM . Novamente, não há diferença estatística entre o KCl sozinho e o formoterol a

uma concentração de 1 μM . Outra semelhança entre machos e fêmeas é o platô do efeito do formoterol na exocitose induzida por KCl encontrado na concentração de 25 μM de formoterol (FIGURA 20).

Como houve somação dos efeitos do formoterol e do KCl tanto em machos quanto em fêmeas, esses resultados indicam que formoterol e KCl possuem efeitos estimuladores de exocitose através de mecanismos distintos. Além disso, uma maior desmarcação do formoterol associada ao KCl em relação ao formoterol sozinho na mesma concentração pode indicar uma facilitação do exocitose em uma membrana já despolarizada.

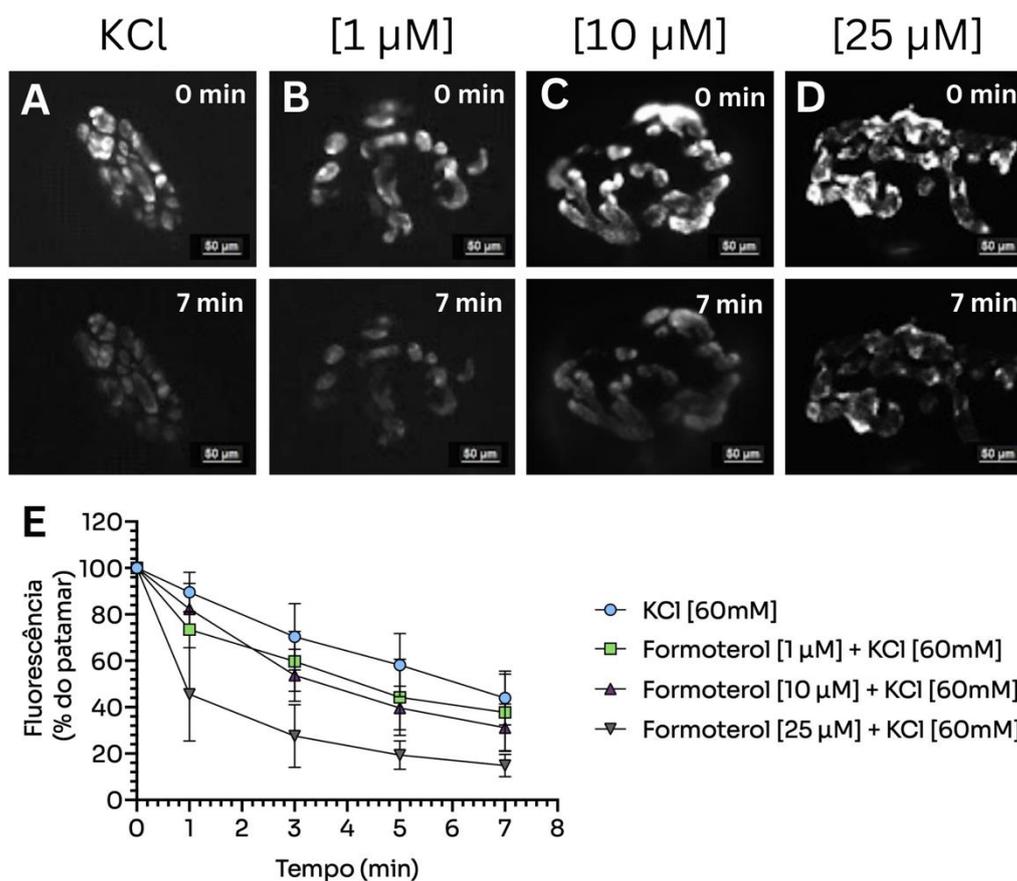


Figura 18- Formoterol possui efeito na excitação induzida por KCl em machos.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao KCl (60 mM) (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (1 μ M) (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (10 μ M) (painel inferior). (D) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (25 μ M) (painel inferior). (E) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência presença do simpatomimético em diferentes concentrações associado ao KCl a uma concentração constante de 60 mM. Foram quantificadas as fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência de estímulo, nos tempos 1', 3', 5' e 7' na presença de concentrações crescentes do fármaco associado ao KCl. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 120 botões fluorescentes de 24 junções neuromusculares de 12 animais machos.

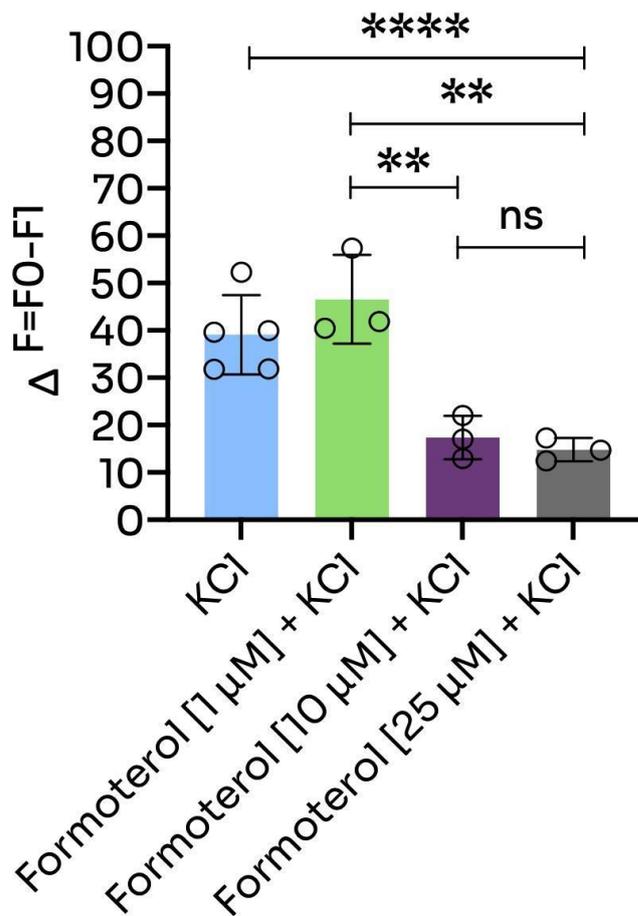


Figura 19- Quantificação da excitose induzida pelo simpatomimético formoterol associado a KCl em machos.

Quantificação da excitose após sete minutos de exposição do KCl associado ao fumarato de formoterol em concentrações crescentes. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 120 botões fluorescentes de 24 junções neuromusculares de 12 animais machos. • $p < 0,05$. ns, $p > 0,05$ (ANOVA).

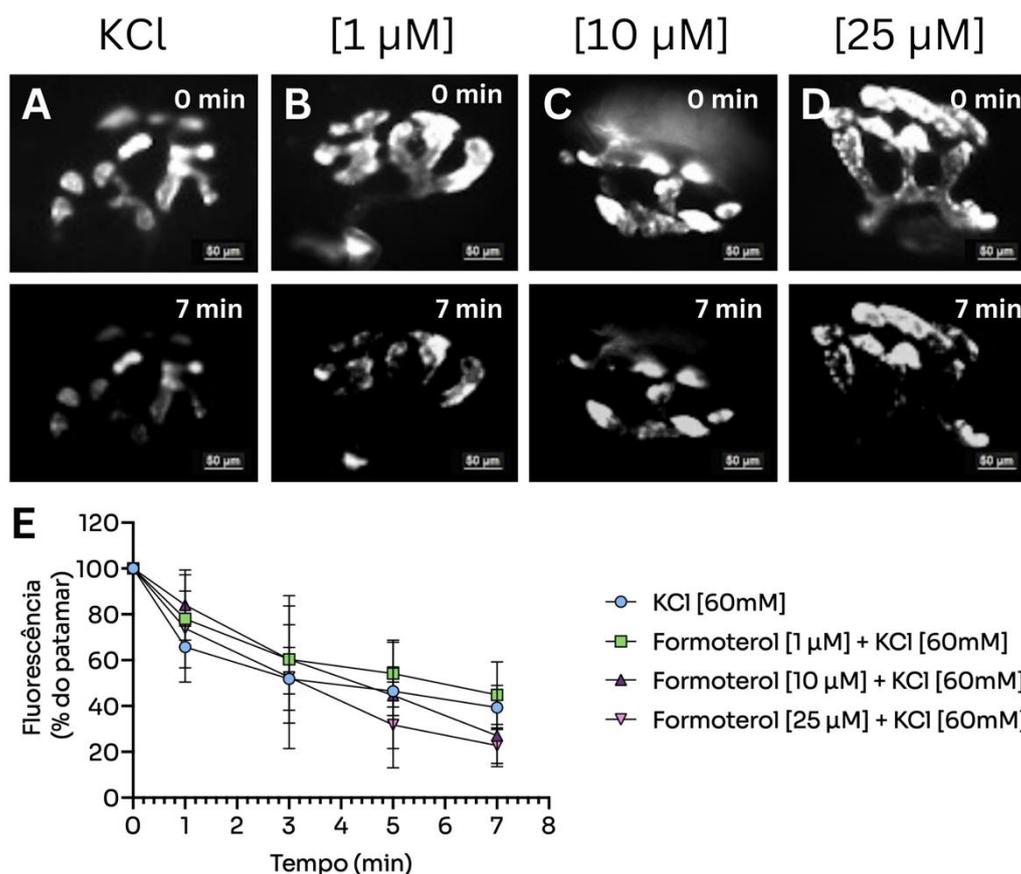


Figura 20- Formoterol possui efeito na exocitose induzida por KCl em fêmeas.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao KCl (60 mM) (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (1 μM) (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (10 μM) (painel inferior). (D) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (25 μM) (painel inferior). (E) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência presença do simpatomimético em diferentes concentrações associado ao KCl a uma concentração constante de 60 mM. Foram quantificadas as fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência de estímulo, nos tempos 1', 3', 5' e 7' na presença de concentrações crescentes do fármaco associado ao KCl. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média ± EPM de 120 botões fluorescentes de 24 junções neuromusculares de 12 animais fêmeas.

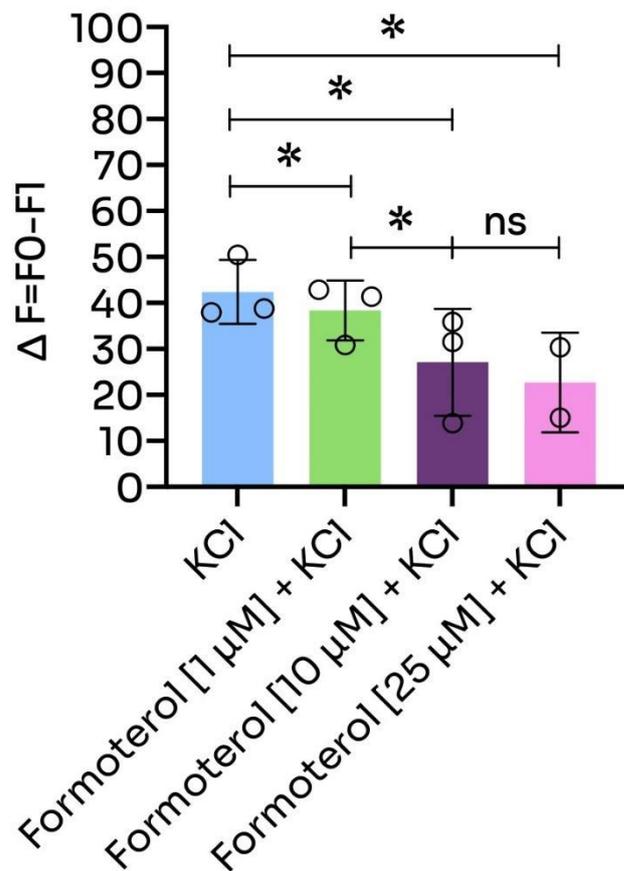


Figura 21- Quantificação da excitação induzida pelo simpatomimético formoterol associado a KCl em fêmeas.

Quantificação da excitação após sete minutos de exposição do KCl associado ao fumarato de formoterol em concentrações crescentes. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 120 botões fluorescentes de 24 junções neuromusculares de 12 animais fêmeas. • $p < 0,05$. ns, $p > 0,05$ (ANOVA).

4.5 Formoterol estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente do Ca^{2+} extracelular.

Apesar da bem estabelecida a dependência de Ca^{2+} extracelular na liberação de vesículas sinápticas nas JNMs de mamíferos (Katz e Miledi 1967), ainda não é sabido se o influxo de Ca^{2+} no terminal nervoso é mediador das ações simpatomiméticas na transmissão colinérgica nas junções neuromusculares. Portanto, para investigar o papel do Ca^{2+} externo na exocitose induzida por formoterol, os experimentos utilizando a sonda FM1-43 foram realizados em solução Ringer modificada com substituição equimolar de CaCl_2 por MgCl_2 . EGTA (1 mM), um quelante de Ca^{2+} extracelular, também foi adicionado ao Ringer modificado, garantindo a ausência deste íon. As preparações diafragmáticas foram submetidas ao protocolo de marcação com FM1-43, sendo um hemidiafragma destinado ao controle, que neste caso foi o formoterol a 10 μM em solução Ringer normal com Ca^{2+} . O outro hemidiafragma foi incubado em solução contendo 10 μM de formoterol em meio livre de Ca^{2+} . Além disso, foram feitos experimentos de fotodesmarcação no meio livre de Ca^{2+} . As imagens foram registradas e analisadas ao longo de sete minutos para as três condições experimentais no minuto 0, antes da exposição ao fármaco, e nos minutos 1, 3, 5 e 7, após a exposição ao fármaco. A FIGURA 22A mostra imagens representativas da fotodesmarcação no meio livre de Ca^{2+} no minuto 0 (painel superior) e no minuto 7 (painel inferior) em fêmeas. A FIGURA 22B são imagens representativas do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol 10 μM (painel inferior) em meio livre de Ca^{2+} . O efeito de decaimento da fluorescência do formoterol em Ringer normal, na presença de Ca^{2+} extracelular, é mostrado pelas imagens representativas da FIGURA 22C. Podemos observar que há pouca perda de sinal fluorescente nos dois primeiros blocos de imagens e a desmarcação é mais intensa quando o formoterol é incubado na presença de Ca^{2+} extracelular.

A FIGURA 22D mostra a quantificação destes resultados. A fotodesmarcação em meio livre de Ca^{2+} apresentou um decaimento de aproximadamente ~20%, um decaimento equiparável ao da fotodesmarcação. Ao contrário do formoterol em meio com a presença de Ca^{2+} , que apresentou um decaimento da fluorescência, reflexo da exocitose de vesículas sinápticas, de aproximadamente 40%. Nota-se que houve diferença estatística entre o formoterol (10 μM) em meio Ringer normal tanto em relação ao formoterol (10 μM) em meio Ringer livre de Ca^{2+} quanto em relação à fotodesmarcação em meio Ringer livre Ca^{2+} com $**p < 0.001$. Não houve diferença estatística entre a fotodesmarcação e o formoterol em meio Ringer livre de Ca^{2+} .

De forma semelhante ao que ocorreu em fêmeas, os experimentos em animais machos mostraram que o Ca^{2+} extracelular é essencial para o efeito do formoterol na indução da exocitose em

junções neuromusculares. A primeira parte da FIGURA 23 mostra imagens representativas das três condições experimentais. A FIGURA 23A mostra uma JNM marcada com FM1-43 na fotodesmarcação em meio livre de Ca^{2+} , antes (painel superior) e depois de sete minutos de exposição à luz polarizada (painel inferior). A FIGURA 23B são imagens representativas de junções expostas ao formoterol (10 μM) em meio livre de Ca^{2+} . Por último, temos a FIGURA 23C representando JNM expostas ao formoterol (10 μM) em meio Ringer normal com a presença de Ca^{2+} . Os dois primeiros blocos de imagem apresentam um decaimento diminuto na fluorescência, ao contrário do último bloco que mostra uma desmarcação intensa. No gráfico, observamos a quantificação dos valores de fluorescência das imagens analisadas (FIGURA 23D). A análise estatística comprovou a diferença pronunciada entre o formoterol em meio com e sem Ca^{2+} , revelando que a ausência do Ca^{2+} extracelular é capaz de inibir o efeito da ativação dos adrenocetores- β_2 sobre a transmissão neuromuscular.

Dessa forma, a análise destes resultados indica que a exocitose de vesículas sinápticas induzidas pelo fumarato de formoterol através da ativação do receptor β_2 ocorre de maneira dependente de Ca^{2+} extracelular tanto em fêmeas quanto em machos.

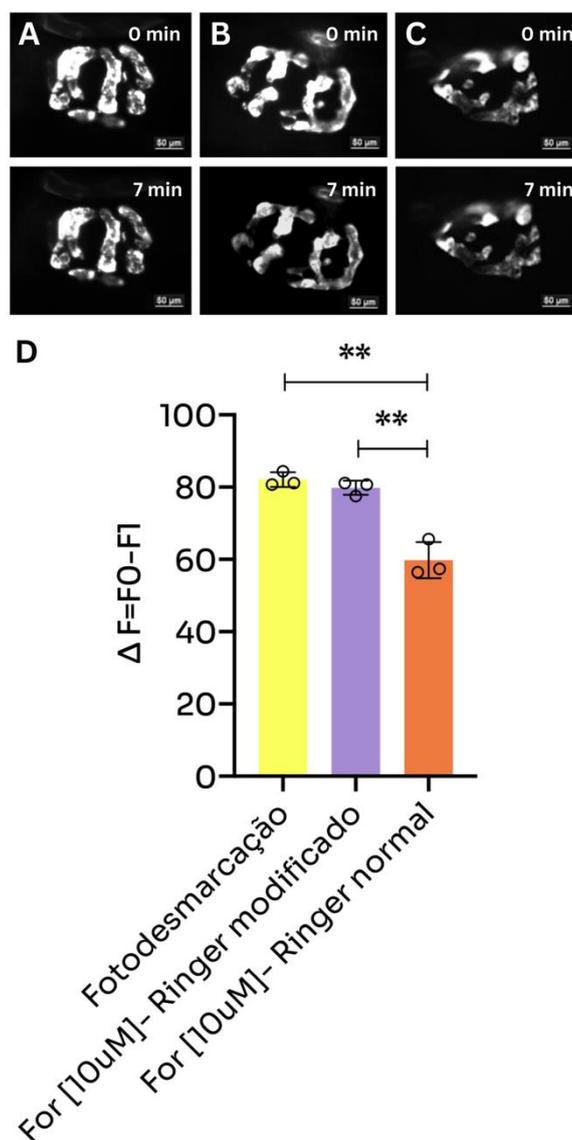


Figura 22- Formoterol estimula a excitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente do Ca²⁺ extracelular em fêmeas.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição a luz polarizada em meio livre de Ca²⁺ (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μM em meio livre de Ca²⁺ (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μM em meio na presença de Ca²⁺ (painel inferior). (D) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência na ausência e na presença do simpatomimético em meio na presença e na ausência de cálcio. Foram quantificadas as fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência do formoterol, nos tempos 1', 3', 5' e 7', após a exposição

ao fármaco. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 90 botões fluorescentes de 18 junções neuromusculares de 9 animais fêmeas (ANOVA).

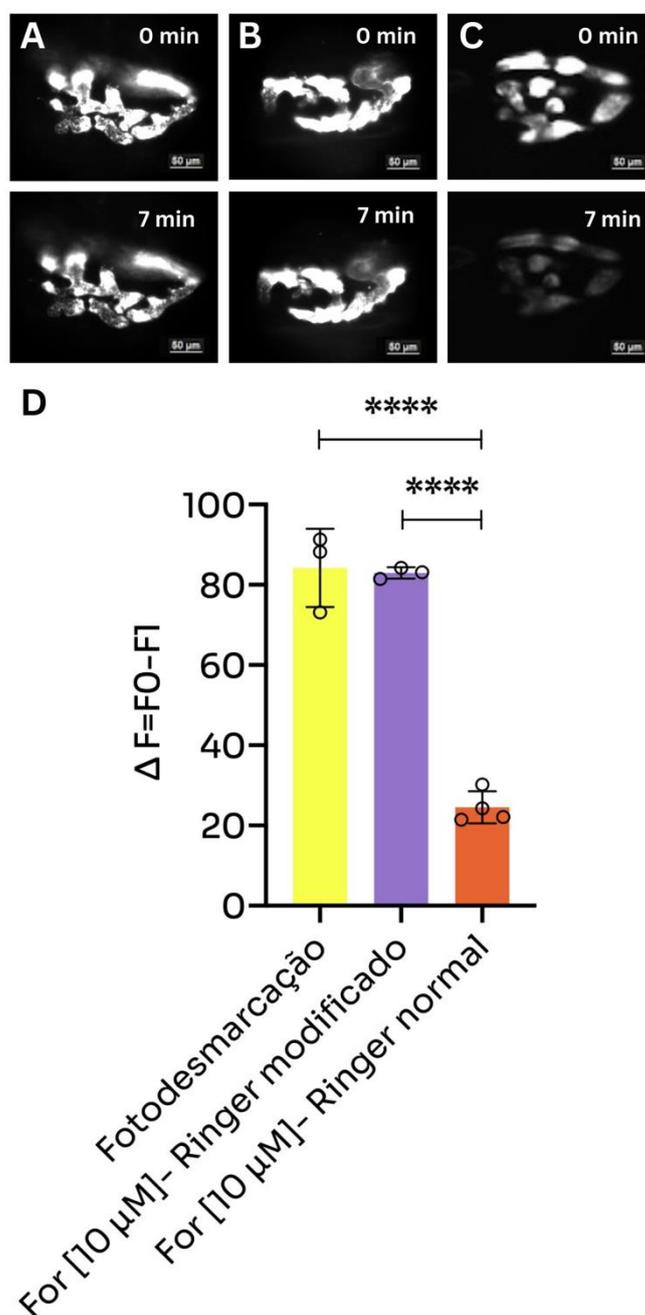


Figura 23- Formoterol estimula a excitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente do Ca^{2+} extracelular em machos.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição a luz polarizada em meio livre de Ca^{2+} (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de

exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μM em meio livre de Ca^{2+} (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μM em meio na presença de Ca^{2+} (painel inferior). (D) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência na ausência e na presença do simpatomimético em meio na presença e na ausência de cálcio. Foram quantificadas as fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência do formoterol, nos tempos 1', 3', 5' e 7', após a exposição ao fármaco. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 90 botões fluorescentes de 18 junções neuromusculares de 9 animais em machos (ANOVA).

4.6 Formoterol estimula a exocitose de vesículas sinápticas por um mecanismo dependente dos canais para Ca^{2+} do tipo P/Q.

Como observamos que o efeito do fumarato de formoterol na indução da exocitose de vesículas sinápticas nas JNMs é um processo dependente de Ca^{2+} extracelular, nosso passo seguinte foi investigar quais canais para Ca^{2+} estariam envolvidos na ação desse simpatomimético. Uma vez que a liberação de vesículas sinápticas nas junções neuromusculares de mamíferos é mediada principalmente pelos canais para Ca^{2+} do tipo P/Q, utilizamos a ω -Agatoxina IVA, uma neurotoxina bloqueadora dos subtipos P/Q dos canais para Ca^{2+} para verificar a influência específica destes subtipos no efeito já visto do formoterol. As preparações marcadas com a sonda FM1-43 foram divididas em dois hemidiafragmas, nos quais um passou pela fotodesmarcação na presença da ω -Aga IVA na concentração de 200 nM, e o outro foi incubado em meio na presença de formoterol (10 μM) + ω -Aga IVA (200 nM).

As FIGURAS 24A mostram imagens representativas da redução do sinal fluorescente após a exposição à luz polarizada durante sete minutos nos experimentos feitos em camundongos fêmeas. O painel superior representa fluorescência inicial e o painel inferior representa a fluorescência final. As FIGURAS 24B representam o contexto antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol (10 μM) associada a toxina bloqueadora de canal para Ca^{2+} , ω -Aga IVA (painel inferior). Neste segundo bloco de imagens, observamos um decaimento diminuto do sinal fluorescentes, semelhante ao contexto de fotodesmarcação. Por último temos as imagens representativas da perda de fluorescência consequência da exocitose de vesículas após a estimulação apenas com o formoterol (10 μM) (FIGURA 24C). O gráfico abaixo é quantificação das fluorescências finais nestes três contextos experimentais. Percebemos que em fêmeas, a neurotoxina ω -AGA IVA foi capaz de bloquear completamente o efeito do formoterol. Este resultado nos indica o papel crucial dos canais para Ca^{2+} do tipo P/Q no efeito do simpatomimético na transmissão colinérgica neuromuscular.

Estes mesmo experimentos foram executados em camundongos machos e obtivemos resultados parcialmente distintos. Em fêmeas observamos uma inibição total do efeito do formoterol quando bloqueados os canais para Ca^{2+} do tipo P/Q. Já em machos, houve apenas uma inibição parcial da exocitose induzida pelo simpatomimético, havendo ainda diferença com relação ao controle na ausência de estímulo. Nas FIGURAS 25A, B e C estão representadas JNMs marcadas com a sonda FM1-43 que foram submetidas a três contextos experimentais: fotodesmarcação na presença de ω -Aga IVA, formoterol a uma concentração de 10 μM associado a ω -Aga IVA a uma concentração de 200 nM e apenas formoterol a uma concentração de 10 μM , respectivamente. A quantificação destes

valores nos deu um gráfico em que podemos ver o bloqueio parcial do efeito do formoterol na presença da neurotoxina, que reduziu significativamente a exocitose evocada (* $p < 0,05$; *** $p < 0.001$).

A análise destes resultados mostra que a ação dos canais para Ca^{2+} do tipo P/Q é importante para a exocitose evocada por formoterol tanto em machos quanto em fêmeas. Entretanto, encontramos uma diferença entre os dois sexos nos experimentos realizados. O efeito do simpatomimético foi completamente bloqueado pela ω -Aga IVA em fêmeas, mas apenas parcialmente inibido em machos. O resultado em machos pode indicar a atuação de outros canais iônicos, além do P/Q, que atuam na indução da exocitose pelo formoterol. Já existem na literatura, indicativos da participação do canal TRPV1 na manutenção da condutividade de Ca^{2+} no terminal do axônio motor para modular a liberação de vesículas em um estado de repouso e que, além disso, há uma interação entre agonistas β_2 e o canal TRPV1 (RODRIGUES *et al.*, 2019). Este é mais um indício das importantes diferenças entre sexo que existem nos impactos simpáticos na transmissão colinérgica muscular.

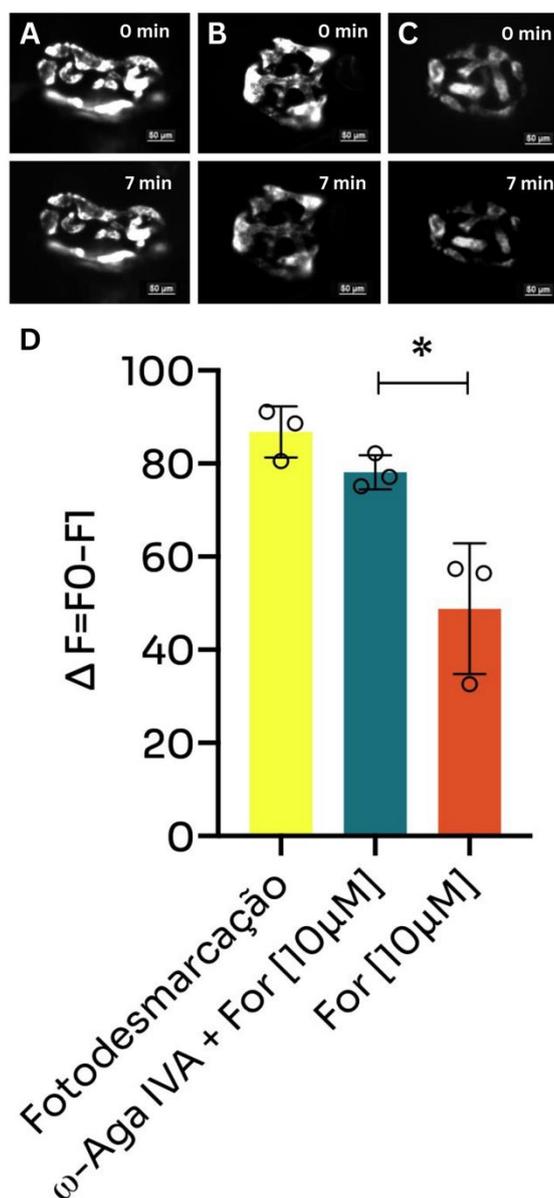


Figura 24- Efeito do formoterol em fêmeas associado a droga bloqueadora dos canais para Ca^{2+} dos tipos P/Q, ω -Agatoxina IVA.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição a luz polarizada na presença da ω -Agatoxina IVA (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μ M associado a ω -Agatoxina IVA (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μ M na ausência da ω -Agatoxina IVA (painel inferior). (D) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência na ausência e na presença do simpatomimético em meio a presença e a ausência de ω -Agatoxina IVA. Foram

quantificadas as fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência do formoterol, nos tempos 1', 3', 5' e 7', após a exposição ao fármaco. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 90 botões fluorescentes de 18 junções neuromusculares de 9 animais em fêmeas (ANOVA).

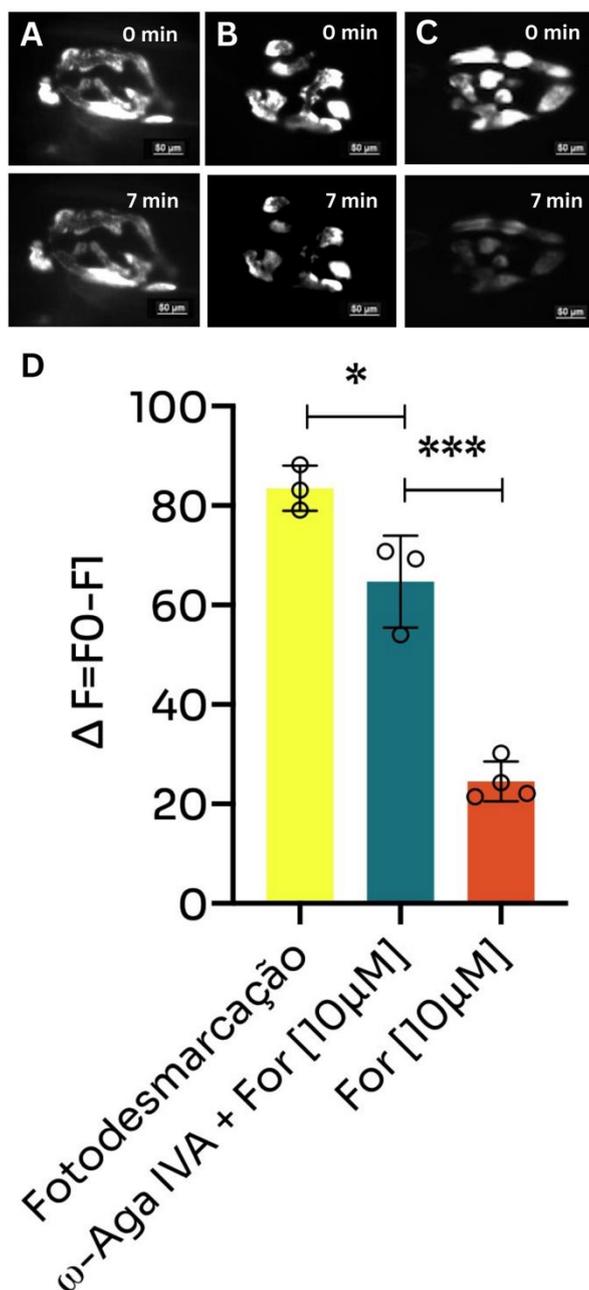


Figura 25- - Efeito do formoterol em machos associado a droga bloqueadora dos canais para Ca^{2+} dos tipos P/Q, ω -Agatoxina IVA.

(A) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição a luz polarizada na presença da ω -Agatoxina IVA (painel inferior). (B) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μM associado a ω -Agatoxina IVA (painel inferior). (C) Imagens representativas da redução do sinal fluorescente antes (painel superior) e após sete minutos de exposição ao formoterol a uma concentração de 10 μM na ausência da ω -Agatoxina IVA (painel inferior). (D) Gráfico da quantificação do decaimento da fluorescência na ausência e na

presença do simpatomimético em meio a presença e a ausência de ω -Agatoxina IVA. Foram quantificadas as fluorescências de imagens obtidas no tempo 0, na ausência do formoterol, nos tempos 1', 3', 5' e 7', após a exposição ao fármaco. Foram analisados cinco pontos fluorescentes de cada terminal nervoso. Foram analisados três animais para cada condição experimental. Dessa forma, as curvas representam a média \pm EPM de 90 botões fluorescentes de 18 junções neuromusculares de 9 animais em machos (ANOVA).

4.6 Plano ultraestrutural das junções neuromusculares estimuladas com formoterol verificado através de microscopia eletrônica de transmissão

Com o objetivo de determinar os efeitos da ativação do adrenoceptor- β_2 sobre o aspecto morfológico das JNM, utilizamos a técnica de microscopia eletrônica de transmissão para examinar e caracterizar a ultraestrutura das placas motoras do músculo diafragma de camundongos adultos que foram estimulados por sete minutos com o agonista- β_2 formoterol a uma concentração de 10 μM . Para estes experimentos, usamos como controle amostras de diafragmas que sofreram estímulo com o KCl a uma concentração de 60 mM. Dessa forma, pudemos comparar placas motoras que foram expostas ao formoterol a placas motoras que foram estimuladas por um indutor de exocitose já conhecido com o objetivo de verificar se o efeito excitatório do agonista é suficiente para gerar alteração no plano ultraestrutural das junções neuromusculares. Nós verificamos que os elementos sinápticos das junções neuromusculares estimuladas com formoterol tinha um aspecto ultraestrutural geral semelhante aos das estimuladas com KCl. Ambos os contextos apresentavam sinais de endocitose compensatória como a presença de vacúolos e vesículas recobertas por clatrina. A endocitose compensatória acontece após um estímulo a exocitose. A presença destes parâmetros nas junções neuromusculares submetidas ao formoterol nos leva a conclusão de que a ativação do receptor β_2 é estímulo suficiente para gerar alterações no plano ultraestrutural das junções neuromusculares semelhantes àqueles vistos após um estímulo conhecido, o KCl.

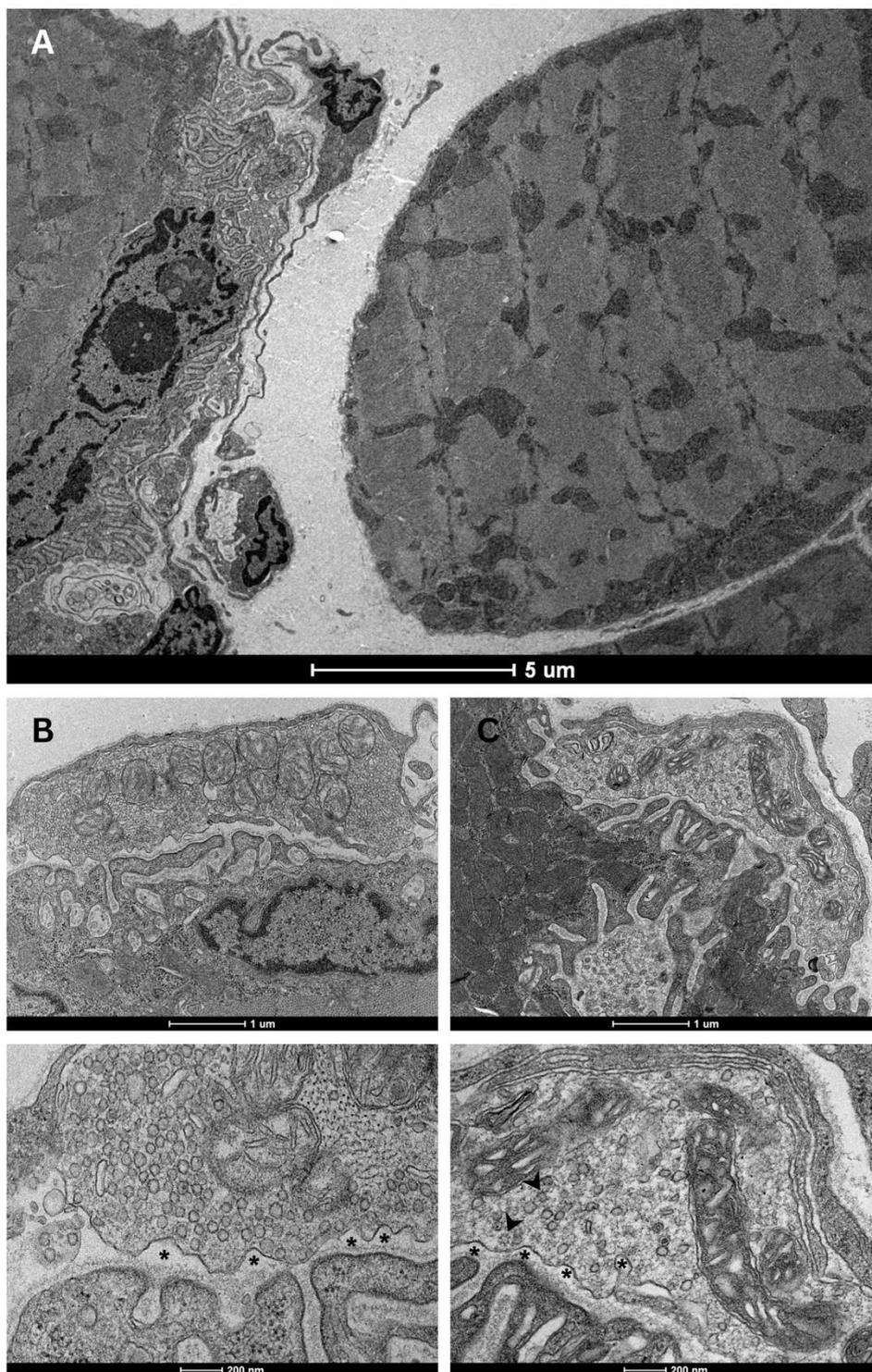


Figura 26- Imagens representativas dos elementos sinápticos de junções neuromusculares diafragmáticas após estímulo com formoterol (10 μ M) e KCl (60 mM).

(A) Imagens representativas de uma junção neuromuscular de diafragma de camundongos machos de três meses estimulados por sete minutos com KCl a uma concentração de 60 mM. É possível observar marcadores de intensa reciclagem de membrana, apresentando invaginações na membrana plasmática

do terminal pré-sináptico (*). (B) Imagens representativas de uma junção neuromuscular de diafragma de camundongos machos de três meses estimulados por sete minutos com formoterol a uma concentração de 10 μ M. Observamos também sinais de uma junção estimulada que está em processo de reciclagem como invaginações de membrana (*) e vesículas recobertas por clatrina (cabeça de seta). Entretanto, o estímulo do formoterol se apresenta como menos intenso e brusco que o do KCl.

5. DISCUSSÃO

Os fármacos simpatomiméticos são classicamente associados ao sistema cardiorrespiratório, mas nos últimos anos têm sido explorados cada vez mais seus efeitos que vão muito além do conhecimento que já está bem consolidado. Além disso, há também um crescente interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para doenças que afetam a comunicação entre o sistema nervoso e o músculo esquelético, com o objetivo de combater a perda de massa muscular e a deterioração da placa motora. Deste modo, os agonistas β_2 surgem como potenciais candidatos para diminuir a atrofia muscular, estabilizar a placa motora e promover o ganho de massa. Entretanto, a grande maioria dos estudos sobre os efeitos de drogas simpatomiméticas na transmissão neuromuscular exploram o terminal pós-sináptico, sem levar em consideração a interação do adrenoceptor- β_2 com possíveis alvos moleculares pré-sinápticos. Compreender o mecanismo de ação pré-sináptico dos simpatomiméticos no músculo esquelético é essencial para consolidar essa classe de fármacos como ferramenta de tratamento de doenças neuromusculares. Ademais, entender a atuação do receptor- β_2 em si na JNM significa esclarecer mais uma etapa dos complexos processos que envolvem a transmissão de informação entre o sistema nervoso central e o músculo esquelético. O simpatomimético fumarato de formoterol apresenta diversas propriedades que o faz ser a ferramenta de escolha para responder as questões levantadas. O formoterol é um agonista β_2 altamente seletivo, com um início de ação rápido e uma duração do efeito de até 12 horas. Além disso, já é uma droga bem estabelecida na clínica com um ótimo perfil de segurança e tolerabilidade (HEKKING *et al.*, 1990; PAUWELS, 1990).

Nesta perspectiva, o objetivo inicial deste trabalho foi analisar os efeitos do agonista seletivo de β_2 , fumarato de formoterol, na exocitose de vesículas sinápticas na JNMs diafragmáticas de camundongos. Primeiramente, nossos experimentos realizados em animais machos mostraram que o formoterol a partir da concentração de 0,1 μM já é capaz de induzir a exocitose de vesículas sinápticas marcadas com a sonda fluorescente FM1-43. A administração de doses crescentes do agonista mostrou que este efeito indutor de exocitose é dose-dependente, uma vez que o aumento da concentração da droga gerava um maior decaimento da fluorescência das junções neuromusculares analisadas (FIGURAS 12 e 13). Este dado é corroborado pelos experimentos eletrofisiológicos executados por RODRIGUES *et al.* (2019). Neste caso, os agonistas em questão foram o salbutamol e o clenbuterol e os resultados deste trabalho mostraram que a ativação do adrenoceptor- β_2 é capaz de aumentar a frequência de MEPPs e também aumentar o conteúdo quântico de EPP. As conclusões

desta primeira parte dos experimentos abordam o conceito de que a administração do formoterol é capaz de facilitar a transmissão colinérgica neuromuscular em machos.

Existem evidências crescentes de diferenças entre machos e fêmeas no metabolismo do músculo esquelético, na comunicação entre o sistema nervoso e o músculo e na neurotransmissão como um todo. Por esse motivo, após a determinação dos efeitos do formoterol nas JNMs de camundongos machos, nós decidimos investigar como é a ação deste fármaco em fêmeas. Para isso, executamos os experimentos usando FM1-43 para construção da curva dose-resposta nos mesmos parâmetros usados anteriormente. As concentrações testadas foram: 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 50 μM (FIGURA 14 e 15). Assim como nos machos, a dose de formoterol mínima na qual não observamos efeito foi a de 0,01 μM . Entretanto, nas concentrações seguintes, o comportamento da curva das fêmeas se mostrou consideravelmente distinto daquele visto em machos. Todas as concentrações acima de 0,01 μM testadas resultaram no mesmo efeito na taxa de exocitose de vesículas sinápticas. Dessa forma, estes resultados sugerem que as fêmeas se mostram menos sensíveis a altas concentrações do formoterol que os machos. Para confirmar que esta diferença entre os sexos é estatisticamente relevante, construímos curvas de regressão não-linear da porcentagem de fluorescência pela concentração do fármaco, e as submetemos a uma análise de covariância (ANCOVA). O modelo ANCOVA confirmou a diferença estatística entre machos e fêmeas na ação do fumarato de formoterol na indução de exocitose de vesículas sinápticas em junções neuromusculares ($p < 0,01$).

Essa disparidade encontrada entre os sexos possui inúmeras possíveis explicações. Quando estamos falando de sistema nervoso, existem diferenças entre machos e fêmeas que vão desde a sensibilidade da ativação de receptores até a mecanismos de regulação de sistemas inteiros. MARTIN & HAYWOOD (1992) demonstrou que após estimulação do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA), machos apresentam um maior aumento nos níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina quando comparados com fêmeas. Além disso, após tratamento com clonidina, um agonista α_2 , mulheres apresentaram uma maior diminuição dos níveis plasmáticos de noradrenalina (DEL RIO *et al.*, 1994). O fármaco clonidina é capaz de regular negativamente a atividade do sistema nervoso simpático através de mecanismos centrais (ESLER *et al.*, 1990). Esta literatura indica que as vias responsáveis pela regulação do sistema nervoso simpático parecem ser menos sensíveis a estímulos excitatórios e mais sensíveis a estímulos inibitórios em fêmeas quando comparadas com machos. Há também diferenças sexuais no armazenamento e na liberação de catecolaminas. YUE *et al.* (2022) demonstrou, através de eletroquímica de vesícula única, uma diferença na liberação de

neurotransmissor durante a exocitose relacionada a diferença nos níveis de expressão de canais de cálcio sensíveis a voltagem. Um único evento de exocitose de células cromafins se mostrou estatisticamente mais longo em preparações de ratos machos do que as de ratos fêmeas. A estimulação dos receptores adrenérgicos- β_2 na resistência vascular através do uso de agonista também sofre variação dependente do sexo e, entre mulheres, dependente da fase do ciclo menstrual (KNEALE *et al.*, 2000). Ainda são escassos os estudos dos agonistas- β_2 especificamente no músculo esquelético, entretanto como há dimorfismo sexual na sensibilidade do receptor no endotélio, é uma hipótese que o mesmo possa estar acontecendo nas JNMs. As distinções entre os sexos não se limitam ao sistema nervoso. A comunicação do sistema nervoso com o sistema muscular é uma via de mão dupla na qual os impactos de alterações são mútuos. Dessa forma, ainda são necessários estudos mais aprofundados para definir a origem dos contrastes que encontramos com relação a ação do formoterol em JNMs, mas podemos afirmar que as possíveis explicações são múltiplas já que que o dimorfismo sexual existe até mesmo a nível da química das vesículas.

O próximo passo do nosso trabalho foi investigar os efeitos da ativação do adrenoceptor- β_2 na exocitose de vesículas sinápticas induzidas por KCl. Para isso, executamos os experimentos com a sonda FM1-43 nos mesmo parâmetros, mas submetemos os tecidos marcados ao KCl em uma concentração constante de 60 mM, associado ao formoterol, em concentrações crescentes. Neste caso, obtivemos resultados semelhantes para machos e fêmeas. Em ambos os sexos, houve uma somação entre os efeitos do formoterol e do KCl mostrando que o formoterol associado ao KCl é capaz de aumentar a taxa de exocitose ainda mais do que o KCl como estímulo indutor isolado (FIGURA 18 e 20). Soluções com altas concentrações de KCl são rotineiramente utilizadas como método para evocar a exocitose de vesículas sinápticas em terminações nervosas de maneira independente de Na^+ (NICHOLLS, 1993). Estes resultados indicam que o sistema nervoso simpático atua na função das JNMs através do aumento tanto da exocitose espontânea, quanto da exocitose induzida. Além disso, a somação entre os efeitos do KCl e do formoterol foi o primeiro indício que obtivemos do mecanismo de ação pelo qual o formoterol atua. O aumento da exocitose com a associação dos estímulos é um indicativo de que o formoterol atua em vias distintas as do KCl.

Com o objetivo de desvendar o mecanismo de ação pelo qual a ativação do adrenoceptor- β_2 facilita a transmissão colinérgica muscular, avaliamos a importância do Ca^{2+} extracelular no efeito do formoterol e a possibilidade deste efeito ser dependente de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem. As FIGURAS 22 e 23 mostram, que na ausência de Ca^{2+} extracelular, o formoterol não foi capaz de promover a exocitose de vesículas sinápticas. Estes resultados nos indicam que a ação do formoterol ocorre de uma maneira dependente do Ca^{2+} externo e que os estoques intracelulares de Ca^{2+} apenas não são capazes de promover a exocitose estimulada pelo receptor- β_2 . Ademais, a inibição da

exocitose em meio sem Ca^{2+} indica que o influxo deste íon acontece no terminal nervoso em condições de repouso. Estas conclusões são corroboradas por RODRIGUES et al. (2020), em que o efeito de aumento da frequência de MEPP induzido por clenbuterol é inibido em um meio com ausência de Ca^{2+} .

Em seguida, para investigarmos os tipos específicos de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem envolvidos neste efeito utilizamos neurotoxina ω -Aga IVA a uma concentração de 200 nM. Nos terminais nervosos coexistem diversos tipo de canais para Ca^{2+} que desempenham papéis distintos na cinética de passagem deste íon pela membrana. A ω -Agatoxina IVA atua no bloqueio dos canais do tipo P/Q. Os subtipos bloqueados pela ω -Aga IVA são sabidamente importantes na liberação de acetilcolina pelos terminais de nervos motores em mamíferos adultos (KATZ *et al.*, 1996). Assim, as preparações nervo-músculo foram expostas ao formoterol na presença ω -Aga IVA após passarem pelo protocolo de marcação com FM1-43. A FIGURA 24 mostra que o efeito do formoterol foi completamente inibido pelo bloqueio dos canais P/Q em fêmeas. Entretanto, o efeito da ativação dos receptores- β_2 foi apenas parcialmente inibido em machos. Este resultado gerou a hipótese da atuação de mais canais para Ca^{2+} que seriam mediadores do efeito do formoterol na exocitose de vesículas sinápticas. WONG *et al.* (2014) reportou que os canais do tipo TRPV são responsáveis pela regulação da concentração de Ca^{2+} em uma célula em repouso, explicando como o Ca^{2+} extracelular regula o Ca^{2+} intracelular em uma condição de membrana polarizada com os canais sensíveis à voltagem fechados. Como determinamos que o formoterol possui um efeito de aumento tanto da exocitose espontânea quanto da exocitose induzida, os canais para Ca^{2+} podem estar agindo de forma complexa para que o efeito do simpatomimético seja alcançado. Está é uma das hipóteses para explicar o bloqueio apenas parcial da ação do formoterol em um contexto com a presença da ω -Aga IVA. Outra possível hipótese envolve a atuação das células de Schwann terminais. Ainda não se sabe se há ocorrência de adrenoceptores em células de Schwann terminais *in vivo*, mas eles já foram reportados em células *in vitro* (FINK *et al.*, 1999; YASUDA *et al.*, 1988). Já sabemos que é necessária uma regulada comunicação entre o axônio motor e as células de Schwann terminais para a homeostase de Ca^{2+} (CASTONGUAY & ROBITAILLE, 2001; KO & ROBITAILLE, 2015), mas os mecanismos para condutância de Ca^{2+} em repouso ainda é pouco compreendido. Determinar precisamente onde os adrenoceptores- β_2 se encontram na placa motora irá ajudar a definir como as células de Schwann afetam a sinalização de Ca^{2+} neste cenário de indução da exocitose nas junções neuromusculares (ARBOUR *et al.*, 2017). Ainda temos um longo caminho a percorrer para elucidar o mecanismo de ação de agonistas- β_2 no terminal pré-sináptico de placas motoras, entretanto estes resultados são os primeiros passos que guiaram nossos futuros experimentos.

Por fim, nós investigamos o impacto da ativação do adrenoceptor- β_2 sobre o aspecto morfológico das junções neuromusculares no plano ultraestrutural. A exposição tanto ao formoterol quanto ao controle positivo, KCl, foi de sete minutos para ser comparável aos demais experimentos com a sonda FM1-43 em que o tempo de exposição ao estímulo também era esse. A JNM madura normal um terminal pré-sináptica repleto de vesículas sinápticas e mitocôndrias, uma fenda sináptica e um terminal pós-sináptico, no qual podemos observar diversas invaginações na membrana do sarcolema formando as dobras juncionais recobertas por receptores nicotínicos para ACh. Em nosso trabalho, focamos em uma análise qualitativa do terminal pré-sináptico em que comparamos junções estimuladas por um estímulo conhecido, o KCl, e junções que foram expostas ao formoterol. Em ambos os contextos observamos marcadores de estímulo para exocitose como vacúolos e vesículas recobertas por clatrina. Após um evento intenso de exocitose, para reestabelecer os *pools* de vesículas, a célula nervosa sofre a endocitose compensatória (RIZZOLI, 2014). Essa reciclagem de vesículas após exocitose pode acontecer através do modelo *kiss-and-run*, endocitose mediada por clatrina e endocitose via grandes invaginações de membrana. O modelo de endocitose que irá acontecer depende da força do estímulo para exocitose (HEUSER & REESE, 1973). Dessa forma, a presença de grandes vacúolos no qual brotam novas vesículas e vesículas recobertas por clatrina é um marcador de endocitose compensatória consequência de um estímulo para exocitose. A semelhança da morfologia entre as junções expostas ao KCl e as expostas ao formoterol é um indício de que a ativação dos adrenoceptores β_2 é um estímulo capaz de gerar alterações no plano ultraestrutural das placas motoras diafragmáticas de camundongos.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra, através do uso de sondas fluorescentes e microscopia eletrônica de transmissão, que o simpatomimético agonista específico β_2 fumarato de formoterol, apresenta ações sinápticas capazes de induzir a exocitose de vesículas sinápticas contendo acetilcolina em junções neuromusculares diafragmáticas em animais machos e fêmeas. Este efeito se mostrou dependente da concentração do fármaco em machos, mas não em fêmeas. Nossos resultados indicam que animais fêmeas são menos sensíveis aos efeitos da ativação do adrenoceptor- β_2 . Ao analisar a associação do formoterol ao KCl, verificamos que o efeito do simpatomimético não se restringe à exocitose espontânea, tendo efeitos também na exocitose induzida. Além disso, nossos experimentos mostraram que este efeito indutor de exocitose do agonista formoterol é dependente do Ca^{2+} extracelular e depende parcialmente dos canais para Ca^{2+} P/Q. Dessa forma, este estudo oferece novos dados acerca dos efeitos de agonistas β_2 no terminal pré-sináptico de JNMs, dando mais um passo para elucidar o mecanismo de ação pelo qual o sistema nervoso simpático modula essa comunicação e novos indícios que demonstram que esta classe de fármacos é uma promissora estratégia terapêutica para o tratamento de doenças que acometem o sistema neuromuscular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLQUIST RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 1948 Jun;153(3):586-600. doi: 10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586. PMID: 18882199.

ALABI AA, TSIEN RW. Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:393-422. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153305. PMID: 23245563.

ANDERSON GP. Formoterol: pharmacology, molecular basis of agonism, and mechanism of long duration of a highly potent and selective beta 2-adrenoceptor agonist bronchodilator. *Life Sci.* 1993;52(26):2145-60. doi: 10.1016/0024-3205(93)90729-m. PMID: 8099696.

BARDSLEY RG, ALLCOCK SM, DAWSON JM, DUMELOW NW, HIGGINS JA, LASSLETT YV, LOCKLEY AK, PARR T, BUTTERY PJ. Effect of beta-agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. *Biochimie.* 1992 Mar;74(3):267-73. doi: 10.1016/0300-9084(92)90125-x. PMID: 1351750.

BENNETT, M.V.L. Gap junctions as electrical synapses. *J Neurocytol* **26**, 349–366 (1997). <https://doi.org/10.1023/A:1018560803261>

BENNETT MK, CALAKOS N, SCHELLER RH. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science.* 1992 Jul 10;257(5067):255-9. doi: 10.1126/science.1321498. PMID: 1321498.

BILODEAU PA, COYNE ES, WING SS. The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Sep 1;311(3):C392-403. doi: 10.1152/ajpcell.00125.2016. Epub 2016 Aug 10. PMID: 27510905.

BIRKS R, KATZ B, MILEDI R. Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. *J Physiol*. 1960 Jan;150(1):145-68. doi: 10.1113/jphysiol.1960.sp006379. PMID: 13800902; PMCID: PMC1363153.

BIRKS R., MACINTOSH F. C.. ACETYLCHOLINE METABOLISM OF A SYMPATHETIC GANGLION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 39(4): 787-827. <https://doi.org/10.1139/o61-081>

BLAKELY RD, EDWARDS RH. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Feb 1;4(2):a005595. doi: 10.1101/cshperspect.a005595. PMID: 22199021; PMCID: PMC3281572.

BRAULT JJ, JESPERSEN JG, GOLDBERG AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biol Chem*. 2010 Jun 18;285(25):19460-71. doi: 10.1074/jbc.M110.113092. Epub 2010 Apr 19. PMID: 20404331; PMCID: PMC2885225.

BODINE SC, STITT TN, GONZALEZ M, KLINE WO, STOVER GL, BAUERLEIN R, ZLOTCHENKO E, SCRIMGEOUR A, LAWRENCE JC, GLASS DJ, YANCOPOULOS GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*. 2001 Nov;3(11):1014-9. doi: 10.1038/ncb1101-1014. PMID: 11715023.

CAIRNS SP, BORRANI F. β -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: key role of excitation-contraction coupling. *J Physiol*. 2015 Nov 1;593(21):4713-27. doi: 10.1113/JP270909. PMID: 26400207; PMCID: PMC4626548.

CECCARELLI, B.; HULBURT, W. P.; MAURO, A. Turnover of transmitter and *Cell Biology*, v. 133, p. 1237-1250, 1996.

CHANADAY NL, COUSIN MA, MILOSEVIC I, WATANABE S, MORGAN JR. The Synaptic Vesicle Cycle Revisited: New Insights into the Modes and Mechanisms. *J Neurosci*. 2019 Oct 16;39(42):8209-8216. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1158-19.2019. PMID: 31619489; PMCID: PMC6794917.

CHANADAY NL, KAVALALI ET. Presynaptic origins of distinct modes of neurotransmitter release. *Curr Opin Neurobiol.* 2018 Aug;51:119-126. doi: 10.1016/j.conb.2018.03.005. Epub 2018 Mar 26. PMID: 29597140; PMCID: PMC6066415.

CHEN AE, GINTY DD, FAN CM. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature.* 2005 Jan 20;433(7023):317-22. doi: 10.1038/nature03126. Epub 2004 Nov 28. PMID: 15568017.

CHRUSCINSKI AJ, ROHRER DK, SCHAUBLE E, DESAI KH, BERNSTEIN D, KOBILKA BK. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem.* 1999 Jun 11;274(24):16694-700. doi: 10.1074/jbc.274.24.16694. PMID: 10358008.

CLAUSEN T. The sodium pump keeps us going. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;986:595-602. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07258.x. PMID: 12763894.

COLLIER B, KATZ HS. Acetylcholine synthesis from recaptured choline by a sympathetic ganglion. *J Physiol.* 1974 May;238(3):639-55. doi: 10.1113/jphysiol.1974.sp010548. PMID: 4850387; PMCID: PMC1330907.

DAAKA Y, LUTTRELL LM, LEFKOWITZ RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature.* 1997 Nov 6;390(6655):88-91. doi: 10.1038/36362. PMID: 9363896.

DENKER A, RIZZOLI SO. Synaptic vesicle pools: an update. *Front Synaptic Neurosci.* 2010 Oct 5;2:135. doi: 10.3389/fnsyn.2010.00135. PMID: 21423521; PMCID: PMC3059705.

DISATNIK MH, SAMPSON SR, SHAINBERG A. Characterization of beta-adrenoceptors on rat skeletal muscle cells grown in vitro. *Biochem Pharmacol.* 1990 Sep 1;40(5):1043-8. doi: 10.1016/0006-2952(90)90491-3. PMID: 1975171.

FESCE R, GROHOVAZ F, VALTORTA F, MELDOLESI J. Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends Cell Biol.* 1994 Jan;4(1):1-4. doi: 10.1016/0962-8924(94)90025-6. PMID: 14731821.

FOWLER RA, GUEST CB, LAPINSKY SE, SIBBALD WJ, LOUIE M, TANG P, SIMOR AE, STEWART TE. Transmission of severe acute respiratory syndrome during intubation and mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Jun 1;169(11):1198-202. doi: 10.1164/rccm.200305-715OC. Epub 2004 Feb 27. PMID: 14990393.

GARCIA ML, KING VF, SHEVELL JL, SLAUGHTER RS, SUAREZ-KURTZ G, WINQUIST RJ, KACZOROWSKI GJ. Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J Biol Chem*. 1990 Mar 5;265(7):3763-71. PMID: 2154487.

GARNER, C. C.; KINDLER, S.; GUNDELFINGER, E. D. Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 10, p. 321-327, 2000.

GILSON H, SCHAKMAN O, KALISTA S, LAUSE P, TSUCHIDA K, THISSEN JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jul;297(1):E157-64. doi: 10.1152/ajpendo.00193.2009. Epub 2009 May 12. PMID: 19435857.

GONÇALVES DA, SILVEIRA WA, LIRA EC, GRAÇA FA, PAULA-GOMES S, ZANON NM, KETTELHUT IC, NAVEGANTES LC. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jan 1;302(1):E123-33. doi: 10.1152/ajpendo.00188.2011. Epub 2011 Sep 27. PMID: 21952035.

GONÇALVES DA, SILVEIRA WA, MANFREDI LH, GRAÇA FA, ARMANI A, BERTAGGIA E, O NEILL BT, LAUTHERBACH N, MACHADO J, NOGARA L, PEREIRA MG, ARCIDIACONO D, REALDON S, KAHN CR, SANDRI M, KETTELHUT IC, NAVEGANTES LCC. Insulin/IGF1 signalling mediates the effects of β_2 -adrenergic agonist on muscle proteostasis and growth. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019 Apr;10(2):455-475. doi: 10.1002/jcsm.12395. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30932373; PMCID: PMC6463755.

GOODENOUGH DA, PAUL DL. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Jul;1(1):a002576. doi: 10.1101/cshperspect.a002576. PMID: 20066080; PMCID: PMC2742079.

GRANSETH B, ODERMATT B, ROYLE SJ, LAGNADO L. Clathrin-mediated endocytosis: the physiological mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *J Physiol*. 2007 Dec 15;585(Pt 3):681-6. doi: 10.1113/jphysiol.2007.139022. Epub 2007 Jun 28. PMID: 17599959; PMCID: PMC2375507.

HALL ZW, SANES JR. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*. 1993 Jan;72 Suppl:99-121. doi: 10.1016/s0092-8674(05)80031-5. PMID: 8428377.

HEKING PW, WENER RR, AMELINK M, ZWINDERMAN AH, BOUVY ML, BEL EH. The prevalence of severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Apr;135(4):896-902. doi: 10.1016/j.jaci.2014.08.042. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25441637.

HEUSER JE. Review of electron microscopic evidence favouring vesicle exocytosis as the structural basis for quantal release during synaptic transmission. *Q J Exp Physiol*. 1989 Dec;74(7):1051-69. doi: 10.1113/expphysiol.1989.sp003333. PMID: 2560556.

HEUSER, J. E.; REESE T. S. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane

HOLDERITH N, LORINCZ A, KATONA G, RÓZSA B, KULIK A, WATANABE M, NUSSER Z. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat Neurosci*. 2012 Jun 10;15(7):988-97. doi: 10.1038/nn.3137. Erratum in: *Nat Neurosci*. 2016 Jan;19(1):172. PMID: 22683683; PMCID: PMC3386897.

HOSTRUP M, KALSEN A, AUCHENBERG M, BANGSBO J, BACKER V. Effects of acute and 2-week administration of oral salbutamol on exercise performance and muscle strength in athletes. *Scand J Med Sci Sports*. 2016 Jan;26(1):8-16. doi: 10.1111/sms.12298. Epub 2014 Jul 31. PMID: 25077918.

JAHN, R., FASSHAUER, D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201–207 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11320>

JAHN R, SÜDHOF TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:863-911. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.863. PMID: 10872468.

JAHROMI BS, ROBITAILLE R, CHARLTON MP. Transmitter release increases intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*. 1992 Jun;8(6):1069-77. doi: 10.1016/0896-6273(92)90128-z. PMID: 1351731.

JOHNSON M. Beta2-adrenoceptors: mechanisms of action of beta2-agonists. *Paediatr Respir Rev*. 2001 Mar;2(1):57-62. doi: 10.1053/prrv.2000.0102. PMID: 16263481.

JOHNSON M, BUTCHERS PR, COLEMAN RA, NIALS AT, STRONG P, SUMNER MJ, VARDEY CJ, WHELAN CJ. The pharmacology of salmeterol. *Life Sci*. 1993;52(26):2131-43. doi: 10.1016/0024-3205(93)90728-l. PMID: 8099695.

JOHNSON P, HAMMER JL. Inhibitory effects of spermine and spermidine on muscle calpain II. *Experientia*. 1990 Mar 15;46(3):276-8. doi: 10.1007/BF01951764. PMID: 2311718.

KISSEL JT, MCDERMOTT MP, MENDELL JR, KING WM, PANDYA S, GRIGGS RC, TAWIL R; FSH-DY Group. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of albuterol in facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology*. 2001 Oct 23;57(8):1434-40. doi: 10.1212/wnl.57.8.1434. PMID: 11673585.

KOBILKA BK, DIXON RA, FRIELLE T, DOHLMAN HG, BOLANOWSKI MA, SIGAL IS, YANG-FENG TL, FRANCKE U, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jan;84(1):46-50. doi: 10.1073/pnas.84.1.46. PMID: 3025863; PMCID: PMC304138.

KOKOTOS AC, COUSIN MA. Synaptic vesicle generation from central nerve terminal endosomes. *Traffic*. 2015 Mar;16(3):229-40. doi: 10.1111/tra.12235. Epub 2014 Nov 27. PMID: 25346420.

KOOPMAN R, GEHRIG SM, LÉGER B, TRIEU J, WALRAND S, MURPHY KT, LYNCH GS. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice. *J Physiol*. 2010 Dec 1;588(Pt 23):4811-23. doi: 10.1113/jphysiol.2010.196725. Epub 2010 Oct 11. PMID: 20937713; PMCID: PMC3010148.

KUMMER TT, MISGELD T, SANES JR. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr Opin Neurobiol.* 2006 Feb;16(1):74-82. doi: 10.1016/j.conb.2005.12.003. Epub 2005 Dec 28. PMID: 16386415.

LANDS AM, ARNOLD A, MCAULIFF JP, LUDUENA FP, BROWN TG JR. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 1967 May 6;214(5088):597-8. doi: 10.1038/214597a0. PMID: 6036174.

LEZZI S, DI PADOVA M, SERRA C, CARETTI G, SIMONE C, MAKLANE E, MINETTI G, ZHAO P, HOFFMAN EP, PURI PL, SARTORELLI V. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev Cell.* 2004 May;6(5):673-84. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00107-8. PMID: 15130492.

LI L, CHIN LS. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 2003 May;60(5):942-60. doi: 10.1007/s00018-003-2240-7. PMID: 12827282.

LOSAVIO A, MUCHNIK S, 1997 Spontaneous acetylcholine release in mammalian neuromuscular junctions. *Am J Physiol* 273, C1835–1841. [PubMed: 9435487]

MACIEL FV, RAMOS PINTO ÊK, VALÉRIO SOUZA NM, GONÇALVES DE ABREU TA, ORTOLANI PL, FORTES-DIAS CL, GARRIDO CAVALCANTE WL. Varespladib (LY315920) prevents neuromuscular blockage and myotoxicity induced by crotoxin on mouse neuromuscular preparations. *Toxicon.* 2021 Oct 30;202:40-45. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.09.009. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34562493.

MALMBERG AB, BRANDON EP, IDZERDA RL, LIU H, MCKNIGHT GS, BASBAUM AI. Diminished inflammation and nociceptive pain with preservation of neuropathic pain in mice with a targeted mutation of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci.* 1997 Oct 1;17(19):7462-70. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-19-07462.1997. PMID: 9295392; PMCID: PMC6573437.

MARTIN WH 3RD, SPINA RJ, KORTE E, YARASHESKI KE, ANGELOPOULOS TJ, NEMETH PM, SAFFITZ JE. Mechanisms of impaired exercise capacity in short duration experimental

hyperthyroidism. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):2047-53. doi: 10.1172/JCI115533. PMID: 1752962; PMCID: PMC295798.

MARTINEAU L, HORAN MA, ROTHWELL NJ, LITTLE RA. Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Nov;83(5):615-21. doi: 10.1042/cs0830615. Erratum in: *Clin Sci* 1993 Jun;84(6):following XX. PMID: 1335400.

NAVEGANTES LC, RESANO NM, MIGLIORINI RH, KETTELHUT IC. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5):E883-9. doi: 10.1152/ajpendo.1999.277.5.E883. PMID: 10567016.

NICHOLSON-FISH JC, KOKOTOS AC, GILLINGWATER TH, SMILLIE KJ, COUSIN MA. VAMP4 Is an Essential Cargo Molecule for Activity-Dependent Bulk Endocytosis. *Neuron*. 2015 Dec 2;88(5):973-984. doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.043. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26607000; PMCID: PMC4678114.

NONOGAKI K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*. 2000 May;43(5):533-49. doi: 10.1007/s001250051341. PMID: 10855527.

O'BRIEN J. The ever-changing electrical synapse. *Curr Opin Neurobiol*. 2014 Dec;29:64-72. doi: 10.1016/j.conb.2014.05.011. Epub 2014 Jun 21. PMID: 24955544; PMCID: PMC4252917.

OHNUKI Y, UMEKI D, MOTOTANI Y, JIN H, CAI W, SHIOZAWA K, SUITA K, SAEKI Y, FUJITA T, ISHIKAWA Y, OKUMURA S. Role of cyclic AMP sensor Epac1 in masseter muscle hypertrophy and myosin heavy chain transition induced by β 2-adrenoceptor stimulation. *J Physiol*. 2014 Dec 15;592(24):5461-75. doi: 10.1113/jphysiol.2014.282996. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25344550; PMCID: PMC4270506.

PANG & SUDHOF. Cell biology of Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 22, Issue 4, August 2010, Pages 496–505

PARNAS H, PARNAS I. The chemical synapse goes electric: Ca^{2+} - and voltage-sensitive GPCRs control neurotransmitter release. *Trends Neurosci*. 2007 Feb;30(2):54-61. doi: 10.1016/j.tins.2006.12.001. Epub 2006 Dec 13. PMID: 17169441.

PAUWELS RA, LÖFDAHL CG, POSTMA DS, TATTERSFIELD AE, O'BYRNE P, BARNES PJ, ULLMAN A. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med*. 1997 Nov 13;337(20):1405-11. doi: 10.1056/NEJM199711133372001. Erratum in: *N Engl J Med* 1998 Jan 8;338(2):139. PMID: 9358137.

PEAREN MA, MYERS SA, RAICHUR S, RYALL JG, LYNCH GS, MUSCAT GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology*. 2008 Jun;149(6):2853-65. doi: 10.1210/en.2007-1202. Epub 2008 Mar 6. PMID: 18325999.

PEREDA AE, CURTI S, HOGE G, CACHOPE R, FLORES CE, RASH JE. Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Jan;1828(1):134-46. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.05.026. Epub 2012 May 31. Erratum in: *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1838(3):1056. PMID: 22659675; PMCID: PMC3437247.

PERIN MS, FRIED VA, MIGNERY GA, JAHN R, SÜDHOF TC. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*. 1990 May 17;345(6272):260-3. doi: 10.1038/345260a0. PMID: 2333096.

PONTREMOLI S, MELLONI E, VIOTTI PL, MICHETTI M, SALAMINO F, HORECKER BL. Identification of two calpastatin forms in rat skeletal muscle and their susceptibility to digestion by homologous calpains. *Arch Biochem Biophys*. 1991 Aug 1;288(2):646-52. doi: 10.1016/0003-9861(91)90247-g. PMID: 1898054.

REIST NE, SMITH SJ. Neurally evoked calcium transients in terminal Schwann cells at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug 15;89(16):7625-9. doi: 10.1073/pnas.89.16.7625. PMID: 1502174; PMCID: PMC49763.

REYNOLDS ML, WOOLF CJ. Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate. *J Neurocytol*. 1992 Jan;21(1):50-66. doi: 10.1007/BF01206897. PMID: 1346630.

RIVEROS N, FIEDLER J, LAGOS N, MUÑOZ C, ORREGO F. Glutamate in rat brain cortex synaptic vesicles: influence of the vesicle isolation procedure. *Brain Res.* 1986 Oct 29;386(1-2):405-8. doi: 10.1016/0006-8993(86)90181-2. PMID: 2877717.

RIZZOLI SO. Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *EMBO J.* 2014 Apr 16;33(8):788-822. doi: 10.1002/embj.201386357. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24596248; PMCID: PMC4194108.

RÖDER IV, CHOI KR, REISCHL M, PETERSEN Y, DIEFENBACHER ME, ZACCOLO M, POZZAN T, RUDOLF R. Myosin Va cooperates with PKA R1alpha to mediate maintenance of the endplate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Feb 2;107(5):2031-6. doi: 10.1073/pnas.0914087107. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20133847; PMCID: PMC2836699.

RODRIGUES AZC, WANG ZM, MESSI ML, DELBONO O. Sympathomimetics regulate neuromuscular junction transmission through TRPV1, P/Q- and N-type Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci.* 2019 Mar;95:59-70. doi: 10.1016/j.mcn.2019.01.007. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30763691; PMCID: PMC6394868.

ROMMEL C, BODINE SC, CLARKE BA, ROSSMAN R, NUNEZ L, STITT TN, YANCOPOULOS GD, GLASS DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* 2001 Nov;3(11):1009-13. doi: 10.1038/ncb1101-1009. PMID: 11715022.

ROTHMAN JE, WARREN G. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol.* 1994 Mar 1;4(3):220-33. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00051-8. PMID: 7922327.

ROYLE SJ, LAGNADO L. Endocytosis at the synaptic terminal. *J Physiol.* 2003 Dec 1;553(Pt 2):345-55. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049221. Epub 2003 Sep 8. PMID: 12963793; PMCID: PMC2343565.

RUDOLF R, MAGALHÃES PJ, POZZAN T. Direct in vivo monitoring of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and cytosolic cAMP dynamics in mouse skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2006 Apr 24;173(2):187-93. doi: 10.1083/jcb.200601160. Epub 2006 Apr 17. PMID: 16618815; PMCID: PMC2063810.

RYALL JG, SCHERTZER JD, LYNCH GS. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology*. 2008 Aug;9(4):213-28. doi: 10.1007/s10522-008-9131-0. Epub 2008 Feb 26. PMID: 18299960.

SANDRI M, LIN J, HANDSCHIN C, YANG W, ARANY ZP, LECKER SH, GOLDBERG AL, SPIEGELMAN BM. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 31;103(44):16260-5. doi: 10.1073/pnas.0607795103. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17053067; PMCID: PMC1637570.

SCHWEIZER FE, RYAN TA. The synaptic vesicle: cycle of exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*. 2006 Jun;16(3):298-304. doi: 10.1016/j.conb.2006.05.006. Epub 2006 May 16. PMID: 16707259.

SOLIS-COHEN S. The use of adrenal substance in the treatment of asthma. 1900. *J Asthma*. 1990;27(6):401-406; discussion 399. doi: 10.3109/02770909009073358. Erratum in: *J Asthma* 1991;28(3):237. PMID: 2266071.

SÖLLNER T, BENNETT MK, WHITEHEART SW, SCHELLER RH, ROTHMAN JE. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 1993 Nov 5;75(3):409-18. doi: 10.1016/0092-8674(93)90376-2. PMID: 8221884.

STEVENS TH, FORGAC M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:779-808. doi: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.779. PMID: 9442887.

STRADER CD, CANDELORE MR, HILL WS, SIGAL IS, DIXON RA. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 1989 Aug 15;264(23):13572-8. PMID: 2547766.

STRASSER RH, BENOVIC JL, LEFKOWITZ RJ, CARON MG. The beta-adrenergic receptor kinase: role in homologous desensitization in S49 lymphoma cells. *Adv Exp Med Biol*. 1988;231:503-17. doi: 10.1007/978-1-4684-9042-8_43. PMID: 2843012.

STROSBERG AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci.* 1993 Aug;2(8):1198-209. doi: 10.1002/pro.5560020802. PMID: 8401205; PMCID: PMC2142449.

SUTTON RB, FASSHAUER D, JAHN R, BRUNGER AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1998 Sep 24;395(6700):347-53. doi: 10.1038/26412. PMID: 9759724.

SÜDHOF TC. The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014 Nov 17;53(47):12696-717. doi: 10.1002/anie.201406359. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25339369.

SÜDHOF TC, ROTHMAN JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science.* 2009 Jan 23;323(5913):474-7. doi: 10.1126/science.1161748. PMID: 19164740; PMCID: PMC3736821.

TAKEI K, MUNDIGL O, DANIELL L, DE CAMILLI P. The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *J Cell Biol.* 1996 Jun;133(6):1237-50. doi: 10.1083/jcb.133.6.1237. PMID: 8682861; PMCID: PMC2120898.

TEBAR F, SORKINA T, SORKIN A, ERICSSON M, KIRCHHAUSEN T. Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J Biol Chem.* 1996 Nov 15;271(46):28727-30. doi: 10.1074/jbc.271.46.28727. PMID: 8910509.

TOEI M, SAUM R, FORGAC M. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry.* 2010 Jun 15;49(23):4715-23. doi: 10.1021/bi100397s. PMID: 20450191; PMCID: PMC2907102.

TRIMBLE WS, COWAN DM, SCHELLER RH. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun;85(12):4538-42. doi: 10.1073/pnas.85.12.4538. PMID: 3380805; PMCID: PMC280466.

WEIMBS T, LOW SH, CHAPIN SJ, MOSTOV KE, BUCHER P, HOFMANN K. A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: a new superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3046-51. doi: 10.1073/pnas.94.7.3046. PMID: 9096343; PMCID: PMC20319.

WONG JA, GOSMANOV AR, SCHNEIDER EG, THOMASON DB. Insulin-independent, MAPK-dependent stimulation of NKCC activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Aug;281(2):R561-71. doi: 10.1152/ajpregu.2001.281.2.R561. PMID: 11448861.

ZHAI RG, BELLEN HJ. The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)*. 2004 Oct;19:262-70. doi: 10.1152/physiol.00014.2004. PMID: 15381754.

ZOUHAL H, JACOB C, DELAMARCHE P, GRATAS-DELAMARCHE A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med*. 2008;38(5):401-23. doi: 10.2165/00007256-200838050-00004. PMID: 18416594.

8. ANEXO 1: Artigo publicado durante o mestrado



Received: 14 January 2022 | Accepted: 21 April 2022

DOI: 10.1113/EP090327



RESEARCH ARTICLE

Neuroprotective effect of CTK 01512-2 recombinant toxin at the spinal cord in a model of Huntington's disease

Julianne V. Joviano-Santos¹ | Priscila A. C. Valadão¹ |
 Matheus P. S. Magalhães-Gomes¹ | Lorena F. Fernandes² | Danuza M. Diniz³ |
 Thatiane C. G. Machado¹ | Kivia B. Soares¹ | Marina S. Ladeira¹ |
 Andre R. Massensini² | Marcus V. Gomez³ | Aline S. Miranda⁴ | Juan C. Tápiá^{5,6} |
 Cristina Guatimosim¹

¹Laboratório de Biologia da Neurotransmissão, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, Belo Horizonte, MG

²Núcleo de Neurociências, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³IEP Santa Casa, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵Escuela de Medicina, Universidad de Talca, Talca, Chile

⁶Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA

Correspondence

Cristina Guatimosim, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil.
 Email: cguati@icb.ufmg.br, cguatimosim@gmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); ISN-Career Reentry Grant and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES; FONDECYT, Grant/Award Numbers: 1200951, 1160888

Edited by: James Jones

Abstract

$\text{Ph}\alpha 1\beta$ is a neurotoxin from the venom of the *Phoneutria nigriventer* spider, available as CTK 01512-2, a recombinant peptide. Owing to its antinociceptive and analgesic properties, CTK 01512-2 has been described to alleviate neuroinflammatory responses. Despite the diverse actions of CTK 01512-2 on the nervous system, little is known regarding its neuroprotective effect, especially in neurodegenerative conditions such as Huntington's disease (HD), a genetic movement disorder without cure. Here, we investigated whether CTK 01512-2 has a neuroprotective effect in a mouse model of HD. We hypothesized that spinal cord neurons might represent a therapeutic target, because the spinal cord seems to be involved in the motor symptoms of HD (BACHD) mice. We treated BACHD mice with CTK 01512-2 by intrathecal injection and performed in vivo motor behavioural and morphological analyses in the CNS (brain and spinal cord) and muscles. Our data showed that intrathecal injection of CTK 01512-2 significantly improved motor performance in the open field task. CTK 01512-2 protected neurons in the spinal cord (but not in the brain) from death, suggesting a local effect. CTK 01512-2 exerted its neuroprotective effect by inhibiting BACHD neuronal apoptosis, as revealed by a reduction in caspase-3 in the spinal cord. CTK 01512-2 was also able to revert BACHD muscle atrophy. In

© 2022 The Authors. Experimental Physiology © 2022 The Physiological Society.

Experimental Physiology, 2022, 107: 933–945.

wileyonlinelibrary.com/journal/eph | 933

conclusion, our data suggest a novel role for CTK 01512-2 acting directly in the spinal cord to ameliorate morphofunctional aspects of spinal cord neurons and muscles and improve the performance of BACHD mice in motor behavioural tests. Given that HD shares similar symptoms with many neurodegenerative conditions, the findings presented herein might also be applicable to other disorders.

KEYWORDS

BACHD mice, CTK 01512-2, Huntington's disease, muscles, neuropeptides, spinal cord

1 | INTRODUCTION

The toxins from venom of the spider *Phoneutria nigriventer* have a large spectrum of action (Gomez et al., 2002). Four different neurotoxic fractions (known as PnTx3-1, Tx3-3, Tx3-4 and Tx3-5) have been described, with significant pharmacological potential (Rezende Júnior et al., 1991). Within the PnTx3 fraction, the PnTx3-6 isoform, known as Ph α 1 β , had significant antinociceptive and analgesic activity in different models of pain in mice (da Silva Junior et al., 2020; Rigo et al., 2017; Tonello et al., 2017). Ultimately, the recombinant form of Ph α 1 β has been made available commercially (as CTK 01512-2), and it displays the same effects as the native form, which increases the possibility for further studies and applicability (Dallegrave et al., 2018; Rigo et al., 2017; Souza et al., 2008). CTK 01512-2, when injected intrathecally, exerted pronounced anti-inflammatory effects in a model of multiple sclerosis (Silva et al., 2018) and had a valuable antinociceptive and analgesic action in several models of pain, also after intrathecal injection (Antunes et al., 2020; Caminski et al., 2020; De Prá et al., 2019; Ricardo Carvalho et al., 2021; Tonello et al., 2017). Importantly, the molecular basis of the action of this isoform involves blockage of voltage-gated calcium channels (VGCCs), with higher specificity for the N-type (Vieira et al., 2005), and antagonism of the receptor TRPA1 (Tonello et al., 2017). Calcium is an important regulator of cell signalling, and its role in neurological diseases has been reviewed extensively (Pchitskaya et al., 2018; Schrank et al., 2020). Owing to the action of CTK 01512-2 on calcium channels, and considering that VGCCs are key players in calcium entry into neurons (Catterall, 2011), this isoform has been studied as a potential drug for neurodegenerative disorders (Antunes et al., 2021; Silva et al., 2018), including Huntington's disease (HD) (Joviano-Santos et al., 2021).

Huntington's disease is a hereditary autosomal dominant, neurodegenerative condition caused by a mutation provoking an extension of the triplet CAG nucleotides in the huntingtin (*HTT*) gene, which then encodes a polyglutamine tail-stretch in the HTT protein (MacDonald et al., 1993). Usually, The CAG/polyglutamine expansion has 36–180 units in HD patients and 6–39 units in individuals without the disease (Bonilla, 2000). The prevalence of HD is ~5–10 cases per 100,000 people worldwide, hence it is considered a rare disease (Baig et al., 2017). However, HD has a widespread distribution in some localities, such as in Lake Maracaibo, Zulia State, Venezuela

(Okun & Thommi, 2004; Paradisi et al., 2008). Two hallmarks of HD are the formation of neuronal insoluble toxic HTT aggregates and glutamatergic excitotoxicity with calcium imbalance. Both events have been associated with the progressive neuronal loss described for this condition (Creus-Muncunill & Ehrlich, 2019; Hutten & Dormann, 2020; Ross & Tabrizi, 2011; Zaman et al., 2019). The main brain regions affected in HD are the striatum and cortex (Margolis & Ross, 2003); however, recent reports have described several alterations in the spinal cord, neuromuscular junctions, skeletal and cardiac muscles in an HD-transgenic mouse model, the BACHD^{Q97} (BACHD) mouse (de Aragão et al., 2016; Joviano-Santos et al., 2019; Valadão et al., 2017; Valadão et al., 2018; Valadão et al., 2019). The BACHD mouse expresses the human mutant HTT and presents slow disease progression, therefore being a valuable and unique model for investigating HD (Gray et al., 2008).

Currently, there is no cure for HD, and the available treatments are palliative and mainly focus on the symptoms. The symptoms of HD are characterized by chorea, motor incoordination, and cognitive and behavioural abnormalities (Finkbeiner, 2011; Walker, 2007). Usually, dopaminergic receptor blockers (neuroleptic drugs) or monoamine-depleting agents (e.g., deutetrabenazine) are used to treat HD symptoms such as chorea. Antidepressants and anxiolytic drugs (e.g., benzodiazepines) are also prescribed (Frank, 2014; Potkin & Potkin, 2018). In this scenario, neuroprotective compounds that can preserve neuronal functioning might be promising disease-modifying candidates. There is a need for new therapeutic candidates that could prevent or minimize neuronal loss and motor symptoms. Therapeutic interventions independent of a high-risk brain approach can be an alternative and better option for the treatment of neuromuscular conditions; for example, by focusing on the spinal cord and skeletal muscles.

Here, we investigate whether CTK01512-2 is effective at inhibiting neuronal cell death and improving motor changes in the BACHD mouse model for HD. We focus on addressing whether spinal cord neurons might represent potential therapeutic targets. This is the first report to show that CTK 01512-2 has a neuroprotective effect, with a local site of action in BACHD spinal cord neurons. Our findings might contribute to the development of new approaches to treat the motor symptoms of HD outside the brain. Given that HD displays similar symptoms to other conditions, such as multiple sclerosis, Alzheimer's disease and Parkinson's disease (Ross & Poirier, 2004; Ross & Tabrizi, 2011;

Stephenson et al., 2018), the findings presented herein can also be expanded to other neurodegenerative disorders.

2 | METHODS

2.1 | Ethical approval

We used 11-month-old female littermates of the wild-type (WT, weighing 27–28 g) and the transgenic HD model, the BACHD^{Q97} mouse, weighing 41–42 g; FVB/NJ and FVB/N-Tg (HTT^{97Q}) IXwy/J, Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The animals were genotyped 10 days after birth using multiplex PCR (HTT-forward, CCGCTCAGGTTCTGCTTTTA; HTT-reverse, GGTCGGTGCAGCGGCTCCTC). Mice were kept in a facility with proper humidity and temperature, and a 12 h–12 h light–dark cycle, with food and water ad libitum. The experimental approaches were approved by our local animal ethics committee (CEUA-UFMG #25/2015). All experiments were carried out according to the guidelines laid down by our institution's animal welfare committee and conform to the principles and regulations, as described in the Editorial by Grundy (2015). No medication was used. Careful attention was paid to the animal facility; environmental enrichment was provided, and the animals were observed closely during the treatments.

2.2 | Experimental procedures

The WT and BACHD littermates, at 11 months old, were divided into the following four groups for treatments: WT-saline, WT-toxin, BACHD-saline and BACHD-toxin (see time line in Figure 1a). The recombinant version of Ph α 1 β toxin, CTK 01512-2 (Giotto Biotech, Florence, Italy) was used. CTK 01512-2 was diluted in saline (100 pmol per site). The dose of CTK 01512-2 used followed dose–response findings published in the literature (Diniz et al., 2014; Rigo et al., 2017). Treatments were conducted two times per week for 1 month. An intrathecal route, aiming to access the effects of the recombinant toxin directly on the spinal cord, was used. The injections were performed in a volume of 5 μ l per site (Hylden & Wilcox, 1980). The treatments were administered into the subarachnoid space through a puncture between the fifth and sixth lumbar vertebrae (L5–L6) using a Hamilton syringe (701LT) coupled to a 26-gauge needle. The correct perforation was indicated behaviourally by a typical tail movement by the mouse (Hylden & Wilcox, 1980). Experiments were performed during the light cycle time, starting at 09.00h.

2.3 | Motor behavioural procedures

The following behavioural tests were performed in the experimental groups of mice, as described elsewhere (Prado et al., 2006).

1. For the evaluation of muscle coordination and muscle strength, the wire-hang test was performed. For this, the animals were placed on an inverted grid and kept 45 cm above a smooth surface (with

New Findings

- **What is the central question of this study?**

We investigated the effects of intrathecal administration of a novel toxin, CTK 01512-2, in a mouse model of Huntington's disease. We asked whether spinal cord neurons can represent a therapeutic target, given that the spinal cord seems to be involved in motor symptoms of Huntington's disease. Pharmacological approaches focusing on the spinal cord and skeletal muscles might represent a more feasible strategy than a high-risk brain intervention.

- **What is the main finding and its importance?**

We provided evidence of a novel, local, neuroprotective effect of CTK 01512-2, paving a path for the development of approaches to treat motor symptoms of Huntington's disease beyond the brain.

wood shavings). The hanging time was recorded (in seconds) and corrected by each animal's body weight (to seconds per gram). Three trial measurements (with an interval of 10 min between trials) were averaged and used for the final quantification. The maximum time for each animal per trial recorded was 5 min. After this, the animal was removed and placed in a cage.

2. For motor coordination and motor-skill learning, the rotarod test was used. Animals were trained as described by Doria et al. (2015) and Menalled et al. (2010) (with minimal modifications), for 2 min at an accelerated rate (4–40 r.p.m. during 300 s) in five trials by day for three consecutive days (training days). On the third day (experimental day), the latency to fall was measured (in seconds). On the experimental day, three trials were averaged, with an interval of 10 min between trials.
3. For investigation of general activity, the open field task was chosen. An automatic locomotor box system (LE 8811 IR Motor Activity Monitors PANLAB, Harvard Apparatus, Spain), made of acrylic (450 mm \times 450 mm \times 200 mm), was used. The mean velocity and distance travelled by the animal for 20 min were recorded. Mice were permitted to explore the box voluntarily.

Importantly, for all motor behavioural procedures, mice were kept in the behaviour facility for \geq 60 min before measurements started ($n = 5$ animals per group, per treatment).

2.4 | Microscopic and immunofluorescence analyses

After the in vivo tests, the same animals ($n = 5$ animals per group, per treatment) were anaesthetized by inhalation of 1.5% isoflurane.

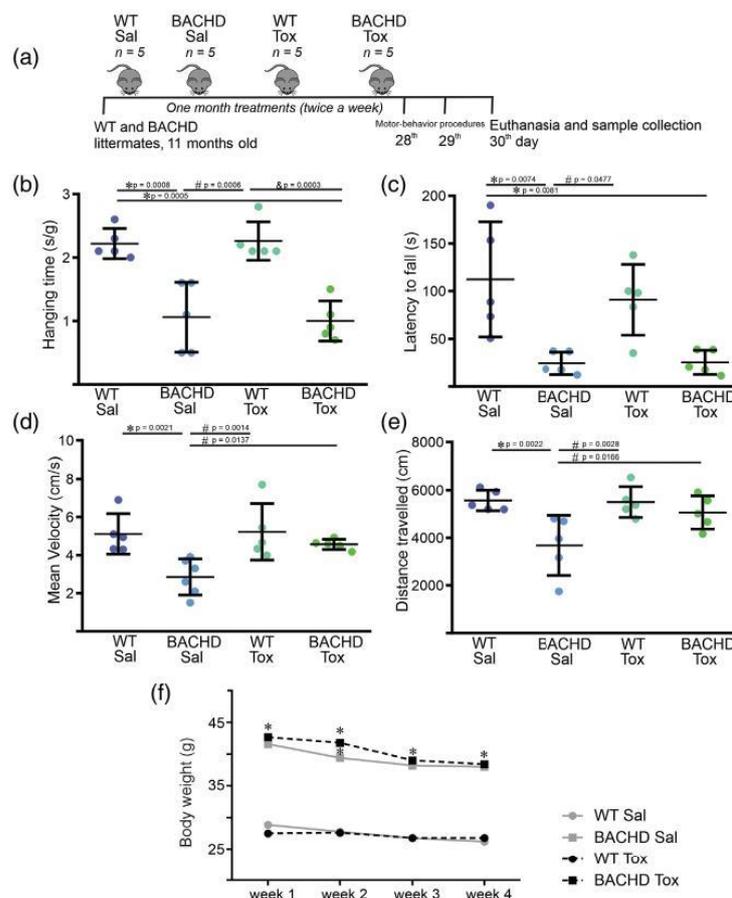


FIGURE 1 Injection of CTK 01512-2 improves motor performance in BACHD mice. (a) Treatment time line. (b) Hanging time in wire hanging test. (c) Latency to fall in rotarod test. (d) Mean velocity in open field test. (e) Distance travelled in open field test. (f) Graph quantifying body weight during the treatment. Data are expressed as the mean \pm SD; $n = 5$ animals per group, per treatment. * $P < 0.05$ compared with WT-Sal, # $P < 0.05$ compared with BACHD-Sal, and & $P < 0.05$ compared with WT-Tox. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test for body weight quantification. Abbreviations: Sal, saline; Tox, CTK 01512-2; WT, wild-type littermate

The depth of anaesthesia was verified by assessing the tail pinch reflex. Then, they were perfused with 4% paraformaldehyde in PBS. Afterwards, the animals were decapitated and the brain and spinal cord collected for the evaluation of the following regions: cortex, striatum and cervical (C1–C3) and lumbar (L1–L5) segments of the spinal cord. Samples were also incubated in paraformaldehyde overnight at 4°C before being placed in a 30% sucrose solution (in PBS) and again kept overnight at 4°C for cryopreservation. The brain and spinal cord were then fresh-frozen using isopentane and liquid nitrogen and stored at -80°C until they were sectioned. Using a Leica VT1000S vibratome, free-floating brain sections were collected (at 40 μm thickness). For spinal cord analyses, the segments were then embedded in Tissue-Tek optimum cutting temperature (OCT) medium and subsequently, serially sectioned using a Leica CM3050S cryostat (at 30 μm thickness). NeuN immunohistochemistry was then performed in both the brain and the spinal cord using a peroxidase protocol and the Vector Elite Kit (Doria et al., 2015). The mouse anti-NeuN (1:500; catalogue no. MAB377; Millipore, USA) primary antibody, with 2% horse serum and 3% bovine serum albumin, was processed in PBS. Immunostaining was detected using a chromogen (Vector SG substrate). The number of NeuN⁺ puncta per image was analysed using IMAGEJ software (NIH,

USA). All images were evaluated in a blinded manner. The number of images and the total area investigated are given in the figure legend for each experiment.

For caspase-3 immunofluorescence analyses ($n = 5$ animals per group, per treatment), cervical and lumbar segments were collected again and immediately immersed in neutral-buffered formalin overnight. Then, samples were dehydrated by graded ethanol (70, 80, 90 and 95% v/v), cleared in xylene, embedded in paraffin, and serially sectioned (at 5 μm thickness) in a microtome (model HM335E; Microm, Minneapolis, MN, USA). Non-specific antibody binding was blocked using a solution containing 2% bovine serum albumin and 0.1% Tween-20 in PBS for 60 min at 4°C. Next, samples were incubated with the primary antibody (1:100 polyclonal rabbit anti-caspase-3, catalogue no. C8487; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted in blocking solution and maintained overnight at 4°C. Subsequently, samples were washed three times in PBS and incubated with the secondary antibody (1:1000, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit; Invitrogen, Eugene, OR, USA) for 60 min. Finally, sections were washed three times in PBS and prepared for imaging. Images were analysed in a blinded manner in all histological experiments.

For muscle fibre analyses, the sternomastoideus (STM) and tibialis anterior (TA) skeletal muscles were removed and processed according to the protocol previously published (Valadão et al., 2017, 2019) ($n = 5$ animals per group, per treatment). We chose STM and TA because STM is innervated by motoneurons mostly from the cervical portion of the spinal cord and TA by motoneurons from the lumbar segment. After the fixation, muscles were dehydrated, embedded in glycolmethacrylate resin, and serially sectioned (at $5 \mu\text{m}$ thickness) using a microtome (model HM335E; Microm). Sections from the skeletal muscles were finally stained with Toluidine Blue (Electron Microscopy Sciences), and the cross-sectional area (CSA) of individual fibres was measured using a light microscope (Leica DM2500) coupled to a CCD camera (Leica DFC345FX). The CSA was measured using IMAGEJ software (NIH, USA).

2.5 | Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm SD. After the normality test (Kolmogorov-Smirnov test), data were analysed using a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. A two-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test was used for quantification of body weight among the treatments. The GRAPHPAD PRISM 8 program was used, and a P -value of <0.05 was set as significant. All P -values are displayed in Table 1.

3 | RESULTS

3.1 | Intrathecal CTK 01512-2 treatment prevented motor behavioural changes in BACHD mice

We injected CTK 01512-2 directly into the spinal cord of BACHD and WT mice during 1 month (Figure 1a). It is important to highlight that no side effects or unusual behaviours were observed upon the treatments. The BACHD-saline group displayed a significant impairment in all motor parameters analysed from the behavioural tests conducted when compared with the WT-saline group. Moreover, when comparing WT-saline versus WT-toxin groups, we did not observe any behavioural alteration, suggesting that the toxin has no apparent adverse effects. Regarding the wire-hanging test (Figure 1b), we found (in seconds per gram): WT-saline, 2.2 ± 0.2 ; BACHD-saline, 1.0 ± 0.5 ; WT-toxin, 2.2 ± 0.3 ; and BACHD-toxin, 1.0 ± 0.3 . In the rotarod test (Figure 1c), we found (in seconds): WT-saline, 112.4 ± 60.3 ; BACHD-saline, 24.3 ± 11.7 ; WT-toxin, 90.9 ± 37.1 ; and BACHD-toxin, 25.3 ± 12.6 . The BACHD-toxin animals showed significant improvements on the open field parameters mean velocity and distance travelled (Figure 1d,e, respectively), in comparison to BACHD-saline. These changes in the BACHD-toxin mice were nearly reverted to the WT level [mean velocity (in centimetres per second): WT-saline, 5.1 ± 1.0 ; BACHD-saline, 2.8 ± 0.9 ; WT-toxin, 5.2 ± 1.4 ; and BACHD-toxin, 4.5 ± 0.2 ;

TABLE 1 P -values from the experimental approaches

Parameter	P -value
Hanging time (s/g)	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0008
WT-Sal versus WT-Tox	0.9982
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.0005
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0006
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.9939
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0003
Latency to fall (s)	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0074
WT-Sal versus WT-Tox	0.7882
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.0081
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0477
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	>0.9999
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0519
Mean velocity (cm/s)	
BACHD-Sal versus WT-Sal	0.0021
WT-Tox versus WT-Sal	0.863
BACHD-Tox versus WT-Sal	0.4129
WT-Tox versus BACHD-Sal	0.0014
BACHD-Tox versus BACHD-Sal	0.0137
BACHD-Tox versus WT-Tox	0.3245
Distance travelled (cm)	
BACHD-Sal versus WT-Sal	0.0022
WT-Tox versus WT-Sal	0.9062
BACHD-Tox versus WT-Sal	0.3473
WT-Tox versus BACHD-Sal	0.0028
BACHD-Tox versus BACHD-Sal	0.0166
BACHD-Tox versus WT-Tox	0.4086
Body weight (g)	
Week 1	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0177
WT-Sal versus WT-Tox	0.5477
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.002
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0124
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.9826
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0015
Week 2	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0078
WT-Sal versus WT-Tox	0.9988
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.0053
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0104
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.8506
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0081

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Parameter	P-value
Week 3	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0079
WT-Sal versus WT-Tox	>0.9999
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.0036
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0113
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.99
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0059
Week 4	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0029
WT-Sal versus WT-Tox	0.9931
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.0031
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0067
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.9981
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0064
NeuN⁺ (number/area), cervical	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0031
WT-Sal versus WT-Tox	0.9998
WT-Sal versus BACHD-Tox	>0.9999
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0024
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.0033
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.9995
NeuN⁺ (number/area), lumbar	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0091
WT-Sal versus WT-Tox	0.8639
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.988
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0009
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.0217
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.6895
NeuN⁺ (number/area), striatum	
WT-Sal versus BACHD-Sal	<0.0001
WT-Sal versus WT-Tox	0.3897
WT-Sal versus BACHD-Tox	<0.0001
BACHD-Sal versus WT-Tox	<0.0001
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.4486
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0004
NeuN⁺ (number/area), cortex	
WT-Sal versus BACHD-Sal	<0.0001
WT-Sal versus WT-Tox	0.2867
WT-Sal versus BACHD-Tox	<0.0001
BACHD-Sal versus WT-Tox	0.0011
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.8876
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.0116

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Parameter	P-value
Caspase⁺ (number/area), cervical	
WT-Sal versus BACHD-Sal	<0.0001
WT-Sal versus WT-Tox	0.9739
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.9995
BACHD-Sal versus WT-Tox	<0.0001
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	<0.0001
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.9893
Caspase⁺ (number/area), lumbar	
WT-Sal versus BACHD-Sal	<0.0001
WT-Sal versus WT-Tox	0.7488
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.7031
BACHD-Sal versus WT-Tox	<0.0001
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.0002
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.1981
Cross-sectional area of sternomastoideus (μm^2)	
WT-Sal versus BACHD-Sal	0.0005
WT-Sal versus WT-Tox	0.9997
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.7713
BACHD-Sal versus WT-Tox	<0.0001
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	0.0011
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.5895
Cross-sectional area of tibialis anterior (μm^2)	
WT-Sal versus BACHD-Sal	<0.0001
WT-Sal versus WT-Tox	0.9985
WT-Sal versus BACHD-Tox	0.5208
BACHD-Sal versus WT-Tox	<0.0001
BACHD-Sal versus BACHD-Tox	<0.0001
WT-Tox versus BACHD-Tox	0.6296

Abbreviations: BACHD, BACHD^{Q97} mice; Sal, saline; Tox, CTK 01512-2; WT, wild-type littermate mice.

and distance travelled (in centimetres): WT-saline, $5,567 \pm 433.2$; BACHD-saline, $3,679 \pm 1,261.0$; WT-toxin, $5,505 \pm 647.4$; and BACHD-toxin, $5,065 \pm 698.2$).

We also observed that BACHD animals presented higher body weight when compared with WT age-matched mice (comparing WT-saline vs. BACHD-saline). When injected intrathecally, the toxin did not modulate the body weight, hence BACHD-saline and BACHD-toxin mice remained with higher body weights compared with WT counterpart animals, as shown in Figure 1f.

In conjunction, these sets of experiments indicate that intrathecal injection of the recombinant toxin CTK 01512-2 was capable of ameliorating some of the behavioural parameters (such as the open field test) that were altered in the HD mice.

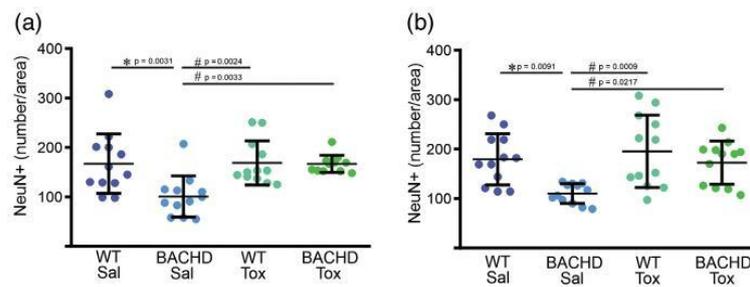


FIGURE 2 CTK 01512-2 has a local site of action and maintains the number of neurons in the spinal cord from BACHD mice. (a) Neuronal quantification in cervical segment. (b) Neuronal quantification in lumbar segment. Data are expressed as the mean \pm SD; $n = 5$ animals per group, per treatment. Twelve images were analysed (total area analysed $\sim 57,000 \mu\text{m}^2$). * $P < 0.05$ compared with WT-Sal, # $P < 0.05$ compared with BACHD-Sal. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Abbreviations: Sal, saline; Tox, CTK 01512-2; WT, wild-type littermate

3.2 | Neuroprotective effect of CTK 01512-2 in the spinal cord of the BACHD mouse line

Figure 2a,b shows the number of NeuN⁺ neurons/area of cervical and lumbar spinal segments, respectively, from the four groups of mice. We observed that when injected directly into the spinal cord, CTK 01512-2 preserved the number of neurons in the ventral horn of cervical and lumbar segments in BACHD mice. Interestingly, there was a statistically significant decrease in the reduction in the number of NeuN⁺ neurons in the BACHD-toxin animals, compared with the BACHD-saline group, in both segments of the spinal cord (number of NeuN⁺ neurons/area; cervical segment: WT-saline, 167.3 ± 60.1 ; BACHD-saline, 100.9 ± 41.6 ; WT-toxin, 168.8 ± 44.6 ; and BACHD-toxin, 166.8 ± 17.3 ; and lumbar segment: WT-saline, 179.3 ± 52.6 ; BACHD-saline, 110.1 ± 20.0 ; WT-toxin, 195.5 ± 73.2 ; and BACHD-toxin, 172.8 ± 43.7).

Given that the striatum and cortex are severely affected in HD (Margolis & Ross, 2003), we asked whether the toxin, injected by the intrathecal route, would reach these brain regions and exert a similar neuroprotective effect to the one observed in the spinal cord. We found that the intrathecal injection of CTK 01512-2 did not rescue neurons in the striatum or cerebral cortex of the BACHD mice. We observed a statistically significant reduction in the number of (NeuN⁺) neurons in the BACHD-saline group compared with WT-saline counterparts in both striatum and cortex (Figure 3a,b). We did not detect statistical differences between the BACHD-saline and BACHD-toxin groups, and the WT-saline and WT-toxin mice, suggesting that the toxin, when injected directly into the spinal cord, did not prevent the loss of neurons in the upper CNS (number of NeuN⁺ neurons/area; striatum: WT-saline, 271.1 ± 68.8 ; BACHD-saline, 130.2 ± 61.5 ; WT-toxin, 240.3 ± 85.0 ; and BACHD-toxin, 159.0 ± 48.0 ; and cortex: WT-saline, 367.0 ± 76.6 ; BACHD-saline, 255.9 ± 65.5 ; WT-toxin, 332.0 ± 63.1 ; and BACHD-toxin, 270.1 ± 66.0).

Overall, our data suggest that CTK 01512-2 has a neuroprotective action in the spinal cord, and given that such neuroprotection was not observed in the brain, we propose that the recombinant toxin acts locally at the site of injection.

3.3 | Caspase-3 inhibition is associated with CTK 01512-2 effects

Considering the neuroprotective potential of CTK 01512-2 on ventral horn neurons of BACHD mouse spinal cords, we next examined whether the effect of CTK 01512-2 is attributable to a reduction in neuronal apoptosis. For this, we used an antibody against caspase-3, a well-established marker for apoptotic cell death. As expected, we observed intense caspase-3 expression in ventral horn neurons of the BACHD animals, suggesting that apoptosis is indeed playing a role in the observed neuronal death; Figure 4a shows representative images for all groups. After the administration of CTK 01512-2, there was a statistically significant decrease in caspase-3 expression in the cervical (Figure 4b) and lumbar (Figure 4c) segments of BACHD-toxin spinal cords, but expression remained high in the spinal segments of BACHD-saline mice (number of caspase⁺ neurons/area; cervical segment: WT-saline, 12.6 ± 9.9 ; BACHD-saline, 61.8 ± 17.4 ; WT-toxin, 9.6 ± 5.1 ; BACHD-toxin, 11.8 ± 8.7 ; and lumbar segment: WT-saline, 8.4 ± 4.7 ; BACHD-saline, 42.2 ± 13.2 ; WT-toxin, 3.4 ± 3.6 ; and BACHD-toxin: 13.8 ± 6.0).

Taken together, these results suggest that caspase-3 inhibition is associated with the neuroprotective mechanisms mediated by CTK 01512-2.

3.4 | CTK 01512-2 reverts muscle atrophy in BACHD mice

We conducted a histological analysis in STM and TA muscles, which are innervated mainly by motoneurons from the cervical and lumbar segments of the spinal cord. In BACHD-saline mice, these two skeletal muscles presented fibres that were significantly smaller compared with WT-saline mice (Figure 5a). The quantification of CSA from several STM and TA muscle fibres exhibited in Figures 5b,c provided confirmation. After treatment with CTK 01512-2, there was a significant increase in the CSA of the muscle fibres from the BACHD-toxin group compared with the BACHD-saline group. Interestingly,

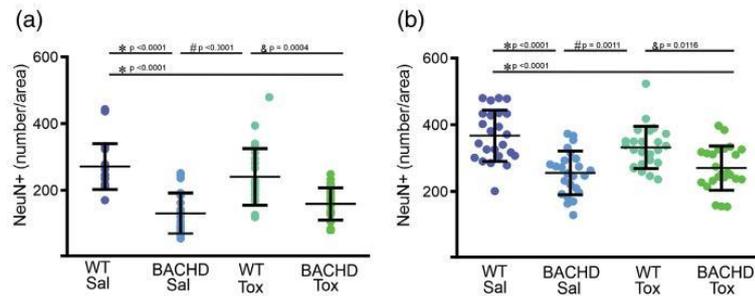


FIGURE 3 CTK 01512-2 does not maintain the number of neurons in the brains of BACHD mice. (a) Neuronal quantification in striatum. (b) Neuronal quantification in cortex. Data are expressed as the mean \pm SD; $n = 5$ animals per group, per treatment. Twenty-four images were analysed (total area analysed $\sim 114,000 \mu\text{m}^2$). * $P < 0.05$ compared with WT-Sal, # $P < 0.05$ compared with BACHD-Sal, and &# $P < 0.05$ compared with WT-Tox. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Abbreviations: Sal, saline; Tox, CTK 01512-2; WT, wild-type littermate

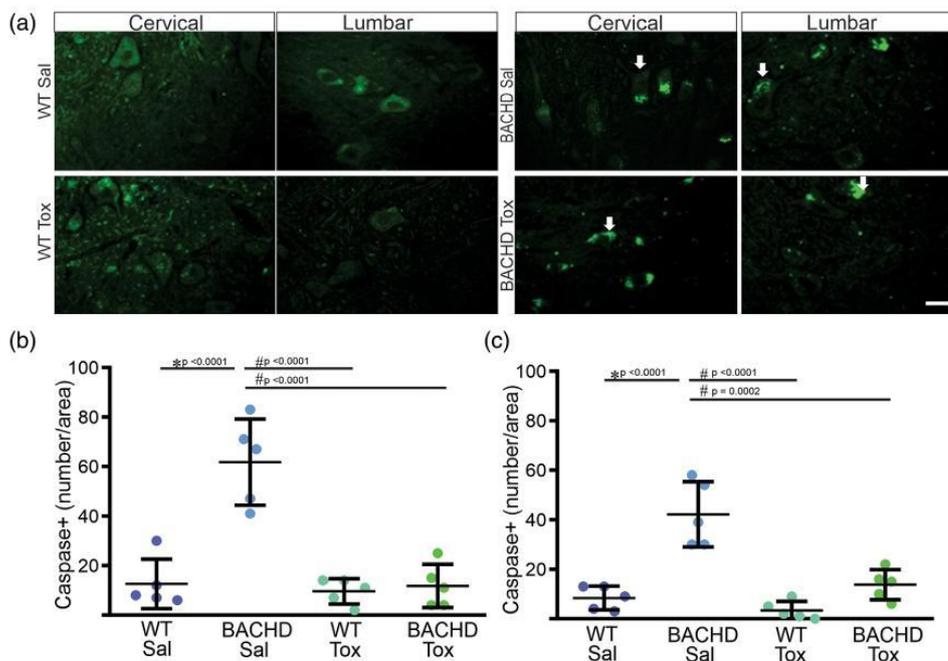


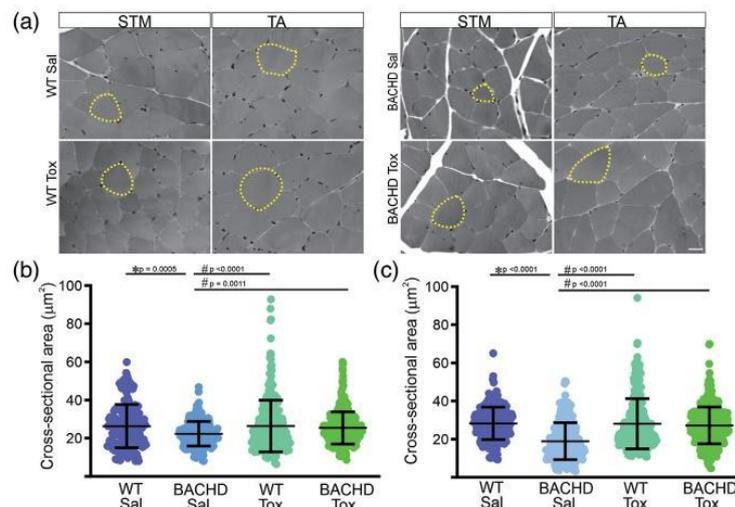
FIGURE 4 Caspase-3 expression is associated with the effects of CTK 01512-2. (a) Representative immunofluorescence images showing caspase⁺ neurons in cervical and lumbar segments of spinal cord. The arrows indicate caspase-3 labelling. Scale bar: $20 \mu\text{m}$. (b) Bar graph showing quantification of caspase-3 in the cervical segment. (c) Bar graph showing quantification of caspase-3 in the lumbar segment. Data are expressed as the mean \pm SD; $n = 5$ animals per group, per treatment. One hundred images were analysed in five different sections (total area $\sim 300,000 \mu\text{m}^2$) for the cervical segment and 50 images analysed in five different sections (total area $\sim 150,000 \mu\text{m}^2$) for the lumbar segment. * $P < 0.05$ compared with WT-Sal, # $P < 0.05$ compared with BACHD-Sal. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Abbreviations: Sal, saline; Tox, CTK 01512-2; WT, wild-type littermate

there were no statistical differences regarding the CSA between the BACHD-toxin, WT-toxin and WT-saline groups for both muscles investigated (in micrometres squared; STM: WT-saline, 26.3 ± 11.3 ; BACHD-saline, 22.3 ± 6.4 ; WT-toxin, 26.4 ± 13.5 ; and BACHD-toxin,

25.4 ± 8.4 ; and TA: WT-saline, 28.2 ± 8.5 ; BACHD-saline, 18.9 ± 9.7 ; WT-toxin, 28.1 ± 13.1 ; and BACHD-toxin, 27.2 ± 9.5).

These results suggest that the neuroprotection observed at the ventral horn of the spinal cord might contribute to the maintenance of

FIGURE 5 CTK01512-2 treatment increases the cross-sectional area in myofibres from BACHD mice. (a) Images from transverse sections of the skeletal muscles STM and TA. Examples of CSA are indicated by the yellow dotted outlines. Scale bar: 20 μm . (b) Bar graph showing the CSA in STM. (c) Bar graph showing CSA in TA. Data are expressed as the mean \pm SD; $n = 5$ animals per group, per treatment; STM: $n = 169, 243, 294$ and 395 myofibre CSAs analysed per group, per treatment; TA: $n = 292, 240, 300$ and 490 myofibre CSAs analysed per group, per treatment. * $P < 0.05$ compared with WT-Sal, # $P < 0.05$ compared with BACHD-Sal. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Abbreviations: CSA, cross-sectional area; Sal, saline; STM, sternomastoideus; TA, tibialis anterior; Tox, CTK 01512-2; WT, wild-type littermate



innervation of the STM and TA skeletal muscles and might reverse the atrophy described in BACHD animals.

4 | DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that CTK01512-2 has a neuroprotective effect on neurons from different segments of the spinal cord of BACHD mice. In addition, muscle atrophy was attenuated in treated BACHD animals, and some behavioural characteristics (i.e., reduced mean velocity and distance travelled) were ameliorated. Finally, we also described that the action of CTK 01512-2 is mediated by the inhibition of neuronal apoptosis and that this toxin has a local effect, which is desirable when considering its action as a calcium channel blocker.

Analyses of motor behaviour provide a good read-out of neuromuscular function in HD (Menalled et al., 2010). Notably, CTK 01512-2 ameliorated some behavioural abnormalities present in the BACHD model (Figure 1). The BACHD-saline group had a worse phenotype in the wire-hanging and rotarod tests when compared with the WT-saline group. In such approaches, the CTK 01512-2 toxin did not improve the parameters analysed (hanging time and latency to fall), probably because they rely not only on the function of motoneurons from the spinal cord but also on neurons from higher CNS structures, such as the striatum and cortex, which are severely affected in HD (Margolis & Ross, 2003). However, regarding the open field test, we observed an increase in the mean velocity and distance travelled after the intrathecal injection of CTK 01512-2. A recent study also demonstrates that this toxin can improve behavioural tests when injected directly into the striatum (Joviano-Santos et al., 2021), specifically in the wire-hanging and open field tests. In the latter test, an improvement in the BACHD-toxin group was observed after both injection routes [into the striatum (Joviano-Santos et al., 2021) or the spinal cord]. The open field test is a simple task designed to evaluate the general locomotor activity of the mice (Brooks & Dunnett, 2009). This might explain why CTK

01512-2 promoted an increment in the mean velocity and distance travelled regardless of the route of injection. As already published, although differences in the open field test started at 28 weeks of age in the BACHD animals, alterations in this type of test have a late onset (compared with the rotarod test, in which the animals showed a severe decrease in the latency to fall at 4 weeks of age) (Gray et al., 2008; Menalled et al., 2010). Thus, we can hypothesize that the first test to be improved by a non-striatal injection would be the open field test, which has been proved by our experiments using the intrathecal route. We cannot discard the concept that the spinal motor circuits used for both tests could be different, and there is a possible differential effect of toxin in some neurons compared with others. The spinal cord (and the cerebral cortex) has local neuronal ensembles that can be recruited or co-recruited by travelling waves of activity (Ivanenko et al., 2006; Yakovenko et al., 2002). Neurons can be topographically related 'musculotopic' motor maps (Levine et al., 2012), providing a substrate for activation and/or inactivation related to their target muscles, and a specific area can be more or less activated. Besides, the spinal motoneuron-muscle circuits might have differential sensibility. Usually, neurons that are recruited together are physically close to minimize the time and energy that must be used for their communication, ensuring efficient wiring (Chklovskii et al., 2002). Therefore, neuronal preservation caused by the toxin could be temporally and spatially different.

Regarding the less invasive characteristic of the intrathecal route (compared with the intracerebroventricular route), we proceeded with analysis of the spinal cord neurons. Using a biomarker for mature neurons (NeuN), we visualized an increase in NeuN⁺ cells, hence a local neuroprotective effect, after the treatment of BACHD mice with CTK 01512-2. The neurons of the cervical or lumbar segments of the spinal cord were preserved, but this was not observed in the striatum and cortex, probably because the toxin was not able to reach the upper CNS. It is unlikely that CTK 01512-2 is highly specific to spinal cord neurons alone, because injections into the striatum also improve motor

#00801-16), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; #467220/2014-0 and #475735/2013-7), ISN-Career Reentry Grant and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES. Cristina Guatimosim is a CNPq research fellow. Juan C. Tapia is supported by The National Fund for Scientific and Technological Development (FONDECYT 1200951 and 1160888) and International Brain Research Organization (IBRO).

COMPETING INTERESTS

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The experiments were performed in LabNeuro at the Federal University of Minas Gerais. J.V.J.-S., P.A.C.V., M.P.S.M.-G., L.F.F., D.M.D., T.C.G.M., K.B.S. and M.S.L. contributed to: conception of the work; acquisition, analysis or interpretation of data for the work; and drafting of the work or revising it critically for important intellectual content. A.R.M., M.V.G., A.S.M., J.C.T. and C.G. contributed to: conception or design of the work; and drafting of the work or revising it critically for important intellectual content. All authors approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All data supporting the results in this paper are in the paper itself and uploaded as Supporting Information for online publication.

ORCID

Julliane V. Joviano-Santos  <https://orcid.org/0000-0002-5788-6223>

Lorena F. Fernandes  <https://orcid.org/0000-0002-4167-0049>

Andre R. Massensini  <https://orcid.org/0000-0002-1508-3801>

Cristina Guatimosim  <https://orcid.org/0000-0001-5392-1266>

REFERENCES

- Agostini, R. M., do Nascimento Pinheiro, A. C., Binda, N. S., Romano Silva, M. A., do Nascimento Cordeiro, M., Richardson, M., Sena Guimarães, A. L., & Gomez, M. V. (2011). Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release and neuronal death of cell layers of the retina. *Retina*, 31(7), 1392–1399.
- Antunes, F. T. T., Angelo, S. G., Dallegrave, E., Picada, J. N., Marroni, N. P., Schemitt, E., Ferraz, A. G., Gomez, M. V., & de Souza, A. H. (2020). Recombinant peptide derived from the venom the Phoneutria nigriventer spider relieves nociception by nerve deafferentation. *Neuropeptides*, 79, 101980.
- Antunes, F. T. T., de Souza, A. H., Caminski, E. S., Greggio, S., Venturini, G. T., da Costa, J. C., Taffarel, M., Rebelo, I. N., Gomez, M. V., Correa, D. S., Vilanova, F. N., Regner, A. P., & Dallegrave, E. (2021). Neuroprotective effects of the CTK 01512-2 toxin against neurotoxicity induced by 3-nitropropionic acid in rats. *Neurotoxicology*, 87, 30–42.
- 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. *Neurochemistry International*, 93, 64–72.
- Baig, S. S., Strong, M., Rosser, E., Taverner, N. V., Glew, R., Miedzybrodzka, Z., Clarke, A., & Craufurd, D. (2017). 22 Years of predictive testing for Huntington's disease: The experience of the UK Huntington's Prediction Consortium. *European Journal of Human Genetics*, 25(11), 1290.
- Beal, M. F., Ferrante, R. J., Swartz, K. J., & Kowall, N. W. (1991). Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 11(6), 1649–1659.
- Bonilla, E. (2000). Huntington disease. A review. *Investigacion Clinica*, 41, 117–141.
- Brooks, S., & Dunnett, S. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(7), 519–529.
- Caminski, E. S., de Freitas, L. M., Dallegrave, E., Junior CA da, S., Gomez, M. V., Pereira, E. M. R., Antunes, F. T. T., & de Souza, A. H. (2020). Analgesic effects of the CTK 01512-2 toxin in different models of orofacial pain in rats. *Pharmacological Reports*, 72(3), 600–611.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), a003947.
- Chklovskii, D. B., Schikorski, T., & Stevens, C. F. (2002). Wiring optimization in cortical circuits. *Neuron*, 34(3), 341–347.
- Choi, D. W. (2005). Neurodegeneration: Cellular defences destroyed. *Nature*, 433(7027), 696–698.
- Cizkova, D., Marsala, J., Lukacova, N., Marsala, M., Jergova, S., Orendacova, J., & Yaksh, T. L. (2002). Localization of N-type Ca²⁺ channels in the rat spinal cord following chronic constrictive nerve injury. *Experimental Brain Research*, 147(4), 456–463.
- Cordeiro, M. N., de Figueiredo, S. G., Valentim, A. C., Diniz, C. R., von Eickstedt, V. R., Gilroy, J., & Richardson, M. (1993). Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian "armed" spider Phoneutria nigriventer (Keys). *Toxicon*, 31(1), 35–42.
- Creus-Muncunill, J., & Ehrlich, M. E. (2019). Cell-autonomous and non-cell-autonomous pathogenic mechanisms in Huntington's disease: Insights from in vitro and in vivo models. *Neurotherapeutics*, 16(4), 957–978.
- Curtis, D. R., Phillis, J. W., & Watkins, J. C. (1959). Chemical excitation of spinal neurones. *Nature*, 183(4661), 611–612.
- Dallegrave, E., Taschetto, E., Bairy Leal, M., Techera Antunes, F. T., Gomez, M. V., & Hubner de Souza, A. (2018). Acute toxicity of the recombinant and native Phx1β toxin: New Analgesic from phoneutria nigriventer spider venom. *Toxins (Basel)*, 10(12), 531.
- Diniz, D. M., de Souza, A. H., Pereira, E. M., da Silva, J. F., Rigo, F. K., Romano-Silva, M. A., Binda, N., Castro, C. J., Cordeiro, M. N., Ferreira, J., & Gomez, M. V. (2014). Effects of the calcium channel blockers Phx1β and ω-conotoxin MVIIA on capsaicin and acetic acid-induced visceral nociception in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 126, 97–102.
- Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 81(3), 163–221.
- Doria, J. G., de Souza, J. M., Andrade, J. N., Rodrigues, H. A., Guimaraes, I. M., Carvalho, T. G., Guatimosim, C., Dobransky, T., & Ribeiro, F. M. (2015). The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 73, 163–173.
- Ferrante, R. J., Kowall, N. W., & Richardson, E. P. (1991). Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: A combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry. *Journal of Neuroscience*, 11(12), 3877–3887.
- Finkbeiner, S. (2011). Huntington's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(6), a007476–a007476.
- Frank, S. (2014). Treatment of Huntington's disease. *Neurotherapeutics*, 11(1), 153–160.
- Gomez, M. V., Kalapothakis, E., Guatimosim, C., & Prado, M. A. (2002). Phoneutria nigriventer venom: A cocktail of toxins that affect ion channels. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22(5/6), 579–588.

- Graveland, G. A., Williams, R. S., & DiFiglia, M. (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* (80-), 227(4688), 770–773.
- Gray, M., Shirasaki, D. I., Cepeda, C., Andre, V. M., Wilburn, B., Lu, X. H., Tao, J., Yamazaki, I., Li, S. H., Sun, Y. E., Li, X. J., Levine, M. S., & Yang, X. W. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *Journal of Neuroscience*, 28(24), 6182–6195.
- Grundy, D. (2015). Principles and standards for reporting animal experiments. *Journal of Physiology and Experimental Physiology*, 100(7), 755–758.
- Hutten, S., & Dormann, D. (2020). Nucleocytoplasmic transport defects in neurodegeneration – Cause or consequence? *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 99, 151–162.
- Hylden, J. L., & Wilcox, G. L. (1980). Intrathecal morphine in mice: A new technique. *European Journal of Pharmacology*, 67(2-3), 313–316.
- Ivanenko, Y. P., Poppele, R. E., & Lacquaniti, F. (2006). Spinal cord maps of spatiotemporal alpha-motoneuron activation in humans walking at different speeds. *Journal of Neurophysiology*, 95(2), 602–618.
- Joviano-Santos, J. V., Valadão, P. A. C., Magalhães-Gomes, M. P. S., Fernandes, L. F., Diniz, D. M., Machado, T. C. G., Soares, K. B., Ladeira, M. S., Miranda, A. S., Massensini, A. R., Gomez, M. V., & Guatimosim, C. (2021). Protective effect of a spider recombinant toxin in a murine model of Huntington's disease. *Neuropeptides*, 85, 102111.
- Joviano-Santos, J. V., Santos-Miranda, A., Botelho, A. F. M., de Jesus, I. C. G., Andrade, J. N., de Oliveira Barreto, T., Magalhães-Gomes, M. P. S., Valadão, P. A. C., dos Cruz, J. S., Melo, M. M., Guatimosim, S., & Guatimosim, C. (2019). Increased oxidative stress and CaMKII activity contribute to electro-mechanical defects in cardiomyocytes from a murine model of Huntington's disease. *Febs Journal*, 286(1), 110–123.
- Kurokawa, M., & Kornbluth, S. (2009). Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 138(5), 838–854.
- Levine, A. J., Lewallen, K. A., & Pfaff, S. L. (2012). Spatial organization of cortical and spinal neurons controlling motor behavior. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 812–821.
- von Lewinski, F., & Keller, B. U. (2005). Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: Implications for ALS. *Trends in Neuroscience (Tins)*, 28(9), 494–500.
- Liu, W. M., Wu, J. Y., Li, F. C., & Chen, Q. X. (2011). Ion channel blockers and spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 89(6), 791–801.
- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S. A., James, M., Groot, N., MacFarlane, H., Jenkins, B., Anderson, M. A., Wexler, N. S., Gusella, J. F., Bates, G. P., Baxendale, S., Hummerich, H., Kirby, S., ... Harper, P. S. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971–983.
- Margolis, R. L., & Ross, C. A. (2003). Diagnosis of Huntington disease. *Clinical Chemistry*, 49(10), 1726–1732.
- Mcdonough, S. I., Boland, L. M., Mintz, I. M., & Bean, B. P. (2002). Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels. *Journal of General Physiology*, 119(4), 313–328.
- Menalled, L., El-khodori, B. F., Patry, M., Suarez-farinas, M., Zahasky, B., Leahy, C., Wheeler, V., Yang, X. W., Macdonald, M., Morton, A. J., Bates, G., Leeds, J., Park, L., Signer, E., Tobin, A., & Brunner, D. (2010). Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiology of Disease*, 35(3), 319–336.
- Mochida, S., Sheng, Z. H., Baker, C., Kobayashi, H., & Catterall, W. A. (1996). Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺-channels. *Neuron*, 17(4), 781–788.
- Molero, A. E., Arteaga-bracho, E. E., Chen, C. H., & Gulino, M. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *PNAS*, 113(20), 5736–5741.
- Nicoletti, N. F., Erig, T. C., Zanin, R. F., Roxo, M. R., Ferreira, N. P., Gomez, M. V., Morrone, F. B., & Campos, M. M. (2017). Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider P. nigriventer in glioma progression. *Toxicon*, 129, 58–67.
- Okun, M. S., & Thommi, N. (2004). Americo Negrette (1924 to 2003): Diagnosing Huntington disease in Venezuela. *Neurology*, 63(2), 340–343.
- Paradisi, I., Hernández, A., & Arias, S. (2008). Huntington disease mutation in Venezuela: Age of onset, haplotype analyses and geographic aggregation. *Journal of Human Genetics*, 53(2), 127–135.
- Pchitskaya, E., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2018). Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*, 70, 87–94.
- Pinheiro, A. C., da Silva, A. J., Prado, M. A., Cordeiro, M. N., Richardson, M., Batista, M. C., de Castro Junior, C. J., Massensini, A. R., Guatimosim, C., Romano-Silva, M. A. K. C., & Gomez, M. V. (2009). Phoneutria spider toxins block ischemia-induced glutamate release, neuronal death, and loss of neurotransmission in hippocampus. *Hippocampus*, 19(11), 1123–1129.
- Potkin, K. T., & Potkin, S. G. (2018). New directions in therapeutics for Huntington disease. *Future Neurology*, 13(2), 101–121.
- De Prá, S. D. T., de Antoniazzi, C. T. D., Ferro, P. R., Kudsí, S. Q., Camponogara, C., Fialho, M. F. P., Rigo, F. K., Gomez, M. V., Moresco, R. N., Oliveira, S. M., & Trevisan, G. (2019). Nociceptive mechanisms involved in the acute and chronic phases of a complex regional pain syndrome type 1 model in mice. *European Journal of Pharmacology*, 859, 172555.
- 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., Gomez, M. V., Guatimosim, C., Wetsel, W. C., Kushmerick, C., ... Prado, M. A. (2006). Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*, 51(5), 601–612.
- Rezende Júnior, L., Cordeiro, M. N., Oliveira, E. B., & Diniz, C. R. (1991). Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider Phoneutria nigriventer. *Toxicon*, 29, 1255–1233.
- Ricardo Carvalho, V. P., Figueira da Silva, J., Buzelin, M. A., Antônio da Silva Jr, C., Carvalho Dos Santos, D., Montijo Diniz, D., Binda, N. S., Borges, M. H., Senna Guimarães, A. L., Rita Pereira, E. M., & Gomez, M. V. (2021). Calcium channels blockers toxins attenuate abdominal hyperalgesia and inflammatory response associated with the cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *European Journal of Pharmacology*, 891, 173672.
- Rigo, F. K., Rossato, M. F., Borges, V., Da Silva, J. F., Pereira, E. M. R., De Ávila, R. A. M., Trevisan, G., Dos Santos, D. C., Diniz, D. M., Silva, M. A. R., De Castro, C. J., Cunha, T. M., Ferreira, J., & Gomez, M. V. (2020). Analgesic and side effects of intravenous recombinant Phx1β. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 26, 1–9.
- Rigo, F. K., Trevisan, G., De Prá, S. D. T., Cordeiro, M. N., Borges, M. H., Silva, J. F., Santa Cecilia, F. V., de Souza, A. H., de Oliveira Adamante, G., Milioli, A. M., de Castro Junior, C. J., Ferreira, J., & Gomez, M. V. (2017). The spider toxin Phx1β recombinant possesses strong analgesic activity. *Toxicon*, 133, 145–152.
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(S7), S10–S17.
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurology*, 10(1), 83–98.
- Schrank, S., Barrington, N., & Stutzmann, G. E. (2020). Calcium-handling defects and neurodegenerative disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(7), a035212, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035212>
- da Silva Junior, C. A., de Castro Junior, C. J., Pereira, E. M. R., Binda, N. S., da Silva, J. F., do Nascimento Cordeiro, M., Diniz, D. M., Cecilia, F. S., Ferreira, J., & Gomez, M. V. (2020). The inhibitory effect of Phx1β toxin on diabetic neuropathic pain involves the CXCR4 chemokine receptor. *Pharmacological Reports*, 72(1), 47–54.

- Silva, R. B. M., Greggio, S., Venturin, G. T., da Costa, J. C., Gomez, M. V., & Campos, M. M. (2018). Beneficial effects of the calcium channel blocker CTK 01512-2 in a mouse model of multiple sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 55(12), 9307–9327.
- de Souza, A. H., da Rosa, L. G., Uliano, M. R., da Silva Prado, L., Ferraz, A. G., Conter, L. U., Grivicich, I., Dallegre, E., Gomez, M. V., & Picada, J. N. (2019). Evaluation of DNA damage in spinal cord and mutagenic effect of a Ph α 1 β recombinant toxin with analgesic properties from the Phoneutria nigriventer spider. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 124(5), 615–620.
- Souza, A. H., Ferreira, J., Cordeiro, M. N., Vieira, L. B., De Castro, C. J., Trevisan, G., Reis, H., Souza, I. A., Richardson, M., Prado, M. A., Prado, V. F., & Gomez, M. V. (2008). Analgesic effect in rodents of native and recombinant Ph alpha 1beta toxin, a high-voltage-activated calcium channel blocker isolated from armed spider venom. *Pain*, 140(1), 115–126.
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, 154(2), 204–219.
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., & Sorimachi, H. (2004). Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*, 53(suppl_1), S12–S18.
- Tonello, R., Fusi, C., Materazzi, S., Marone, I. M., De Logu, F., Benemei, S., Gonçalves, M. C., Coppi, E., Castro-Junior, C. J., Gomez, M. V., Geppetti, P., Ferreira, J., & Nassini, R. (2017). The peptide Ph α 1 β , from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice. *British Journal of Pharmacology*, 174(1), 57–69.
- Valadão, P. A. C., de Aragão, B. C., Andrade, J. N., Magalhães-Gomes, M., Foureaux, G., Joviano-Santos, J. V., Nogueira, J. C., Ribeiro, F. M., Tapia, J. C., & Guatimosim, C. (2017). Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 45(6), 785–796.
- Valadão, P. A. C., de Aragão, B. C., Andrade, J. N., Magalhães-Gomes, M. P. S., Foureaux, G., Joviano-Santos, J. V., Nogueira, J. C., Machado, T. C. G., de Jesus, I. C. G., Nogueira, J. M., de Paula, R. S., Peixoto, L., Ribeiro, F. M., Tapia, J. C., Jorge, É. C., Guatimosim, S., & Guatimosim, C. (2019). Abnormalities in the motor unit of a fast-twitch lower limb skeletal muscle in Huntington's disease. *ASN Neuro*, 11, 1–20.
- Valadão, P. A. C., Gomes, M., Aragão, B. C., Rodrigues, H. A., Andrade, J. N., Garcias, R., Joviano-Santos, J. V., Luiz, M. A., Camargo, W. L., Naves, L. A., Kushmerick, C., Cavalcante, W. L. G., Gallacci, M., de Jesus, I. C. G., Guatimosim, S., & Guatimosim, C. (2018). Neuromuscular synapse degeneration without muscle function loss in the diaphragm of a murine model for Huntington's Disease. *Neurochemistry International*, 116, 30–42.
- Vieira, L. B., Kushmerick, C., Hildebrand, M. E., Garcia, E., Stea, A., Cordeiro, M. N., Richardson, M., Gomez, M. V., & Snutch, T. P. (2005). Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314(3), 1370–1377.
- Vieira, L. B., Kushmerick, C., Reis, H. J., Diniz, C. R., Cordeiro, M. N., Prado, M. A., Kalapothakis, E., Romano-Silva, M. A., & Gomez, M. V. (2003). PnTx3-6 a spider neurotoxin inhibits K⁺-evoked increase in [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-dependent glutamate release in synaptosomes. *Neurochemistry International*, 42(4), 277–282.
- Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. *Lancet*, 369(9557), 218–228.
- Westenbroek, R. E., Hoskins, L., & Catterall, W. A. (1998). Localization of Ca²⁺ channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *Journal of Neuroscience*, 18(16), 6319–6330.
- Yakovenko, S., Mushahwar, V., VanderHorst, V., Holstege, G., & Prochazka, A. (2002). Spatiotemporal activation of lumbosacral motoneurons in the locomotor step cycle. *Journal of Neurophysiology*, 87(3), 1542–1553.
- Zaman, M., Khan, A. N., Wahiduzzaman, Z. S. M., & Khan, R. H. (2019). Protein misfolding, aggregation and mechanism of amyloid cytotoxicity: An overview and therapeutic strategies to inhibit aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1022–1037.
- Zeron, M. M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C. L., Leavitt, B. R., Brundin, P., Hayden, M. R., & Raymond, L. A. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron*, 33(6), 849–860.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Joviano-Santos, J. V., Valadão, P. A. C., Magalhães-Gomes, M. P. S., Fernandes, L. F., Diniz, D. M., Machado, T. C. G., Soares, K. B., Ladeira, M. S., Massensini, A. R., Gomez, M. V., Miranda, A. S., Tápia, J. C., & Guatimosim, C. (2022). Neuroprotective effect of CTK 01512-2 recombinant toxin at the spinal cord in a model of Huntington's disease. *Experimental Physiology*, 107, 933–945. <https://doi.org/10.1113/EP090327>

9. ANEXO 2: Artigo publicado durante o mestrado



Article

Renin-Angiotensin System in Huntington's Disease: Evidence from Animal Models and Human Patients

Lucas M. Kangussu ¹, Natalia P. Rocha ^{2,3,4}, Priscila A. C. Valadão ¹, Thatiane C. G. Machado ¹, Kívnia B. Soares ¹, Julliane V. Joviano-Santos ^{1,5}, Leigh B. Latham ^{3,6}, Gabriela D. Colpo ⁴, Ana Flávia Almeida-Santos ¹, Erin Furr Stimming ³, Ana Cristina Simões e Silva ⁷, Antônio L. Teixeira ^{4,8,*}, Aline Silva Miranda ¹ and Cristina Guatimosim ¹

- ¹ Department of Morphology, Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; lucaskangussu@gmail.com (L.M.K.); drapricilavaladao@gmail.com (P.A.C.V.); thatacristina01@gmail.com (T.C.G.M.); kiviaosoares@gmail.com (K.B.S.); jullianejoviano@hotmail.com (J.V.J.-S.); pricaufmg@yahoo.com.br (A.F.A.-S.); mirandaas@icb.ufmg.br (A.S.M.); cguatimosim@gmail.com (C.G.)
- ² Department of Neurology, The Mitchell Center for Alzheimer's Disease and Related Brain Disorders, The University of Texas Health Science Center, Houston, TX 77030, USA; natalia.pessoarocha@uth.tmc.edu
- ³ McGovern Medical School, HDSA Center of Excellence at The University of Texas Health Science Center, Houston, TX 77030, USA; lcurtis9021@aol.com (L.B.L.); erin.e.furr@uth.tmc.edu (E.F.S.)
- ⁴ Neuropsychiatry Program, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, University of Texas, Houston, TX 77054, USA; gabriela.d.colpo@uth.tmc.edu
- ⁵ Center for Mathematics, Computing, and Cognition (CMCC), Federal University of ABC (UFABC), São Bernardo do Campo 09612-000, SP, Brazil
- ⁶ School of Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA
- ⁷ Department of Pediatrics, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; acssilva@hotmail.com
- ⁸ Department of Psychiatry & Behavioral Sciences, McGovern Medical School, University of Texas Health Science Center, Houston, TX 77054, USA
- * Correspondence: antonio.l.teixeira@uth.tmc.edu



Citation: Kangussu, L.M.; Rocha, N.P.; Valadão, P.A.C.; Machado, T.C.G.; Soares, K.B.; Joviano-Santos, J.V.; Latham, L.B.; Colpo, G.D.; Almeida-Santos, A.F.; Furr Stimming, E.; et al. Renin-Angiotensin System in Huntington's Disease: Evidence from Animal Models and Human Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7686. <https://doi.org/10.3390/ijms23147686>

Academic Editors: Kiran Panickar and Ashu Johri

Received: 24 June 2022
Accepted: 9 July 2022
Published: 12 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The Renin-Angiotensin System (RAS) is expressed in the central nervous system and has important functions that go beyond blood pressure regulation. Clinical and experimental studies have suggested that alterations in the brain RAS contribute to the development and progression of neurodegenerative diseases. However, there is limited information regarding the involvement of RAS components in Huntington's disease (HD). Herein, we used the HD murine model, (BACHD), as well as samples from patients with HD to investigate the role of both the classical and alternative axes of RAS in HD pathophysiology. BACHD mice displayed worse motor performance in different behavioral tests alongside a decrease in the levels and activity of the components of the RAS alternative axis ACE2, Ang-(1-7), and Mas receptors in the striatum, prefrontal cortex, and hippocampus. BACHD mice also displayed a significant increase in mRNA expression of the AT1 receptor, a component of the RAS classical arm, in these key brain regions. Moreover, patients with manifest HD presented higher plasma levels of Ang-(1-7). No significant changes were found in the levels of ACE, ACE2, and Ang II. Our findings provided the first evidence that an imbalance in the RAS classical and counter-regulatory arms may play a role in HD pathophysiology.

Keywords: Huntington's disease; renin-angiotensin system; BACHD; angiotensin peptides

1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal-dominant neurodegenerative disease caused by an unstable CAG triplet sequence expansion in the *huntingtin* gene (*Htt*). This results in an abnormally long polyglutamine sequence in the N terminus of the huntingtin protein (HTT) [1,2]. In humans, the HTT gene usually contains 6 to 26 CAG repeats,

whereas in HD, the gene presents more than 36 repeats resulting in a mutant HTT-induced disease [3,4].

Neuropathological characterization of HD reveals progressive loss of neurons in the striatum and cortex as well as in the hippocampus and hypothalamus [5,6]. Clinical manifestations of HD usually begin between 35 and 50 years of age and include motor symptoms along with cognitive and behavioral symptoms [7–10]. Cognitive and behavioral deficits can be detected in premanifest HD patients (i.e., before the clinical diagnosis of HD, which is based on motor symptoms), before deteriorating in later stages of the disease [11]. Currently, there are no effective disease-modifying treatments for HD [2]. New targets are needed for the development of therapeutic strategies.

The Renin-Angiotensin System (RAS) is well known for its role in the cardiovascular and renal systems, acting as a regulator of blood pressure and hydro-electrolyte homeostasis [12,13]. It is a complex endocrine system composed of a range of enzymes, peptides, and receptors [14]. The RAS has two main axes: the classical axis is mainly composed of the angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin II (Ang II), and angiotensin type 1 (AT₁) receptor; the counter-regulatory axis is formed by ACE2, Ang-(1-7), and the Mas receptor. The effects of Ang-(1-7) oppose the major responses induced by Ang II [12,14,15]. Apart from peripheral systems, the RAS components have also been found in the brain [16,17], prompting the investigation of the potential pathophysiological roles played by RAS in neuropsychiatric disorders [18–25] including HD [26,27].

Only a few studies have investigated the involvement of RAS components in HD. A decrease in ACE activity was described in different brain regions of HD patients such as the striatum, substantia nigra, nucleus accumbens, and caudate [26,28,29]. Conversely, increased ACE activity was found in the cerebrospinal fluid of HD patients [30]. Alterations in the levels of AT₁ and AT₂ receptors were also reported in brain homogenates of HD patients, suggesting the involvement of RAS classical axis components in HD pathophysiology [31]. Interestingly, HD patients exhibited higher serum levels of autoantibodies against the AT₁ receptor compared with healthy controls, which were [32] associated with earlier disease onset and increased disease burden [33].

Herein, we took advantage of a well-established murine model of HD [34] and plasma from HD patients to investigate whether changes in the levels of molecules in the classical and alternative RAS arms may contribute to HD symptoms. The understanding of RAS components' involvement in HD progression may open new avenues for the development of novel therapeutic strategies for HD.

2. Results

2.1. Motor and Behavioral Tests in Mice

To evaluate muscle strength, mice were submitted to the wire hang test. Statistical analysis revealed that BACHD mice show impaired muscle strength compared to WT mice [BACHD: $t_{(12)} = 3.22$; $p = 0.0073$] since they presented a decreased latency to fall (Figure 1A). Additionally, on the rotarod test, BACHD mice exhibited an increased number of falls [BACHD: $t_{(13)} = 3.09$; $p = 0.0086$] (Figure 1B) as well as a decrease in the latency to fall [BACHD: $t_{(10)} = 3.67$; $p = 0.0043$] (Figure 1C) compared with the WT group. Together, these results indicate that 24-month-old BACHD mice present impairments in motor learning, balance, and motor coordination. Ultimately, BACHD mice also presented decreased locomotor activity, as they travelled shorter distances [BACHD: $t_{(10)} = 5.47$; $p = 0.0003$] (Figure 1D) and performed less rearing than control mice [BACHD: $t_{(10)} = 2.45$; $p = 0.0343$] (Figure 1E) in the open field test.

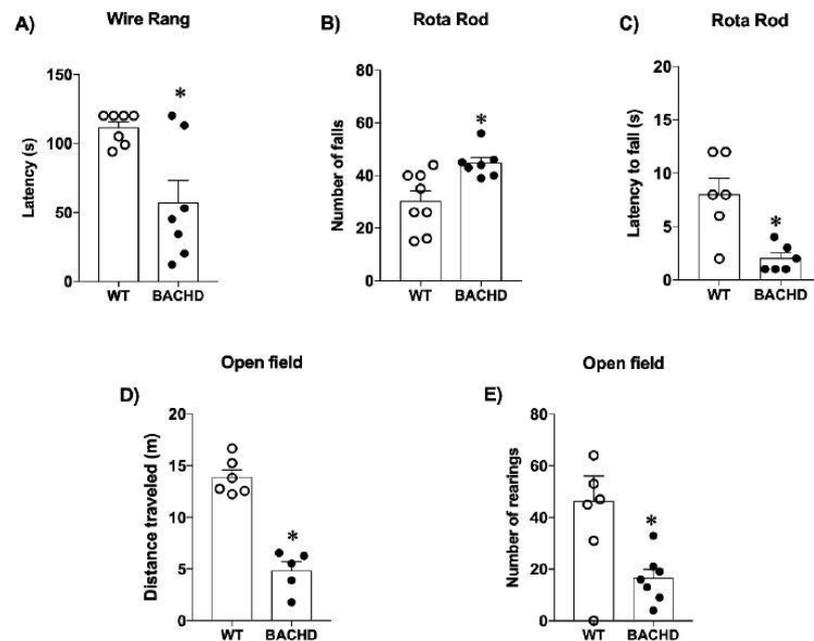


Figure 1. BACHD mice presented motor and behavioral changes. (A) BACHD mice showed impairment of muscle strength on the wire hang test. (B) BACHD mice exhibited an increased number of falls and (C) a decrease in the latency to fall in the rotarod test. (D) BACHD mice showed a decrease in the distance traveled on the open field and (E) a decreased number of rearings. Results are expressed as mean \pm SEM. $n = 5-7$. * $p < 0.05$ compared with WT group. The data were analyzed by Student's *t*-test.

2.2. Renin-Angiotensin System Components

As shown in Figure 2, no differences were found in the levels of ACE, Ang II, ACE2, and Ang-(1-7) in the plasma of BACHD mice compared with WT mice. However, when evaluating the components of RAS in the striatum, the main region affected by HD, we found interesting results. Although we did not find differences in ACE and ACE2 levels (Figure 3A,B), there was a reduction in the ACE2 activity in the striatum of BACHD mice (BACHD: 155 ± 4.5 vs. WT: 199 ± 6.8 a.u./min/mg of protein; $n = 5$) (Figure 3C). A reduction in Ang-(1-7) levels in the striatum of BACHD mice was also detected but no significant differences in the levels of Ang II (Figure 3D,E). In addition, there was increased mRNA expression for AT₁ in BACHD animals compared with controls (BACHD: 4.7 ± 0.6 vs. WT: 1.5 ± 0.2 relative mRNA levels; $n = 5-6$) (Figure 3F). No significant changes were found in AT₂ mRNA expression (Figure 3G). A significant decrease in Mas receptor mRNA expression was also observed in BACHD mice (BACHD: 0.6 ± 0.08 vs. WT: 1.5 ± 0.09 relative mRNA levels; $n = 5-6$) (Figure 3H).

The expression of RAS components in the prefrontal cortex is shown in Figure 4. No alterations in ACE levels were found in the prefrontal cortex of BACHD mice compared with WT controls (Figure 4A). The levels and activity of ACE2 were significantly reduced in BACHD mice in comparison with WT mice (BACHD: 5.5 ± 0.7 vs. WT: 9.4 ± 2.0 pg/mg; $n = 5$ and BACHD: 136 ± 2.8 vs. WT: 194 ± 4.0 a.u./min/mg of protein; $n = 5$) (Figure 4B,C). No significant differences in the levels of the peptides Ang II and Ang-(1-7) were found (Figure 4D,E). Interestingly, BACHD mice presented higher levels of AT₁ receptor mRNA expression (4.4 ± 0.4 vs. 1.2 ± 0.08 relative mRNA levels; $n = 5-6$) (Figure 4F). Moreover, there were no significant differences in mRNA expression for AT₂ and Mas receptors between the experimental groups (Figure 4G,H).

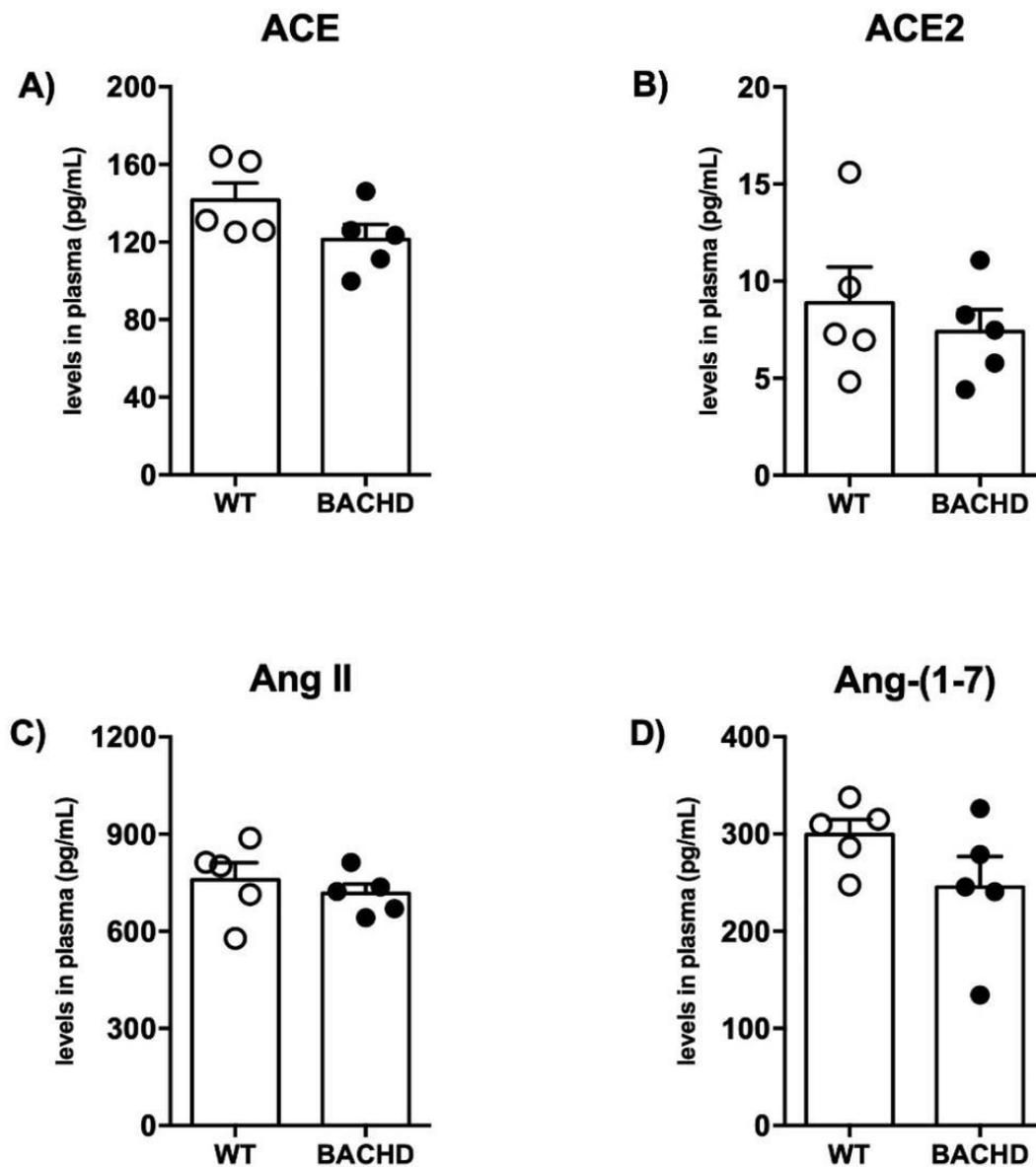


Figure 2. RAS components' levels in the plasma of BACHD and WT mice. (A) ACE, (B) ACE2, (C) Ang II, and (D) Ang-(1-7) plasma levels are not altered in 24-month-old BACHD mice. Results are expressed as mean \pm SEM. $n = 5$. The data were analyzed by Student's *t*-test.

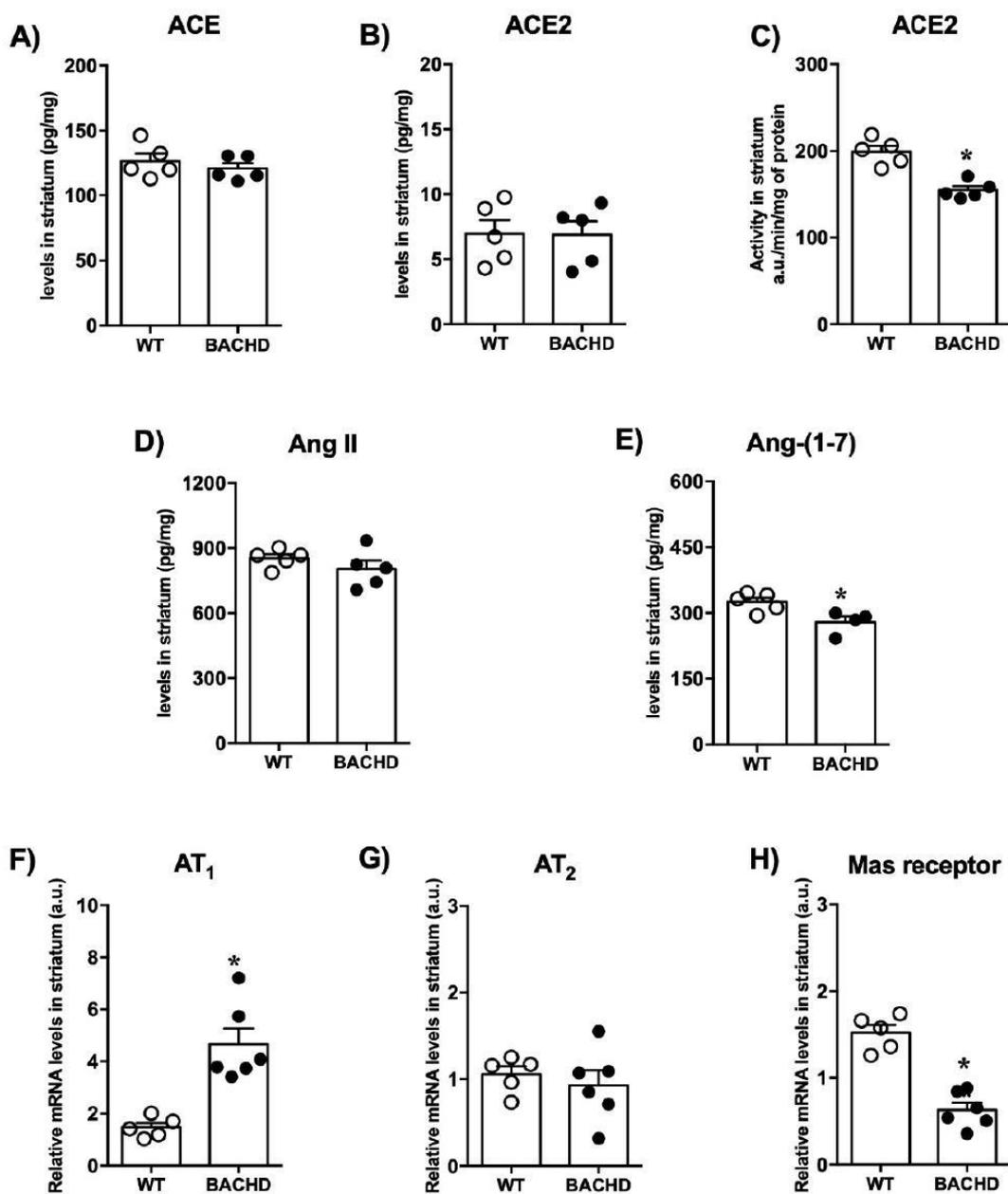


Figure 3. RAS components' levels in the striatum of BACHD and WT mice. (A) ACE, (B) ACE2 levels, (C) ACE2 activity, (D) Ang II levels, (E) Ang-(1-7) levels, (F) AT₁ receptor expression, (G) AT₂ receptor expression, and (H) Mas receptor expression in the striatum of BACHD mice. Results are expressed as mean ± SEM. $n = 5-6$. * $p < 0.05$ compared with WT group. The data were analyzed by Student's *t*-test.

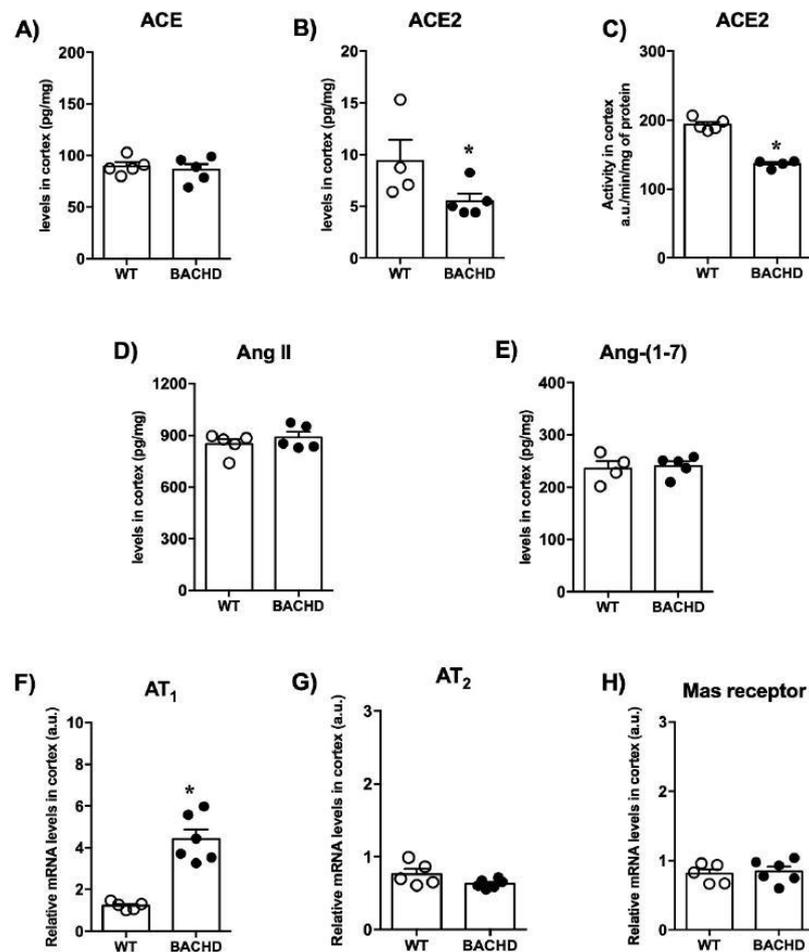


Figure 4. RAS components' levels in the cerebral prefrontal cortex of BACHD and WT mice. (A) ACE, (B) ACE2 levels, (C) ACE2 activity, (D) Ang II levels, (E) Ang-(1-7) levels, (F) AT₁ receptor expression, (G) AT₂ receptor expression, and (H) Mas receptor expression in the cerebral cortex of BACHD mice. Results are expressed as mean ± SEM. $n = 5-6$. * $p < 0.05$ compared with WT group. The data were analyzed by Student's *t*-test.

We also evaluated the components of RAS in the hippocampus (Figure 5). We did not find differences in the ACE and ACE2 levels (Figure 5A,B). Interestingly, we found a reduction in ACE2 activity in the hippocampus of BACHD mice compared with controls (Figure 5C). Furthermore, BACHD and WT mice presented similar levels of Ang II (Figure 5D). When corroborating the results of the reduced ACE2 activity, we observed a reduction in Ang-(1-7) levels in BACHD animals (BACHD: 117 ± 3.8 vs. WT: 163 ± 5.4 a.u./min/mg of protein; $n = 5$) (Figure 5E). BACHD mice also presented higher levels of AT₁ receptor mRNA expression compared with WT mice (BACHD: 3.3 ± 0.4 vs. WT: 1.6 ± 0.3 relative mRNA levels; $n = 5-6$) (Figure 5F). No significant differences in mRNA expression for AT₂ and Mas receptors were found between the experimental groups (Figure 5F,G).

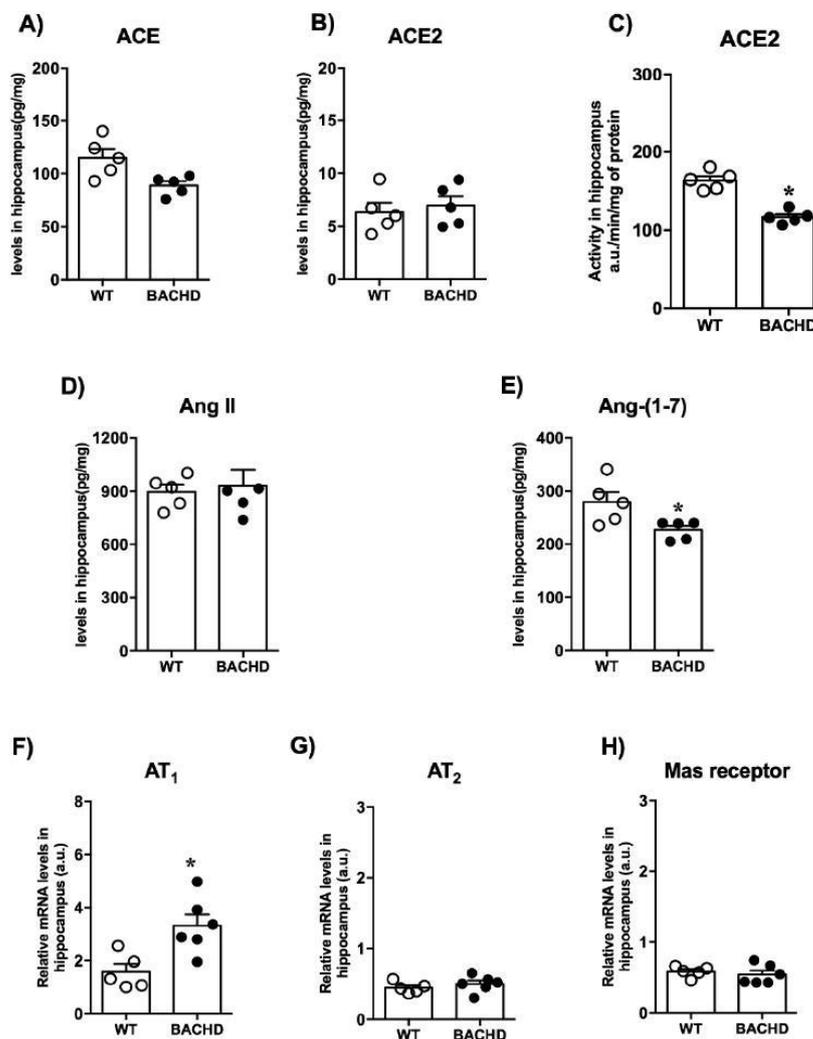


Figure 5. RAS components' levels in the hippocampus of BACHD and WT mice. (A) ACE, (B) ACE2 levels, (C) ACE2 activity, (D) Ang II levels, (E) Ang-(1-7) levels, (F) AT₁ receptor expression, (G) AT₂ receptor expression, and (H) Mas receptor expression in the hippocampus of BACHD mice. Results are expressed as mean ± SEM. $n = 5-6$. * $p < 0.05$ compared with WT group. The data were analyzed by Student's *t*-test.

Lastly, we assessed the levels of RAS components in the plasma samples of patients with HD and healthy controls. The demographic and clinical data are shown in Table 1. The patients and controls did not differ in age, sex, and BMI. The groups presented similar levels in the components of the classical RAS axis, i.e., ACE and Ang II (Figure 6A,C). Interestingly, there were differences in the RAS counter-regulatory axis with significantly higher levels of Ang-(1-7) in the HD group (Figure 6D). No significant differences were found in the plasma levels of ACE2 (Figure 6B).

Table 1. Demographic and clinical data of patients with HD and controls.

	Controls (<i>n</i> = 16)	Manifest HD (<i>n</i> = 22)	<i>p</i> -Value
Age in years	48.12 ± 11.02 (47.5)	49.88 ± 12.64 (49.4)	0.661 ^a
Female sex, <i>n</i> (%)	10 (62.5)	14 (66.7)	1.000 ^b
BMI (Kg/m ²)	28.51 ± 7.32 (25)	27.62 ± 6.48 (25)	0.650 ^c
CAG length (larger allele)	-	44.63 ± 4.14 (43)	-
UHDRS TMS	-	29.67 ± 12.91 (30)	-
TFC score	-	8.43 ± 2.82 (8)	-
Independence Scale (%)	-	84.52 ± 12.14 (85)	-
Ang II (pg/mL)	1567.77 ± 325.19 (1608)	1598.50 ± 282.83 (1618)	0.761 ^a
ACE (pg/mL)	447.21 ± 62.69 (463)	435.49 ± 73.94 (426)	0.614 ^a
Ang-(1-7) (pg/mL)	22.80 ± 12.80 (21)	39.78 ± 31.04 (33)	0.048 ^a
ACE2 (pg/mL)	7.27 ± 6.46 (5.7)	6.05 ± 7.86 (4.7)	0.189 ^c

Abbreviations: BMI = body mass index; HD = Huntington's disease; TFC = UHDRS = Unified HD Rating Scale. Values are given as mean ± SD (median). ^a Student's *t*-test; ^b Fisher's exact test; ^c Mann-Whitney test.

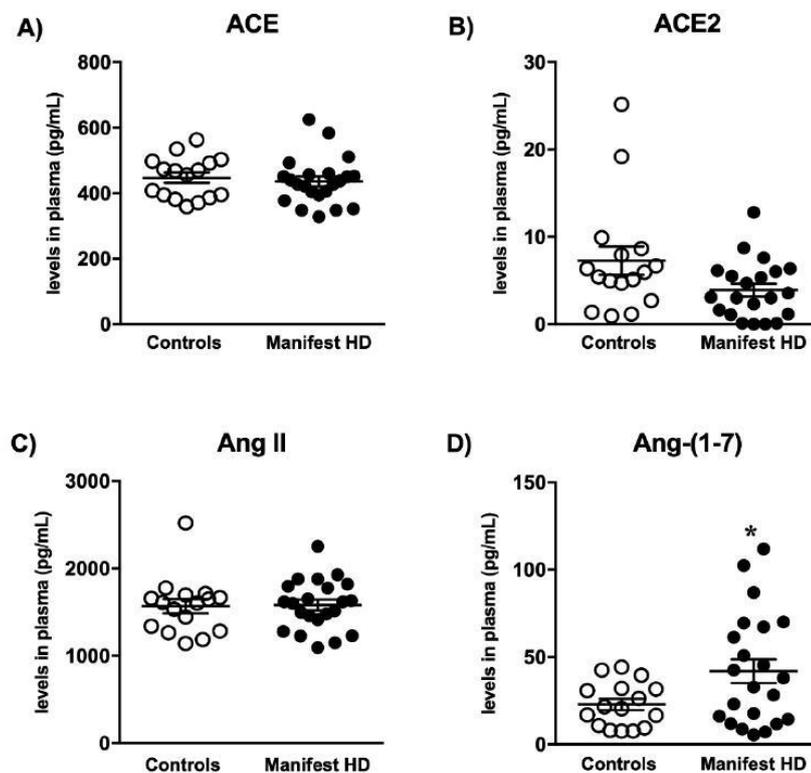


Figure 6. RAS components' concentrations in the plasma of HD manifest and control patients. (A) ACE and (B) ACE2 levels, (C) Ang II and (D) Ang-(1-7) levels in the plasma of HD manifest and control patients. Results are expressed as mean ± SEM. *n* = 16–22. * *p* < 0.05 compared with the control group. The data were analyzed by Student's *t*-test.

3. Discussion

In recent years, it has become evident that the RAS is active in several organs, including the brain, and has important functions that go beyond the cardiovascular and renal systems [13,16,17,35–37]. A growing body of evidence has supported the involvement of RAS in the development and progression of neurodegenerative conditions such as Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) [20–24,35]. Taking advantage of a well-established murine model of HD as well as plasma samples of patients with HD, we

provided novel evidence of an imbalance between the classical and the counter-regulatory RAS arms in HD. Our results were demonstrated in both local (mouse brain) and peripheral (plasma of patients) RAS.

The previous characterization of this transgenic model revealed progressive motor deficits in BACHD mice at 12 months old [34,38]. Our work, as far as we know, is the first to investigate how motor changes occur in BACHD animals at a more advanced age (24 months old), which may correspond to the HD endpoint.

In parallel with motor impairment, the BACHD mice presented a significant reduction in the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis in key brain areas associated with HD such as the striatum and hippocampus. Previous data regarding the role of RAS in HD is very limited and mainly focused on the classical axis components. It is worth mentioning that the animals used in the current study are 24 months old, corresponding to the HD endpoint. The evaluation of the RAS components in a later stage of the disease might explain, at least in part, the decrease in the levels of Ang-(1-7) in the striatum and the hippocampus of BACHD mice, culminating with significant motor impairment. The decrease in the concentration of Ang-(1-7) in the disease endpoint could suggest a lack of neuroprotective mechanisms. The improvement in cognitive decline following intracerebroventricular infusion of Ang-(1-7) in a mouse model of Alzheimer's Disease [39], supports our findings.

Regarding the ACE/Ang II/AT1 receptor axis, we showed that the BACHD mice displayed enhanced mRNA expression of the AT₁ receptor in all brain areas evaluated. Alterations in components of the RAS classical axis have been reported in brain samples of HD patients in comparison with controls [26,28,29]. Lower ACE activity was found in the striatum [26] as well as in the caudate nucleus [29] and substantia nigra [28] of HD patients. On the other hand, higher ACE activity was reported in the cerebrospinal fluid of HD patients compared with controls [30]. In addition, a study investigated the effects of Trandolapril, an ACE inhibitor, in an experimental model of HD induced by the infusion of 3-Nitropropionic acid (3-NP) in the striatum of rats. The administration of Trandolapril (4 and 6 mg/kg, p.o) daily for 12 days prevented motor and behavioral deficits and attenuated oxidative stress and mitochondrial enzyme activities in rat brains [40]. Finally, a study employing radioligand analysis revealed a 35% decrease in the levels of AT₁ receptors in the putamen of HD patients in comparison with controls [31].

Herein, we also evaluated the levels of RAS components in the plasma of manifest HD gene carriers and controls. Patients with manifest HD presented higher circulating levels of Ang-(1-7) in comparison with controls, which might be a compensatory mechanism in an attempt to maintain the central nervous system homeostasis.

Although the pathophysiological significance of our findings is yet to be explained, they may support the scenario of ACE/Ang II/AT1 receptor axis activation and a counter-regulatory role of Ang-(1-7) in maintaining the brain function in response to neurodegenerative events. It has already been demonstrated that ACE2 plays a neurotrophic and protective role by activating the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis, inhibiting cognitive impairment in neurodegenerative diseases [41,42]. For instance, activation of the ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis inhibited cognitive deficits in a rodent model of Alzheimer's disease, potentially through its anti-apoptotic, anti-inflammatory, and neurotrophic effects [42]. Accordingly, cerebrospinal fluid levels of ACE were associated with an Amyloid- β_{42} burden in patients diagnosed with Alzheimer's Disease [43]. Finally, another study that investigated the circulating levels of RAS components in patients with Parkinson's disease, also showed that lower circulating levels of Ang I, Ang II, and Ang-(1-7) were associated with increased severity of depressive symptoms [44].

A recent study from our workgroup demonstrated that despite the similar plasma levels of RAS components between controls, premanifest, and manifest HD gene carriers, there is a positive correlation between ACE2 levels and scores in the Verbal Fluency Test in HD. Thus, higher levels of ACE2 were associated with better verbal function. A negative correlation between Ang II levels and general cognition scores in the Mini-Mental State Examination was also found, indicating that higher concentrations of Ang II were associated

with worse cognitive performance [45]. Taken together, these findings support a protective role of the counter-regulatory axis in HD. Further studies are necessary to better address whether RAS modulators that potentiate the ACE2 /Ang-(1-7) /Mas receptor axis and/or inhibit the ACE2 /AngII /AT₁ receptor axis may improve HD-associated neuronal loss and symptoms.

In line with our findings, previous studies have demonstrated impairments in the ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis in other neurodegenerative diseases [18,21,39,46,47]. For instance, decreased levels of Ang-(1-7) were reported in the prefrontal cortex and hippocampus of senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice, a model for examining the pathophysiology of early changes in AD [48]. Importantly, an inverse correlation was also found between concentrations of Ang-(1-7) and tau hyperphosphorylation in those brain regions [48]. Similar findings were described in P301S mice, an animal model of tauopathy, supporting the role of the RAS alternative axis in neurodegenerative diseases [46]. In addition, intracerebroventricular infusion of Ang-(1-7) prevented cognitive decline and attenuated the hippocampal levels of phospho-tau and amyloid-beta peptide in other rodent models of AD [39,47]. Of note, the administration of A-779, an antagonist of the Mas receptor, hampered the beneficial effects of Ang-(1-7), indicating that the Ang-(1-7) protective activity was mediated by the activation of Mas receptors [47]. Corroborating these findings, the intraperitoneal injection of diminazene aceturate (DIZE), an ACE2 activator, improved cognitive impairment and synaptic and neuronal losses in the brains of SAMP8 mice [49]. Evidence from preclinical studies highlights the brain ACE2/Ang-(1-7)/Mas receptor axis as a potential target for the treatment of neurodegenerative diseases. In humans, a post-mortem study showed a reduction in ACE2 activity in the mid-frontal cortex of patients with AD compared with age-matched non-demented controls, corroborating, at least in part, our findings [21]. In addition, patients with AD had lower plasma levels of Ang-(1-7) than sex and age-matched controls and these levels were positively correlated with white matter lesions in magnetic resonance imaging [18].

Our findings provide original evidence that changes in the RAS classical and counter-regulatory axes may play a pathophysiological role in HD. Further studies are necessary to broaden our knowledge regarding the mechanisms underlying the RAS alternative arm's protective effects and whether modulators of RAS might be a promising therapeutic strategy in HD.

4. Materials and Methods

4.1. Animal Model and Ethical Procedures

Our institutional committee that regulates the use of laboratory animals (Ethics Committee on Animal Experiments-CEUA/UFMG) approved all experimental protocols under protocol #036/2013. The FVB/NJ (wild-type-WT) and FVB/N-Tg (HTT * 97Q) IXwy/J (BACHD) transgenic mice (male) were held in a place with a controlled temperature (23 °C) in a 12–12h light–dark cycle. Food and water were provided ad libitum in an animal care facility at our institution. All animals used in this study were genotyped as previously described by [50]. In this study, we used 24-month-old WT and BACHD mice. We used 24-month-old BACHD animals, as these animals have established brain degeneration [34], allowing the investigation of potential RAS changes in the main brain areas affected by HD.

4.2. Open Field Test

Spontaneous locomotor activity was assessed using an automatic open field apparatus (LE 8811 IR Motor Activity Monitors PANLAB, Harvard Apparatus; Barcelona, Spain), with acrylic box dimensions of 450 × 450 × 200 mm (width × depth × height). The open field was novel to the animals and the illumination in the room was 200 lx. Quantification of total activity was calculated using the ACTITRACK program (Panlab, Barcelona, Spain). The animals were placed in the center of the open field. The total distance traveled and the number of rearings were recorded during 10 min [51].

4.3. Rotarod

A rotarod [Insight, Ribeirão Preto, Brazil, 40 (w) × 30 (d) × 38 (h) cm; 16 r.p.m.] was used to evaluate motor coordination. In the rotarod experiments, mice were exposed to a pretest with 5 sessions of 2 min each. Animals that failed to equilibrate for 2 min in at least 1 of the 5 attempts were excluded from the experiment. After 24 h, the mice that completed the previous task were exposed again to the apparatus. Latency to fall from the rotating cylinder was recorded. The time limit for mice to remain on the rotarod was up to 300 s [52,53].

4.4. Wire Hang Test

The wire hang test was used to assess balance and muscle strength. This apparatus consists of a box (10 × 10 × 10 cm) and a wire mesh grid on its top. To evaluate muscle strength, the animals were placed on the wire mesh, which was then inverted so that the animal gripped the wire. Latency to fall was recorded with a 120 s cut-off time [54].

4.5. Measurement of RAS Components

Key brain regions such as the prefrontal cortex, hippocampus, and striatum were carefully dissected and then homogenized in an extraction solution (100 mg of tissue per milliliter), containing 0.4 M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 KIU aprotinin, using Ultra-Turrax (IKA®-Werke GmbH & CO, Staufen, Alemanha). Lysates were centrifuged at 13,000× g for 10 min at 4 °C and supernatants were collected. Samples were then thawed and the tissue levels of ACE, Ang II, ACE2, and Ang-(1-7) were measured by ELISA, according to the procedures supplied by the manufacturer (MyBioSource, San Diego, CA, USA). All kits applied the sandwich ELISA technique, except for the ACE measurement, whose kit applied the competitive ELISA method. The sensitivity of the assay was 10 pg/mL for ACE and ACE2; 12 pg/mL for Ang II; and 1.5 pg/mL for Ang-(1-7).

4.6. Measurement of ACE2 Activity

The enzymatic activity of ACE2 was determined in the striatum, prefrontal cortex, and hippocampus homogenates using a fluorogenic substrate (fluorogenic peptide VI; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). The enzymatic activity was measured using the SpectraMax Gemini EM Fluorescence Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA), as previously described [55,56]. Samples were read every minute for 60 min, beginning immediately after the addition of the fluorogenic peptide substrate at 37 °C. The results of each sample were expressed as arbitrary units (a.u.) corresponding to the average of the last 5 min of readings when the reaction reached the plateau, corrected for mg of protein, which was measured by the Bradford method.

4.7. Measurement of RAS Receptors' mRNA Expression

The striatum, prefrontal cortex, and hippocampus samples were collected immediately on dry ice and stored at −80 °C to prevent RNA degradation. Total RNA isolation was performed following the Trizol reagent method (Invitrogen, Life Technologies, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA samples (2 µg) were treated with DNase to eliminate genomic DNA present in the samples. The mRNA expression was assessed by qRT-PCR after reverse transcription with Moloney murine leukemia virus (MML-V) (Invitrogen Life Technologies, Waltham, MA, USA). The cDNA for endogenous S26 ribosomal (endogenous control) and AT₁, AT₂, and Mas receptors were amplified using specific primers and SYBR Green reagent (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). The reactions were performed using 40 cycles and an annealing temperature of 60 °C (ABI Prism 7000, Applied Biosystem, Waltham, MA, USA). The gene expression was quantified using the comparative threshold cycle (Ct) method. Primer sequences were AT₁: 5'-GGT GGG AAT ATT GGA AAC AG-3' (forward) and 5'-AAG AAG AAA AGC ACA ATC GCC-3' (reverse); AT₂: 5'-GCT GAG TAA GCT GAT TTA TG-3' (forward) and 5'TTA AGA CAC

AAA GGT GTC CA-3' (reverse); Mas receptor: 5'-CCC ACC CAT TCC CAT AGT GC-3' (forward) and 5'-CCG AGA GGA GAG ATG CTC ATG-3' (reverse); and the endogenous control S26: 5'-CGA TTC CTG ACA ACC TTG CTA TG-3' (forward) and 5'-CGT GCT TCC CAA GCT CTA TGT-3' (reverse).

4.8. Assessment of Plasma Levels of Proteins Related to the RAS in Human Samples

Herein, we included 22 patients with a genetic and clinical diagnosis of HD (manifest HD) and a group of 16 controls with comparable age, sex, and body mass index (BMI). The genetic diagnosis was confirmed by a genotype larger CAG allele ≥ 36 . The clinical HD diagnosis was based on the motor signs certainty, i.e., a Diagnostic Confidence Level (DCL) set to 4 in the Unified HD Rating Scale (UHDRS) (1). Patients were recruited from the Huntington's Disease Society of America (HDSA) Center of Excellence at the University of Texas Health Science Center in Houston (UTHealth). Controls were recruited from the local community, comprising a group of people with no history of neurological or psychiatric disorders. All subjects provided written informed consent before admission to the study. The Research Ethics Committee of UTHealth approved this study.

Ten milliliters of blood were drawn by venipuncture in vacuum tubes containing heparin, on the same day of the clinical assessment. Blood was collected in a non-fasting state. Whole blood samples collected were used for plasma obtaining within two hours of having been drawn. These samples were centrifuged twice at $3000 \times g$ for 10 min at a temperature of 4 °C. Plasma was collected and stored at -80 °C until assayed. Samples were then thawed and plasma levels of Ang II, Ang-(1-7), ACE, and ACE2 were measured by ELISA according to the procedures supplied by the manufacturer (MyBioSource, San Diego, CA, USA). All kits applied the sandwich ELISA technique, except for the ACE measurement, whose kit applied the competitive ELISA method. Concentrations were expressed as pg/mL. The sensitivity of the assays was 1.0 pg/mL for ACE and ACE2; 2.0 pg/mL for Ang-(1-7); and 18.75 pg/mL for Ang II.

4.9. Statistical Analysis

All values of animal protocols were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences among groups were assessed by Student's *t*-test. For the protocols using human samples, the statistical analysis was performed as follows: Association between dichotomous variables was assessed with Fisher's exact test. All variables were tested for Gaussian distribution using the Kolmogorov–Smirnov normality test. Comparisons between patients and controls were made using the Student's *t*-test, when the data were determined to follow a normal distribution, or the Mann–Whitney test when the variables did not follow a normal distribution.

All statistical tests were two-tailed and were performed using a significance level of $\alpha = 0.05$. Statistical analyses were performed using SPSS software version 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) as well as GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Author Contributions: Conceptualization, L.M.K., N.P.R., P.A.C.V., A.S.M. and C.G.; Methodology, L.M.K., N.P.R., P.A.C.V., A.S.M., T.C.G.M., K.B.S., J.V.J.-S., L.B.L., G.D.C., A.F.A.-S. and C.G.; Formal Analysis, L.M.K., N.P.R. and P.A.C.V.; Investigation, L.M.K., N.P.R., P.A.C.V., A.S.M. and C.G.; Resources, L.M.K., N.P.R., P.A.C.V., A.S.M. and C.G.; Data Curation, L.M.K., N.P.R., P.A.C.V., A.S.M. and C.G.; Writing–Original Draft Preparation, L.M.K., N.P.R. and P.A.C.V.; Writing–Review and Editing, P.A.C.V.; Visualization, E.F.S., A.C.S.e.S., A.S.M., A.L.T. and C.G.; Supervision, E.F.S., A.C.S.e.S., A.S.M., A.L.T. and C.G.; Project Administration, A.S.M. and C.G.; Funding Acquisition, A.S.M. and C.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the committee that regulates the use of laboratory animals (Ethics Committee on Animal Experiments-CEUA/UFGM), which approved all experimental protocols under protocol #036/2013. For the clinical data, the Research Ethics Committee of UHealth approved this study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available due to [NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- MacDonald, M.E.; Ambrose, C.M.; Duyao, M.P.; Myers, R.H.; Lin, C.; Srinidhi, L.; Barnes, G.; Taylor, S.A.; James, M.; Groot, N.; et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **1993**, *72*, 971–983. [\[CrossRef\]](#)
- Bates, G.P.; Dorsey, R.; Gusella, J.F.; Hayden, M.R.; Kay, C.; Leavitt, B.R.; Nance, M.; Ross, C.A.; Scahill, R.I.; Wetzel, R.; et al. Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 15005. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bano, D.; Zanetti, F.; Mende, Y.; Nicotera, P. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, e22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Walker, F. Huntington's disease. *Lancet Neurol.* **2017**, *369*, 218–228. [\[CrossRef\]](#)
- Vonsattel, J.-P.; Myers, R.H.; Stevens, T.J.; Ferrante, R.J.; Bird, E.D.; Richardson, E.P. Neuropathological Classification of Huntington's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1985**, *44*, 559–577. [\[CrossRef\]](#)
- Ross, C.A.; Tabrizi, S.J. Huntington's Disease: From Molecular Pathogenesis to Clinical Treatment. *Lancet Neurol.* **2011**, *10*, 83–98. [\[CrossRef\]](#)
- Li, S.-H.; Li, X.-J. Huntingtin–protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet.* **2004**, *20*, 146–154. [\[CrossRef\]](#)
- van der Burg, J.; Björkqvist, M.; Brundin, P. Beyond the brain: Widespread pathology in Huntington's disease. *Lancet Neurol.* **2009**, *8*, 765–774. [\[CrossRef\]](#)
- Papoutsis, M.; Labuschagne, I.; Tabrizi, S.J.; Stout, J.C. The cognitive burden in Huntington's disease: Pathology, phenotype, and mechanisms of compensation. *Mov. Disord.* **2014**, *29*, 673–683. [\[CrossRef\]](#)
- McColgan, P.; Tabrizi, S.J. Huntington's disease: A clinical review. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 24–34. [\[CrossRef\]](#)
- Baake, V.; Reijntjes, R.; Dumas, E. Cognitive decline in Huntington's disease expansion gene carrier. *Cortex* **2017**, *95*, 51–62. [\[CrossRef\]](#)
- Lavoie, J.L.; Sigmund, C.D. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **2003**, *144*, 2179–2183. [\[CrossRef\]](#)
- Paul, M.; Mehr, A.P.; Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 747–803. [\[CrossRef\]](#)
- Fyhrquist, F.; Saijonmaa, O. Renin-angiotensin system revisited. *J. Intern. Med.* **2008**, *264*, 224–236. [\[CrossRef\]](#)
- Fountain, J.; Lappin, S. *Physiology, Renin Angiotensin System*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2017. [\[PubMed\]](#)
- Van Thiel, B.S.; Góes Martini, A.; Te Riet, L.; Severs, D.; Uijl, E.; Garrelds, I.M.; Leijten, F.P.J.; Van Der Pluijm, I.; Essers, J.; Qadri, F.; et al. Brain Renin-Angiotensin System Does It Exist? *Hypertension* **2017**, *69*, 1136–1144. [\[CrossRef\]](#)
- Von Bohlen Und Halbach, O.; Albrecht, D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res.* **2006**, *326*, 599–616. [\[CrossRef\]](#)
- Ribeiro, V.T.; Cordeiro, T.M.E.; da Silva Filha, R.; Perez, L.G.; Caramelli, P.; Teixeira, A.L.; de Souza, L.C.; Simões e Silva, A.C. Circulating Angiotensin-(1–7) Is Reduced in Alzheimer's Disease Patients and Correlates With White Matter Abnormalities: Results From a Pilot Study. *Front. Neurosci.* **2021**, *15*, 636754. [\[CrossRef\]](#)
- Kangussu, L.; Almeida-Santos, A.; Bader, M.; Alenina, N.; Fontes, M.A.P.; Santos, R.A.S.; Aguiar, D.C.; Campagnole-Santos, M.J. Angiotensin-(1–7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behav. Brain Res.* **2013**, *257*, 25–30. [\[CrossRef\]](#)
- Almeida-Santos, A.; Kangussu, L. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1–7): Role of the Mas receptor. *Behav. Brain Res.* **2017**, *331*, 193–198.
- Kehoe, P.G.; Wong, S.; Al Mulhim, N.; Palmer, L.E.; Miners, J.S. Angiotensin-converting enzyme 2 is reduced in Alzheimer's disease in association with increasing amyloid- β and tau pathology. *Alzheimers Res. Ther.* **2016**, *8*, 50. [\[CrossRef\]](#)
- Tian, M.; Zhu, D.; Xie, W. Central angiotensin II-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in normal rat brains. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 3737–3745. [\[CrossRef\]](#)
- Mertens, B.; Vanderheyden, P.; Michotte, Y.; Sarre, S. The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **2010**, *11*, 49–56. [\[CrossRef\]](#)
- Ribeiro, F.M.; Furr-Stimming, E.; Teixeira, A.L. Neuroimmunology of Huntington's disease: Revisiting evidence from human studies. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 8653132.

25. Kawajiri, M.; Mogi, M.; Higaki, N.; Matsuoka, T.; Ohyagi, Y.; Tsukuda, K.; Kohara, K.; Horiuchi, M.; Miki, T.; Kira, J.I. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **2009**, *15*, 262–265. [[CrossRef](#)]
26. Arregui, A.; Bennett, J.P.; Bird, E.D.; Yamamura, H.I.; Iversen, L.L.; Snyder, S.H. Huntington's chorea: Selective depletion of activity of angiotensin converting enzyme in the corpus striatum. *Ann. Neurol.* **1977**, *2*, 294–298. [[CrossRef](#)]
27. De Mello, W.C.; Gerena, Y.; Ayala-Peña, S. Angiotensins and Huntington's disease: A study on immortalized progenitor striatal cell lines. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 108. [[CrossRef](#)]
28. Arregui, A.; Emson, P.C.; Spokes, E.G. Angiotensin-converting enzyme in substantia nigra: Reduction of activity in Huntington's disease and after intrastriatal kainic acid in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1978**, *52*, 121–124. [[CrossRef](#)]
29. Butterworth, J. Changes in Nine Enzyme Markers for Neurons, Glia, and Endothelial Cells in Agonal State and Huntington's Disease Caudate Nucleus. *J. Neurochem.* **1986**, *47*, 583–587. [[CrossRef](#)]
30. Schweisfurth, H.; Schiöberg-Schiegnitz, S.; Kuhn, W.; Parusel, B. Angiotensin I converting enzyme in cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *Klin. Wochenschr.* **1987**, *65*, 955–958. [[CrossRef](#)]
31. Ge, J.; Barnes, N.M. Alterations in angiotensin AT1 and AT2 receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *297*, 299–306. [[CrossRef](#)]
32. Baake, V.; Reijntjes, R.H.A.M.; Dumas, E.M.; Thompson, J.C.; REGISTRY Investigators of the European Huntington's Disease Network; Roos, R.A.C. Cognitive decline in Huntington's disease expansion gene carriers. *Cortex* **2017**, *95*, 51–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lee, D.H.; Heidecke, H.; Schröder, A.; Paul, F.; Wachter, R.; Hoffmann, R.; Ellrichmann, G.; Dragun, D.; Waschbisch, A.; Stegbauer, J.; et al. Increase of angiotensin II type 1 receptor auto-antibodies in Huntington's disease. *Mol. Neurodegener.* **2014**, *9*, 49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gray, M.; Shirasaki, D.I.; Cepeda, C.; André, V.M.; Wilburn, B.; Lu, X.-H.; Tao, J.; Yamazaki, I.; Li, S.-H.; Sun, Y.E.; et al. Full-Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 6182–6195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gironacci, M.M.; Vicario, A.; Cerezo, G.; Silva, M.G. The depressor axis of the renin-angiotensin system and brain disorders: A translational approach. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 1021–1038. [[CrossRef](#)]
36. Santos, R.A.S.; Sampaio, W.O.; Alzamora, A.C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M.J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 505–553. [[CrossRef](#)]
37. Santos, R.A.S.; Oudit, G.Y.; Verano-Braga, T.; Canta, G.; Steckelings, U.M.; Bader, M. The renin-angiotensin system: Going beyond the classical paradigms. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2019**, *316*, H958–H970. [[CrossRef](#)]
38. Menalled, L.; El-Khodori, B.F.; Patry, M.; Suárez-Fariñas, M.; Orenstein, S.J.; Zahasky, B.; Leahy, C.; Wheeler, V.; Yang, X.W.; MacDonald, M.; et al. Systematic behavioral evaluation of Huntington's disease transgenic and knock-in mouse models. *Neurobiol. Dis.* **2009**, *35*, 319–336. [[CrossRef](#)]
39. Uekawa, K.; Hasegawa, Y.; Senju, S.; Nakagata, N.; Ma, M.; Nakagawa, T.; Koibuchi, N.; Kim-Mitsuyama, S. Intracerebroventricular Infusion of Angiotensin-(1-7) Ameliorates Cognitive Impairment and Memory Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *53*, 127–133. [[CrossRef](#)]
40. Hariharan, A.; Shetty, S.; Shirole, T.; Jagtap, A.G. Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Neurotoxicology* **2014**, *45*, 139–148. [[CrossRef](#)]
41. Kaur, P.; Muthuraman, A.; Kaur, M. The Implications of Angiotensin-Converting Enzymes and Their Modulators in Neurodegenerative Disorders: Current and Future Perspectives. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 508–521. [[CrossRef](#)]
42. Kamel, A.S.; Abdelkader, N.F.; El-Rahman, S.S.A.; Emara, M.; Zaki, H.F.; Khattab, M.M. Stimulation of ACE2/ANG(1-7)/Mas Axis by Diminazene Ameliorates Alzheimer's Disease in the D-Galactose-Ovariectomized Rat Model: Role of PI3K/Akt Pathway. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 8188–8202. [[CrossRef](#)]
43. Rocha, N.P.; Toledo, A.; Corgosinho, L.T.; de Souza, L.C.; Guimarães, H.C.; Resende, E.P.; Braz, N.F.; Gomes, K.B.; e Silva, A.C.S.; Caramelli, P.; et al. Cerebrospinal Fluid Levels of Angiotensin-Converting Enzyme Are Associated with Amyloid- β 42 Burden in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2018**, *64*, 1085–1090. [[CrossRef](#)]
44. Rocha, N.P.; Scalzo, P.L.; Barbosa, I.G.; de Campos-Carli, S.M.; Tavares, L.D.; de Souza, M.S.; Christo, P.P.; Reis, H.J.; e Silva, A.C.S.; Teixeira, A.L. Peripheral levels of angiotensins are associated with depressive symptoms in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **2016**, *368*, 235–239. [[CrossRef](#)]
45. Rocha, N.P.; Cleary, C.; Colpo, G.D.; Stimming, E.F.; Teixeira, A.L. Peripheral Levels of Renin-Angiotensin System Components Are Associated with Cognitive Performance in Huntington's Disease. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 594945. [[CrossRef](#)]
46. Jiang, T.; Zhang, Y.-D.; Zhou, J.-S.; Zhu, X.-C.; Tian, Y.-Y.; Zhao, H.-D.; Lu, H.; Gao, Q.; Tan, L.; Yu, J.-T. Angiotensin-(1-7) is Reduced and Inversely Correlates with Tau Hyperphosphorylation in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2015**, *53*, 2489–2497. [[CrossRef](#)]
47. Chen, J.-L.; Zhang, D.-L.; Sun, Y.; Zhao, Y.-X.; Zhao, K.-X.; Pu, D.; Xiao, Q. Angiotensin-(1-7) administration attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in rats with streptozotocin-induced diabetes via Mas receptor activation. *Neuroscience* **2017**, *346*, 267–277. [[CrossRef](#)]

48. Morley, J.E.; Farr, S.A.; Kumar, V.B.; Armbrecht, H.J. The SAMP8 Mouse: A Model to Develop Therapeutic Interventions for Alzheimers Disease. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 1123–1130. [[CrossRef](#)]
49. Duan, R.; Xue, X.; Zhang, Q.-Q.; Wang, S.-Y.; Gong, P.-Y.; E, Y.; Jiang, T.; Zhang, Y.-D. ACE2 activator diminazene acetate ameliorates Alzheimer's disease-like neuropathology and rescues cognitive impairment in SAMP8 mice. *Aging* **2020**, *12*, 14819–14829. [[CrossRef](#)]
50. Valadão, P.A.C.; De Aragão, B.C.; Andrade, J.N.; Magalhães-Gomes, M.P.S.; Foureaux, G.; Joviano-Santos, J.V.; Nogueira, J.C.; Ribeiro, F.; Tapia, J.C.; Guatimosim, C. Muscle atrophy is associated with cervical spinal motoneuron loss in BACHD mouse model for Huntington's disease. *Eur. J. Neurosci.* **2016**, *45*, 785–796. [[CrossRef](#)]
51. Leite, J.V.; Guimarães, F.S.; Moreira, F.A. Aripiprazole, an atypical antipsychotic, prevents the motor hyperactivity induced by psychotomimetics and psychostimulants in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *578*, 222–227. [[CrossRef](#)]
52. Sousa, N.; Genes, O.A.; Wotjak, C.T. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav.* **2006**, *5* (Suppl. S2), 5–24. [[CrossRef](#)]
53. Viana, T.G.; Almeida-Santos, A.F.; Aguiar, D.C.; Moreira, F.A. Effects of Aripiprazole, an Atypical Antipsychotic, on the Motor Alterations Induced by Acute Ethanol Administration in Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *112*, 319–324. [[CrossRef](#)]
54. Tanaka, H.; Ma, J.; Tanaka, K.F.; Takao, K.; Komada, M.; Tanda, K.; Suzuki, A.; Ishibashi, T.; Baba, H.; Isa, T.; et al. Mice with Altered Myelin Proteolipid Protein Gene Expression Display Cognitive Deficits Accompanied by Abnormal Neuron–Glial Interactions and Decreased Conduction Velocities. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 8363–8371. [[CrossRef](#)]
55. Huentelman, M.J.; Zubcevic, J.; Katovich, M.J.; Raizada, M.K. Cloning and characterization of a secreted form of angiotensin-converting enzyme 2. *Regul. Pept.* **2004**, *122*, 61–67. [[CrossRef](#)]
56. Kangussu, L.M.; Guimaraes, P.S.; Nadu, A.P.; Melo, M.B.; Santos, R.A.; Campagnole-Santos, M.J. Activation of angiotensin-(1–7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology* **2015**, *97*, 58–66. [[CrossRef](#)]