



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**ADAPTAÇÕES DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E
DAS CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN
EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MUSCULAR**

MATHEUS BERTANHA FIOR



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**ADAPTAÇÕES DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E
DAS CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN
EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MUSCULAR**

MATHEUS BERTANHA FIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).
Orientador: Dr. Adriano Polican Ciena
Coorientadora: Paula Oliveira Camargo

F517a Fior, Matheus Bertanha
Adaptações da junção neuromuscular e das células
perissinápticas de schwann em modelo experimental de lesão
muscular / Matheus Bertanha Fior. -- Rio Claro, 2026
60 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena
Coorientadora: Paula Oliveira Camargo

1. Músculo esquelético. 2. Junção Neuromuscular. 3.
Mofologia. 4. Biologia celular. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ADAPTAÇÕES DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR E DAS CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MUSCULAR

AUTOR: MATHEUS BERTANHA FIOR

ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA

COORIENTADORA: PAULA OLIVEIRA CAMARGO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANO POLICAN CIENA**
Data: 16/07/2025 11:19:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA (Participação Virtual)
Departamento de Educação Física / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Documento assinado digitalmente
 **AMILTON CESAR DOS SANTOS**
Data: 16/07/2025 11:08:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. AMILTON CESAR DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Morfológicas / Centro Universitário Fundação de Ensino Octávio Bastos

Prof. Dr. ROBSON CHACON CASTOLDI (Participação Virtual)
Universidade Anhanguera de São Paulo / Unidade de Sumaré / SP

Documento assinado digitalmente
 **ROBSON CHACON CASTOLDI**
Data: 16/07/2025 11:02:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rio Claro, 16 de julho de 2025

Dedicatória

Esse trabalho é dedicado a todos aqueles que me ajudaram a ser obstinado no caminho, fornecendo apoio e companheirismo durante toda jornada na pós-graduação, apesar dos momentos de loucura e tristeza, os momentos incríveis foram transformadores.

Agradecimentos

Agradeço imensamente a Gislaine Carvalho Rodrigues, uma mulher incrível que sempre me acompanhou em meus momentos de alegria, e nos momentos difíceis, durante toda minha evolução desde quando eu estava no ensino fundamental e era apenas uma criança com medos e traumas, me forneceu apoio e compreensão, acreditou em todo meu potencial e ajudou a manter os meus pés firmes no caminho que sempre sonhei trilhar, todo seu trabalho me transformou em quem eu sou hoje e me permitiu ver toda a beleza da vida e querer viver cada vez mais e realizar todos os sonhos. Agradeço aos meus pais Itamar e Gislene e a minha irmã Stella, que sempre estão presentes e me deram suporte para realizar meus sonhos, muito amor e gratidão a vocês três.

Francisca Lidiana Nunes, uma das pessoas mais maravilhosas dessa minha vida, que considero com imenso respeito, amor e carinho, sempre foi extremamente carinhosa, cuidadosa e com ensinamentos incríveis, só tenho a agradecer por ter tido a oportunidade de crescer com a sua participação na minha vida por tantos anos, não poderia ser mais feliz por tudo que já fez por mim e por me ensinar o que é amor e aceitação todos os dias.

As Professoras Diana Costa Nascimento, Andréia Rodrigues Bucci, Marta Maria Chirchia Pinto Luppi e Maria Magali Stelato que foram essenciais durante todo período da graduação, me guiando e fazendo crescer em mim a vontade de ser professor, meu eterno carinho, admiração e gratidão por ter tido a chance de conhecer mulheres tão incríveis e inspiradoras.

Agradeço aos meus amigos, Karina, Natalia, Jhow, Baratão, Gabão, Milton, João e Zabella que em meio a todo caos da vida se fizeram presente, com muito amor companheirismo, risos, choros, compreensão e apoio incondicional, acompanhamos o crescimento uns dos outros, tenho muito orgulho de todos, que nossa amizade se mantenha forte com a benção dos deuses por muitos e muitos anos. Ao meu amigo Edilson que contribuiu muito para minha evolução e crescimento no caminho do conhecimento e me inspirou a adentrar no mundo acadêmico, minha gratidão por todo companheirismo e ensinamentos.

Um agradecimento especial à Professora Paula Oliveira Camargo por ter me aberto portas para adentrar no mundo acadêmico e pelo apoio durante minha pesquisa.

Agradeço aos meus colegas da veterinária Danae Fernanda Avanze Cação, pela oportunidade de confiar em mim para o primeiro emprego como médico veterinário e por todo aprendizado que adquiri dessa mulher incrível e extremamente talentosa, Andrez La Serra Hansen e Luis Guilherme Fantini por todo apoio e ensinamentos e momentos de loucura durante meu trajeto na clínica.

Meus mais sinceros agradecimentos ao doutorando Jurandyr Pimentel Neto que por muitas vezes me salvou nas dificuldades e sanou todas as dúvidas desde o primeiro dia, me ensinou as técnicas e boas práticas do nosso laboratório, me ajudou a manter a sanidade nos momentos de loucura com seu bom humor e amizade, essas lembranças serão guardadas com muito carinho.

Agradeço muito às minhas colegas de laboratório Mariana Baptista, Isabela Gomes e Lara Caetano Rocha Braga, por todos os bons momentos durante essa jornada e por toda ajuda nas pesquisas e pelo bom acolhimento e conselhos aconchegantes durante as tempestades emocionais.

Ao Professor Adriano Polican Ciena serei eternamente grato pela oportunidade que me foi fornecida, pela mudança de vida e por toda evolução pessoal e profissional que pude obter desde o dia que entrei no programa, passei por momentos incríveis e de enorme transformação, todos esses momentos serão lembrados com muito carinho e gratidão.

Um enorme agradecimento ao Professor Henrique Ferreira do laboratório de genética de bactérias e todos os seus alunos que forneceram ajuda e disponibilizaram seu tempo e os equipamentos necessários para que fosse possível finalizar minhas pesquisas.

Agradeço ao Técnico José Roberto que desde o início ajudou no cuidado dos animais até no processamento das amostras e realização das técnicas laboratoriais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E para finalizar um agradecimento especial para, Jennifer Prioli e Luke Leo por fornecer subsídio para manter minha sanidade nos momentos mais loucos, salvaram minha vida de diversas formas com o humor e a insanidade desenfreada também, foram indispensáveis para que eu pudesse finalizar esse trabalho, mesmo sem conhecer vocês pessoalmente, vou ser eternamente grato por estarem presentes nessa trajetória.

RESUMO

O tecido muscular é o mais abundante no organismo dos vertebrados, responsável principalmente pela manutenção postural e reserva energética, com alta capacidade adaptativa. A junção neuromuscular é um componente de grande importância para o funcionamento muscular, responsável pela conversão dos impulsos elétricos em químicos, necessários para a contração muscular, além disso, é considerada uma região estrutural com notável capacidade adaptativa e ampla plasticidade. As células perissinápticas de Schwann (CPS) tem uma importante incumbência na composição celular da estrutura da junção neuromuscular, atuam como alicerces que fornecem sustentação e participam essencialmente da regeneração e adaptação da região. A maior incidência de alterações do tecido muscular se dá em detrimento da prática de exercícios físicos, que frente a sua intensidade podem gerar lesões, que se estendem pelo tecido e afetam a estrutura da junção neuromuscular. Lesões indiretas por contração excêntrica são consideradas as de maior taxa de ocorrência, consequentemente podem afetar a estrutura da junção neuromuscular e assim sua funcionalidade. O objetivo do presente estudo está na análise e descrição das adaptações morfoquantitativas no músculo quadríceps femoral de ratos *Wistar* adultos, submetidos ao protocolo experimental de lesão muscular induzida por contração excêntrica. Foram utilizados 50 animais machos organizados em 2 Grupos: Controle (C) e Pós Lesão (PL0H; PL24H; PL4D e PL7D). Em relação à massa corporal e muscular dos animais, não foram obtidas alterações significativas nos grupos e períodos analisados. Nas análises de microscopia de luz observamos a organização e disposição dos núcleos celulares no tecido muscular, desta forma foi possível analisar as variáveis referentes a densidade deste elemento, que apresentaram redução da dimensão fractal em todos os grupos experimentais e aumento da área nuclear nos grupos PL0H e PL24H. Após a realização da imunomarcação dos principais elementos estruturais (pré e pós sinápticos) e celulares da junção neuromuscular. Com os dados da região pré-sináptica obtivemos em relação a área, o aumento no grupo PL24H, já quanto aos dados do perímetro o todos os grupos apresentaram ligeiro aumento com destaque para o grupo PL0H, na dispersão observamos a redução do grupo PL24H sem diferença entre os outros grupos experimentais. Os dados referentes a região pós-sináptica como a área e o perímetro apresentaram aumento do grupo PL0H e PL24H e redução nos grupos PL4D e PL7D, em relação aos dados obtidos pela análise da dispersão todos os grupos experimentais apresentaram alterações significativas em comparação com o grupo controle ($p < 0.0001$).

A marcação dos núcleos demonstrou alterações significativas em relação ao grupo PL0H ($p < 0.01$), com aumento também do grupo PL24H e o grupo PL7D apresentou valores próximos ao do grupo Controle. Concluimos que o protocolo experimental de lesão muscular induzida por contração excêntrica gera alterações como aumento das estruturas pré e pós-sinápticas nos grupos PL0H e PL24H e redução da região pós-sináptica nos grupos PL4D e PL7D na junção neuromuscular.

Palavras-chave: Receptores colinérgicos; Imunofluorescência; Músculo estriado esquelético; Contração excêntrica

ABSTRACT

Muscle tissue is the most abundant in the organism of vertebrates, primarily responsible for maintaining posture and energy reserves, with a high capacity for adaptation. The neuromuscular junction is a component of great importance for muscle function, responsible for converting electrical impulses into chemicals necessary for muscle contraction. Additionally, it is considered a structural region with remarkable adaptive capacity and extensive plasticity. Perisynaptic Schwann cells (CPS) play an important role in the cellular composition of the neuromuscular junction, acting as supportive scaffolds that provide stability and are essential in the regeneration and adaptation of the region. The highest incidence of muscle tissue alterations occurs due to physical exercise, which, depending on its intensity, can cause injuries that extend through the tissue and affect the structure of the neuromuscular junction. Indirect injuries caused by eccentric contraction are considered the most common and can consequently impact the structure and functionality of the neuromuscular junction. The aim of this study is to analyze and describe the morpho-quantitative adaptations observed in the quadriceps femoris muscle of adult Wistar rats subjected to an experimental protocol of muscle injury induced by eccentric contraction. In this study, 50 male animals were used, divided into 2 groups: Control (C) and Post-Lesion (PL0H, PL24H, PL4D, and PL7D). Regarding body and muscle mass, no significant changes were observed across the groups and periods analyzed. Light microscopy analyses revealed the organization and arrangement of cell nuclei within the muscle tissue, allowing for the assessment of variables related to nuclear density. These variables showed a reduction in fractal dimension across all experimental groups and an increase in nuclear area in groups PL0H and PL24H. After immunolabeling of the main structural (pre and postsynaptic) and cellular components of the neuromuscular junction, the data from the presynaptic region showed an increase in area in group PL24H, while perimeter values slightly increased in all groups, especially in group PL0H. Variability analysis indicated a reduction in the PL24H group, with no differences among the other experimental groups. For the postsynaptic region, parameters such as area and perimeter increased in groups PL0H and PL24H and decreased in groups PL4D and PL7D. When analyzing dispersion, all experimental groups showed significant changes compared to the control group ($p < 0.0001$). Nuclei labeling demonstrated significant alterations in group PL0H ($p < 0.01$), with increases also observed in group PL24H. The PL7D group showed values close to the control group. We conclude that the experimental protocol of muscle injury induced by eccentric contraction causes alterations such as increased pre- and postsynaptic structures in groups PL0H and PL24H, and a reduction in the postsynaptic region in groups PL4D and PL7D at the neuromuscular junction.

Key-words: Cholinergic receptors; Immunofluorescence; Skeletal striated muscle; Eccentric contraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1.</i> Diagrama da organização muscular e os principais componentes do músculo	19
<i>Figura 2.</i> Junção neuromuscular, estrutura e componentes.....	22
<i>Figura 3.</i> Delineamento e organização dos grupos para realização do protocolo de exercício - contração excêntrica.....	26
<i>Figura 4.</i> Coleta das amostras e processamento para as análises microscópicas...	29
<i>Figura 5.</i> Médias e desvio-padrões, razão/massa corporal e a massa muscular (músculo quadríceps femoral) dos grupos controle, 0 hora, 24 horas, 4 dias e 7 dias.	33
<i>Figura 6.</i> Imagens de microscopia de luz, coradas por Hematoxilina e Eosina de todos os grupos experimentais.	35
<i>Figura 7.</i> Dados de área e dimensão fractal dos grupos experimentais.	37
<i>Figura 8.</i> Imunofluorescência da região pré-sináptica marcada com anti BSN	38
<i>Figura 9.</i> Descrição morfoquantitativa da região pré-sináptica da junção neuromuscular.	41
<i>Figura 10.</i> Imunofluorescência da região pós-sináptica marcada com anti- α -bungarotoxina	42
<i>Figura 11.</i> Descrição morfoquantitativa da região pós-sináptica da junção Neuromuscular.....	45
<i>Figura 12.</i> Imunofluorescência das células perissinápticas de Schwann marcado com anti-S100 β	47
<i>Figura 13.</i> Sobreposição dos componentes estruturais e celulares da JNM	48

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1.</i> Anticorpos e especificações para realização da técnica de imunofluorescência	31
---	----

LISTA DE ABREVIATÖES

JNM	Junção neuromuscular
CPS	Célula perissináptica de Schwann
AChR	Receptores de acetilcolina
BSA	Albumina sérica bovina
PBS	Solução salina tampão com fosfato
µm	Micrômetro
µm²	Micrômetro quadrado
BSN	Bassoon
PL	Pós lesão
C	Controle
UN	unidade
DF	dimensão fractal
g	gramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Músculo Estriado Esquelético.	18
2.1.1. Quadríceps Femoral.	19
2.2. Junção Neuromuscular (JNM).	20
2.3. Lesão Muscular e Contração Excêntrica.....	22
3. OBJETIVO GERAL	24
3.1. Objetivo Específico.	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Animais.....	24
4.2. Lesão muscular (contração excêntrica).....	25
4.3. Massa corporal e muscular	27
4.4. Processamento das amostras	27
4.5. Microscopia de Luz	27
4.6. Imunofluorescência - Junção Neuromuscular.....	28
4.7. Células Perissinápticas de Schwann.....	29
4.8. Região Pré-sináptica	30
4.9. Região Pós-sináptica	30
5. RESULTADOS	32
5.1. Massa corporal.....	32
5.2. Massa muscular.....	32
5.3. Microscopia de Luz	33
5.3.1. Núcleos Celulares - Hematoxilina e Eosina.....	33
5.4. Imunofluorescência.	37
5.4.1. Região pré-sináptica (Bassoon).....	37
5.4.2. Morfometria - Receptores pré-sinápticos (Bassoon).....	39
5.4.3. Região pós-sináptica (α -bungarotoxina).....	41
5.4.4. Morfometria - Receptores pós-sinápticos (AChR).....	43
5.4.5. Células perissinápticas de schwann e núcleos sinápticos (S100 β e DAPI)...	46
5.4.6. Contagem dos componentes sinápticos (DAPI).....	47
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS	55

APÊNDICE 1.....	60
-----------------	----

1. INTRODUÇÃO

O tecido muscular estriado esquelético é um dos tecidos mais profusos presente nos vertebrados, estreitamente relacionado com o equilíbrio, postura, armazenamento de energia e movimentação do corpo, além de possuir uma alta capacidade de remodelamento, frente à diferentes condições metabólicas e as necessidades apresentadas pelo organismo diante de situações adversas (CURY et al., 2018; DESCHENES et al., 2018; FRONTERA; ZAYAS; RODRÍGUEZ, 2012).

A capacidade contrátil é fundamental para as fibras musculares, que são classificadas por sua velocidade de contração ou velocidade metabólica, e são agrupadas em três tipos fundamentais em humanos: tipo I ou oxidativas lentas, tipo IIa que são glicolíticas oxidativas rápidas e tipo IIb que são glicolíticas rápidas. Em modelo experimental (*Wistar*) as fibras IIb dão lugar às fibras IIx (TAJSHARGHI, 2008; ROCHA et al., 2020).

A junção neuromuscular (JNM) é a região onde ocorre a conexão do terminal dos axônios motores à placa motora das fibras musculares, com a transcrição dos impulsos elétricos em impulsos químicos, combinados com fatores moleculares, desencadeiam o processo contrátil das fibras musculares. Através de uma ligação íntima com as células musculares, essa região possui alta capacidade adaptativa aos influxos internos e externos recebidos (IYER et al., 2021).

Para que a JNM funcione de maneira íntegra, observa-se um componente celular indispensável ligado a essa estrutura complexa, denominado de Célula Perissináptica de Schwann (CPS), caracterizado por fornecer subsídios cruciais para a produtividade, plasticidade, padronização e adaptabilidade estrutural da JNM, principalmente na atuação da intervenção em lesões dos tecidos adjacentes que afetam a JNM (PING-KO; ROBITAILLE, 2015; ALVAREZ SUAREZ et al., 2020).

As lesões musculares decorrem a partir de diversos fatores, sejam eles metabólicos, desequilíbrios homeostáticos ou causas externas, sendo descritas na literatura como grau 1, grau 2 e grau 3 (JARVINEN et al., 2013). O estudo sobre o impacto da lesão muscular sobre a JNM e CPS é de grande importância para o melhor entendimento em relação ao seu remodelamento e adaptações, frente aos diferentes níveis e intensidades, passíveis de ocorrência durante a contração excêntrica. Em

relação aos pontos evidenciados, com a realização do protocolo de contração excêntrica, torna-se plausível às argumentações sobre os comprometimentos que as lesões musculares podem gerar na JNM e CPS, viabilizando o entendimento das alterações morfológicas do tecido muscular e nervoso adjacentes e suas respostas ao quadro de lesão.

2. Revisão de literatura

2.1. Músculo Estriado Esquelético

O tecido muscular estriado esquelético constitui 50% do peso corporal total dos organismos vertebrados, e é caracterizado por seu envolvimento com a locomoção, postura, metabolismo e armazenamento de moléculas energéticas, com destaque às fibras musculares. Estas são células alongadas, cilíndricas e multinucleadas, com os seus núcleos distribuídos na periferia da célula localizados abaixo da membrana plasmática (ROMAN; GOMES, 2018).

A composição estrutural das fibras musculares inclui a presença de proteínas contráteis que efetuam a contração muscular. Essas proteínas formam um padrão de bandas claras e escuras que se alternam em sua organização, formando estrias transversais que dão origem aos sarcômeros (SILVERTHORN, 2010). As principais proteínas que compõem os sarcômeros são a miosina - denominada de filamento grosso, formada por miosina da classe II- e a actina-denominada de filamento fino que se agrupa com outras proteínas reguladoras, a troponina e a tropomiosina (LIEBER et al., 2017).

A capacidade contrátil das células em um organismo é uma propriedade fundamental, expressiva principalmente no tecido muscular, o qual apresenta alta taxa contrátil e elevada plasticidade (MOO et al., 2016). A contração muscular ocorre pelo movimento que a proteína estrutural actina tem sobre os filamentos proteicos de miosina, o que conseqüentemente leva ao encurtamento dos sarcômeros. A dimensão do sarcômero tem importância para o poder de contração, dependendo do rigor e do encurtamento da fibra muscular, para que seja possível o processo das contrações que irão promover movimentos segmentares (MACINTOSH, 2017; ASSIER, 2017). Com uma alta capacidade de remodelamento, o músculo estriado esquelético se altera devido às condições metabólicas e as necessidades funcionais do organismo. As respostas morfológicas do músculo se dão através de alterações patológicas, fisiológicas e aos estímulos do meio externo (QASAR et al., 2016).

A fáscia é o componente constituído de tecido conjuntivo responsável por circundar os músculos, e conta com a presença dos vasos sanguíneos e nervos que conectam todas as estruturas. Estas manifestam grande resistência e elasticidade, se adaptando acometimentos como patologias, sedentarismo e aderência (Sullivan; Silvey; Button; Behm et al., 2013). A fáscia é segmentada em superficial e profunda, envolvendo as

fibras (endomísio), fascículos (perimísio) e ventre muscular (epimísio), e são estruturas que conectam os músculos aos ossos do corpo, essenciais no processo de transmissão da força muscular, como demonstrado na figura 1 (SILVINI et al., 2017).

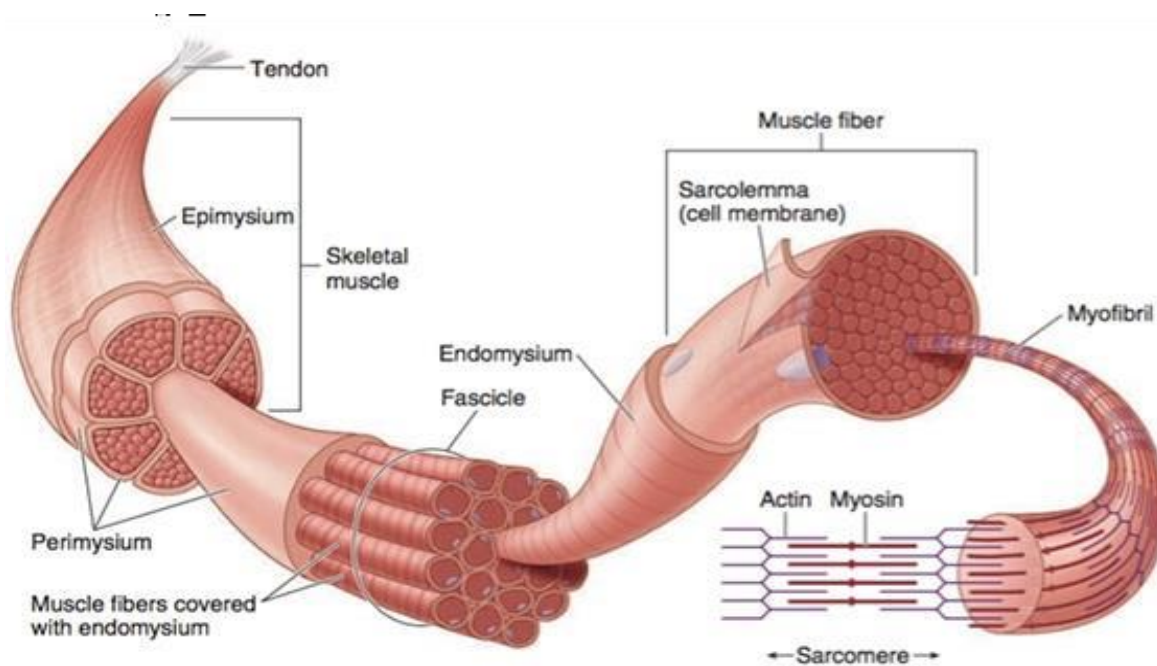


Figura 1. Representação ilustrativa da organização do músculo estriado esquelético e seus componentes (fonte: Moore; Agur; Dalley, 1995).

2.1.1 Quadríceps Femoral

O músculo quadríceps femoral é considerado o maior e um dos mais volumosos músculos do corpo, além de revestir a maior parte da extensão da face anterior e lateral do fêmur. Este músculo é constituído por quatro ventres: músculo reto femoral, músculo vasto lateral, músculo vasto intermédio e músculo vasto medial. Na literatura, o músculo quadríceps femoral é descrito como biarticular, pois realiza a movimentação de flexão do quadril e extensão do joelho, com função principal de absorver os impactos advindos do calcanhar. Ademais, esse músculo atua na sustentação do peso corporal, para realizar movimentos de levantamento e agachamento (SOBOTTA; PAULSEN; FRIEDRICH, 2019).

Os quatro ventres que compõem o quadríceps femoral têm suas inserções proximais em diferentes pontos. O reto femoral tem sua origem na espinha ilíaca anteroinferior e íleo superior ao acetábulo. O vasto lateral se origina a partir do trocanter

maior e lábio lateral da linha áspera do fêmur, já a inserção do vasto medial ocorre na linha intertrocantérica e lábio medial da linha áspera do fêmur. Por fim, a inserção do vasto intermédio, que ocorre nas faces anterior e lateral do corpo do fêmur. A inserção distal desses quatro músculos é um ponto em comum que é através do tendão patelar na tuberosidade da tíbia (MOORE; DALLEY; AGUR, 2019).

2.2 Junção Neuromuscular

A JNM é classificada como uma região altamente especializada que conecta o sistema nervoso periférico com as fibras musculares. A JNM apresenta componentes elementares tais como os terminais dos axônios motores, a placa motora das fibras musculares e a conexão entre as regiões: pré-sináptica (terminais dos axônios motores), pós-sináptica (placas motoras das fibras musculares) e CPS (DESCHENES et al., 2015)

Complementando a JNM está a fenda sináptica, espaço existente entre o terminal do axônio motor e o sarcolema da fibra muscular, no qual estão localizados os receptores de acetilcolina (AChR) inseridos na membrana pós-sináptica. O sarcolema pós-juncional confere o suporte metabólico e estrutural para a região em questão. Essa ligação e suas correspondentes estruturas tem a função de transdução do sinal elétrico para o químico, através da liberação de acetilcolina (ACh) e da recaptação desse neurotransmissor por receptores específicos, e consequentemente a geração de respostas de cunho mecânico, como as contrações musculares (KRAUSE NETO et al., 2015).

As placas terminais são individualmente innervadas por um único terminal do axônio motor e em maior número das fibras musculares. A ocorrência da transferência sináptica por uma unidade motora assegura que todas as células musculares innervadas pelo nervo motor respondam a um determinado potencial de ação a ser realizado. O papel substancial da JNM está totalmente relacionado com o cumprimento regular da função de sinalização intracelular que é responsável pelo comando do movimento e comportamento (DESCHENES et al., 2016).

O encargo principal do terminal do axônio motor é o de comunicação, onde ocorre uma manifestação do sistema nervoso periférico para a fibra muscular, por intermédio das sinapses, onde se origina a JNM e em conjunto com as CPS tem sua funcionalidade análoga à dos astrócitos, que estão estreitamente correlacionados com as sinapses (Chen et al., 2021).

As CPS têm a incumbência de manter o equilíbrio estrutural, eficiência sináptica, plasticidade e é de vital importância para padronização da produtividade da JNM, além de possuírem alto potencial para decodificação das transmissões sinápticas e interações dos fatores tróficos (PING-KO; ROBITAILLE, 2015; ALVAREZ SUAREZ et al., 2020).

Estruturas adjacentes como o nervo e a JNM podem ser intimamente afetadas por lesões musculares, a partir da retração do nervo e da perda de contato entre o terminal do axônio motor e a placa motora da fibra muscular. As CPS são ativadas logo no processo inicial da lesão, onde ocorrem alterações em sua morfologia e processos bioquímicos, através da ativação dos prolongamentos e extensões citoplasmáticas que interagem de forma positiva com o terminal axonal em processo regenerativo, guiando para o local original de inserção (CARRASCO et al., 2016). As CPS também realizam a produção de fatores tróficos que emitem sinais ativamente, influenciando o redirecionamento e a reinervação neuromuscular. A observação do receptor G de proteína acoplada GPR126 pelas CPS demonstra a melhora na capacidade de reinervação e acoplamento após a ocorrência de lesões na JNM (WALKER, 2022). Abaixo, figura 2, evidencia os componentes estruturais e celulares da junção neuromuscular.

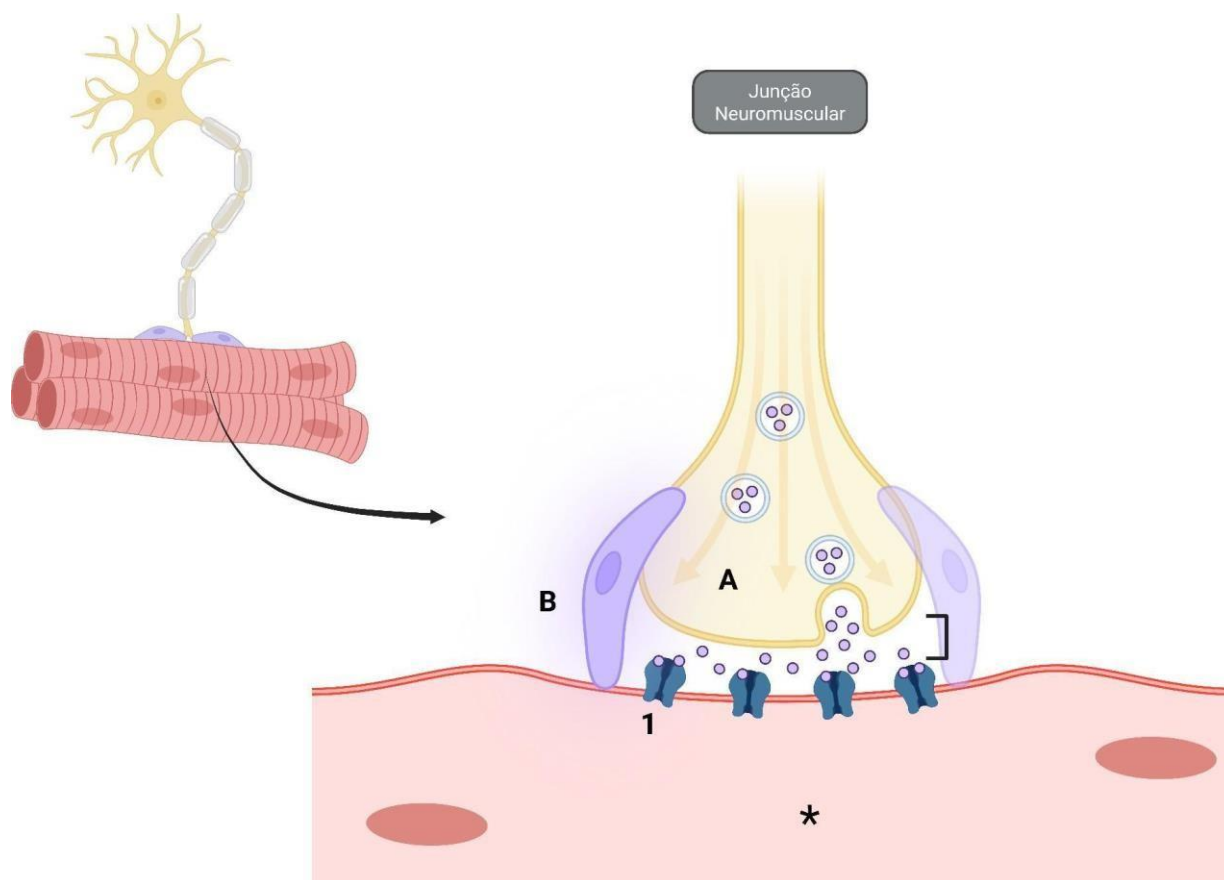


Figura 2. Fonte: Elaborado pelo autor. Junção neuromuscular, estrutura e componentes. **Legenda:** O terminal do axônio motor (A) se conecta com as fibras musculares (*) na placa motora, onde ocorre a transcrição dos impulsos nervosos, pela liberação das vesículas que contêm o neurotransmissor acetilcolina (círculos roxos), esses se locomovem através da fenda sináptica (I) e são captados pelos receptores de acetilcolina (1). As CPS (B) são responsáveis pela manutenção e funcionamento íntegro da JNM

2.3. Lesão Muscular e Contração Excêntrica

Para o processo de contração muscular é necessário a ocorrência do estímulo advindo do potencial de ação, onde conseqüentemente ocorre a liberação do neurotransmissor acetilcolina (Ach). Através das ligações destes neurotransmissores às Ach localizadas no sarcolema da fibra muscular, ocorre a despolarização celular, que por sua vez, libera moléculas de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático que dão início ao processo de contração do músculo (LI et al., 2018).

Diversos fatores contribuem para a ocorrência das lesões musculares, comprometendo não somente as células do tecido afetado como também as estruturas adjacentes, o que influencia a sua funcionalidade anatômica, e na perda total das funções, devido a extensão da lesão e de quais estruturas específicas foram

afetadas (BEHM et al., 2015).

As alterações que geram mau desempenho na função muscular são entendidas como lesões musculares, e podem ocorrer por alterações de fatores genéticos que levam a disfunções bioquímicas ou alteram a morfologia das células musculares e suas estruturas adjacentes. Exercícios físicos e fatores abióticos externos também têm a capacidade de gerar diferentes graus de lesão muscular. As classificações utilizadas para o estabelecimento do grau das lesões musculares levam em conta o nível do comprometimento que foi gerado nas fibras. Logo, estas são classificadas como: ruptura diminuta das fibras (lesão de grau 1); ocorrência de uma ruptura significativa das fibras musculares e presença de hemorragia (lesão de grau 2) e quando é observada a perda parcial ou total da função muscular essa lesão é classificada como sendo de grau 3 (FERNANDES et al., 2011).

O tipo mais comum de lesão muscular indireta é a que ocorre por contração excêntrica, durante a prática de exercícios físicos como caminhadas, corridas, musculação ou até mesmo durante a realização de atividades domésticas. Um efeito de força e distensão é exercido ao mesmo tempo, o que provoca um aumento na tensão das fibras musculares e com a intensidade exercida sobre elas gera-se a ocorrência do processo de lesão tecidual. O modelo de contração excêntrica vem sendo amplamente estudado como modelo experimental para lesões musculares (FU et al., 2019).

Após o acometimento das fibras musculares ocorre o desencadeamento do processo cicatricial através de uma cascata de recrutamento regenerativo, ocorrendo em três ciclos: ciclo inicial da lesão, seguida pela restauração do tecido e estruturas adjacentes e por fim o ciclo de reestruturação ou remodelamento do tecido muscular. Na ocorrência da lesão há a ruptura das fibras, vasos e necrose tecidual, com recrutamento celular para iniciar o ciclo de restauração tecidual. No ciclo da restauração, é observada a angiogênese e o recrutamento celular para que o tecido necrosado seja fagocitado e possa ser efetuada a regeneração tecidual e a formação de tecido cicatricial. Na última etapa observa-se a maturação das novas fibras em relação ao tecido cicatricial, obtendo a recuperação das funções padrões do tecido muscular (SOUZA, 2013)

3. OBJETIVO GERAL

Investigar as possíveis repercussões da lesão muscular induzida pelo protocolo de contração excêntrica nos elementos estruturais e celulares da JNM em ratos *Wistar* adultos.

3.1. Objetivos específicos

- Quantificar e descrever sobre a disposição dos núcleos celulares;
- Determinar a organização mionuclear;
- Descrever as adaptações das regiões pré (Basson) e pós sinápticas (α -bungarotoxina) da JNM;
- Realizar a mensuração da área, perímetro, dispersão e diâmetro máximo da região pré-sináptica da JNM;
- Realizar a mensuração da área, perímetro, dispersão e diâmetro máximo da região pós-sináptica da JNM;
- Quantificar os núcleos sinápticos contidos na JNM;
- Descrever as características morfológicas das CPS frente aos diferentes períodos de protocolos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos com 100 dias de idade distribuídos em 5 grupos (n=10):

- **Controle (C):** Os animais não foram submetidos ao protocolo experimental de contração excêntrica.
- **Pós - Lesão 0h (PL0h):** Os animais foram submetidos ao protocolo e as amostras coletadas 0h após a lesão.
- **Pós - Lesão 24h (PL24h):** Os animais submetidos ao protocolo e as amostras coletadas 24h após a lesão.
- **Pós - Lesão 4 dias (PL4d):** Os animais submetidos ao protocolo e as amostras coletadas 4 dias após a lesão.
- **Pós - Lesão 7 dias (PL7d):** Os animais submetidos ao protocolo e as amostras coletadas 7 dias após a lesão.

Os animais utilizados para o estudo foram criados e fornecidos pelo Biotério Central

da UNESP - Campus Botucatu-SP, divididos em um recinto especializado com 5 ratos em cada gaiola, e alocados no Biotério do Laboratório de Anatomia Humana/Morfologia e Atividade Física (LAMAF) – Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Rio Claro - SP. A temperatura do recinto dos animais foi controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), foto período claro/escuro e com ração e água sem restrições. Todos os procedimentos realizados no decorrer do estudo tiveram sua submissão prévia e foram posteriormente aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - (CEUA nº: 26/2023) do Instituto de Biociências da UNESP - Campus Rio Claro - SP e acompanhados pela Responsável Técnica médica veterinária Patrícia Gomes Wehmuth Cassab CRMV-SP 26257.

O uso de ratos machos na pesquisa científica se deu pela padronização dos resultados desejados, conforme seu estudo as pesquisas científicas excluíam a utilização de fêmeas para que as flutuações hormonais que ocorrem em seus ciclos estrais não alterasse os resultados durante o período de execução do protocolo experimental (Bailey, 2023).

4.2. Lesão Muscular (Contração Excêntrica)

Os grupos do protocolo experimental de contração excêntrica foram divididos por período de coleta e realizado 1 único protocolo de exercício que consistiu na execução de 18 sessões de 5 minutos de corrida em esteira ergométrica com velocidade programada de 16 metros por minuto e inclinação negativa de 16° (*downhill*), com intervalos de descanso de 2 minutos entre as sessões, totalizando 2 horas e 6 minutos de protocolo (KANAZAWA et al., 2021).

Os animais foram submetidos ao protocolo, e permaneceram em período de recuperação (de acordo com as datas de coleta pós protocolo) em ambiente controlado com condições idênticas às do grupo C, com livre acesso à água e alimento. Os períodos das coletas dos materiais biológicos foram após a realização do protocolo experimental de lesão induzida por contração excêntrica: 0 horas, 24 horas, 4 dias e 7 dias. Os tempos de coleta foram determinados de acordo com descrições da literatura para análise de alterações e a resposta celular que pode ser gerada durante o período de lesão aguda (ARMSTRONG, 1983).

O protocolo experimental escolhido afeta de forma direta os músculos antigravitacionais que são os responsáveis por suportar a gravidade e o peso corporal durante a manutenção postural, o músculo quadríceps participa ativamente dessa função. De acordo com Congcong Fu et al. (2019) esse grupamento muscular realiza contração excêntrica devido a inclinação negativa (*downhill*) combinada com a velocidade aplicada ao protocolo para desacelerar a massa corporal do animal e para que a corrida se equipare com a velocidade da esteira. O esquema abaixo retrata a divisão dos grupos experimentais e a realização do protocolo em esteira com inclinação negativa (*downhill*).

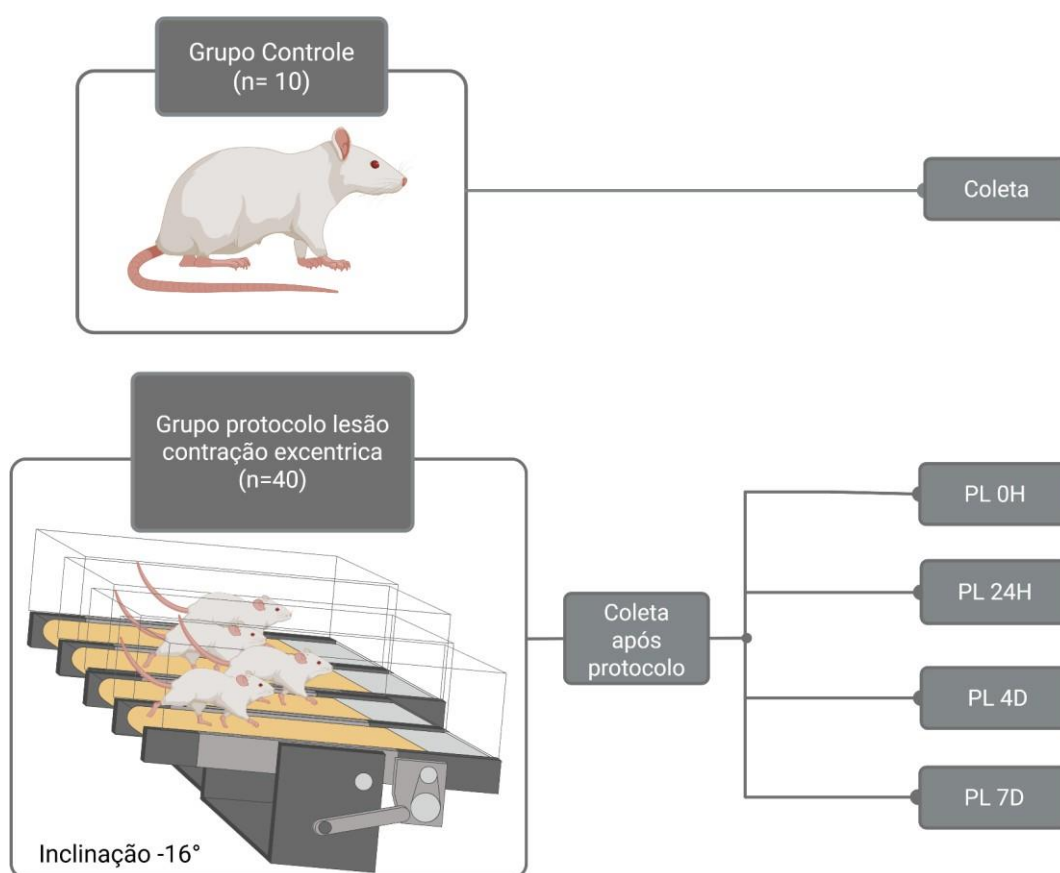


Figura 3. Fonte: Elaborado pelo autor. Delineamento e organização dos grupos para realização do protocolo de exercício - contração excêntrica. Legenda elaborada pelo autor: Organização dos grupos experimentais e períodos de coleta do Grupo Controle e Grupos Lesão (PL0H, PL24H, PL4D e PL7D após o protocolo de contração excêntrica).

4.3. Massa corporal e muscular

A massa corporal dos animais foi quantificada através da balança digital (TOMATE™ 440), em 2 diferentes períodos com a primeira pesagem ocorrendo antes da realização do protocolo e a segunda pesagem no momento da coleta após o protocolo. Os dados obtidos foram inseridos e analisados pelo software Graphpad Prism 9.0.0™, com teste ANOVA one – way. Os músculos dissecados durante o protocolo de coleta foram pesados com ajuda de uma balança semi-analitica de precisão (Marte AD330®), os pesos foram devidamente anotados e os dados obtidos introduzidos software Graphpad Prism 9.0.0™ (com os dados computados) a razão foi obtida e analisada.

4.4. Processamento das amostras

Os animais foram submetidos ao protocolo de eutanasia por meio da administração de uma overdose de anestésico calculado individualmente para cada animal com Ketamina (300 mg/Kg) associada à Xilazina (30 mg/Kg) via intraperitoneal para a dissecação do músculo quadríceps femoral direito. As amostras do músculo foram revestidas por uma camada de talco neutro (Tragacanth®, SIGMA) para prevenção de artefatos de congelamento, alocadas em criomoldes, estabilizadas com uso de cola biológica (O.C.T. Compound, Tissue Plus®, Fisher HealthCare) e embebidas em nitrogênio líquido (-196°C) para fixação e posteriormente armazenadas no biofreezer à -80°C, para o subsequente processamento das técnicas de Microscopia de Luz e Imunofluorescência.

4.5. Microscopia de Luz

Para observação dos cortes histológicos por microscopia de luz, as amostras do músculo quadríceps foram seccionadas longitudinalmente (10 µm - Criostato HM 505 E, MICROM®) para posterior análise. As amostras histológicas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para observação dos componentes celulares (BHUTDA et al., 2017). As imagens foram analisadas através do Microscópio de Luz Leica DM500™ no laboratório de morfologia e atividade física (LAMAF), subsequentemente foram obtidas 10 imagens (objetiva de 10x) para cada animal por técnica realizada (HE) e assim foi estabelecido um total de 50 imagens por grupo totalizando 250 imagens.

Por intermédio das micrografias de luz, a análise da Dimensão Fractal (DF) dos núcleos

foi realizada com a assistência do software ImageJ®. A Dimensão Fractal é uma fórmula matemática comum em estudos histológicos, que determina a complexidade da estrutura de figuras geométricas irregulares através da similaridade (GARCIA et al., 2018; KARPERIEN et al., 2008).

Esse método é realizado por meio da binarização da imagem, sendo que toda a região corada nas colorações de HE são assinalados nas imagens, e através da linha de regressão estabelecida a partir do número e do tamanho de quadrados contabilizados para cobrir a imagem (CURY et al., 2018; GARCIA et al., 2018).

4.6. Imunofluorescência - Junção Neuromuscular

No processamento inicial da técnica de imunofluorescência, as amostras do músculo quadríceps (n=5) foram seccionadas longitudinalmente (20 µm - Criostato HM 505 E, MICROM® - Laboratório de Morfologia e Atividade Física - LAMAF - UNESP Rio Claro/SP) e posicionadas em lâmina histológicas silanizadas. Posteriormente houve a delimitação das amostras utilizando caneta hidrofóbica para que não ocorra o desperdício das soluções. Foram realizadas 2 lavagens das amostras em solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 5 minutos, em seguida foi aplicada a solução de 0,1% de Triton X-100 diluído em PBS (10 min). Em sequência foi aplicada a solução de bloqueio composta por 1% de albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS (20 min) e por mais 20 minutos adicionou-se a solução de bloqueio secundária composta por 5% de soro normal de cabra (NGS) diluída em PBS e aplicação das soluções contendo os anticorpos primários. As imagens foram obtidas através do Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro - SP, Brasil. Foram registradas 15 imagens de cada animal (5 animais por grupo em 5 grupos) para cada região (4 regiões: pré e pós-sináptica, núcleos gerais e células perissinápticas de Schwann) específica imunomarcada, com total de 1875 imagens para técnica de imunofluorescência.

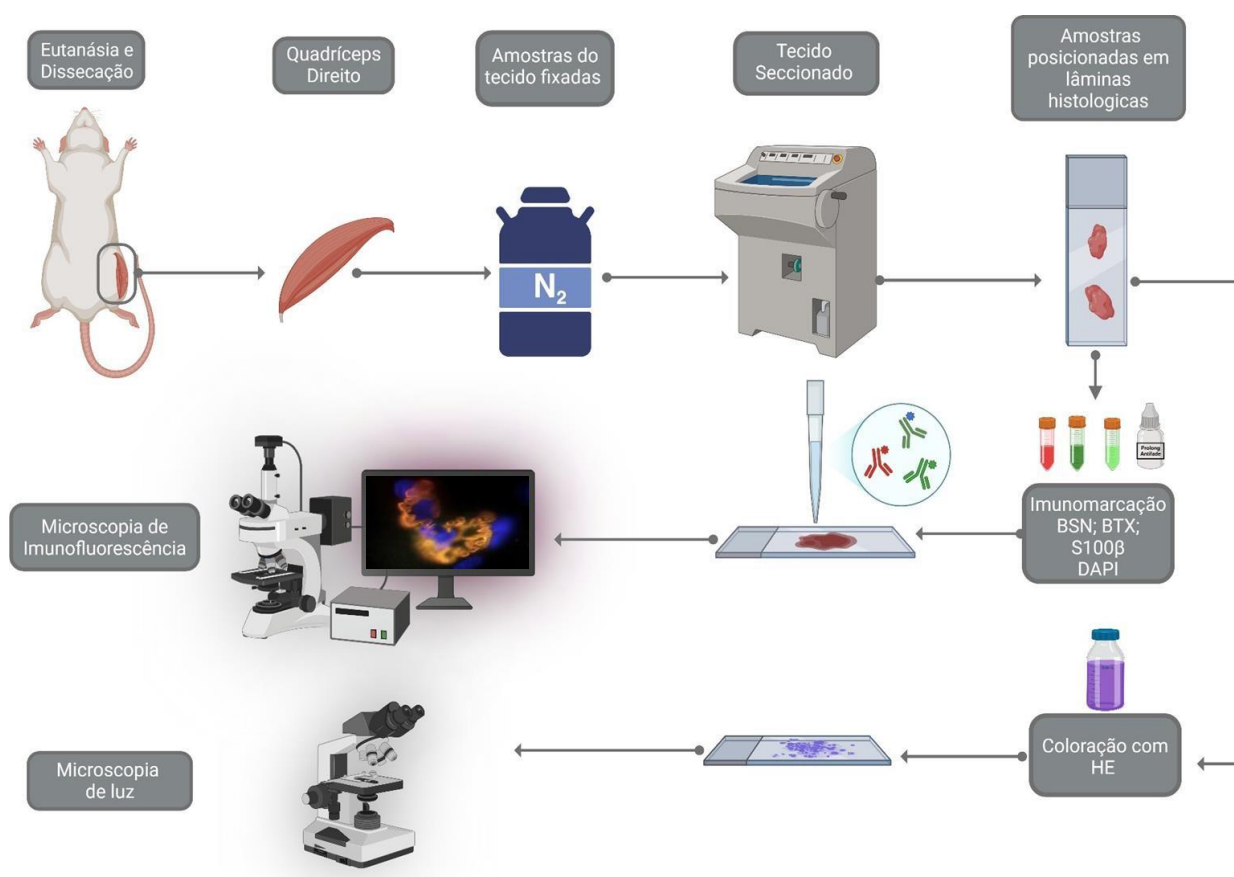


Figura 4. Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Processamento das amostras passo a passo a partir da eutanásia do animal e dissecação do músculo até a análise por microscopia de luz e de imunofluorescência.

4.7. Células Perissinápticas de Schwann

Para a imunodeteção das CPS, as lâminas foram incubadas overnight durante 16 horas em solução contendo anticorpo primário anti-S100 β (1:300) diluído em PBS + BSA 1%. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 2x com PBS por 5 minutos cada lavagem, e imunomarcadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:1000 (anti-mouse) por 1 hora, montadas com Prolong® Antifade com DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR), e armazenadas a -20°C. As imagens foram obtidas através do Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro - SP, Brasil. As CPS identificadas positivamente foram contadas e incluídas nas análises de acordo com sua localização no elo citoplasmático da JNM (JONES et al., 2016; MINTY et al., 2020; ALHINDI et al., 2021).

4.8. Região Pré-sináptica

Na imunodeteção da região pré sináptica, as lâminas foram incubadas *overnight* por 16 horas com solução composta por anticorpo primário anti-bassoon (1:500) diluído em PBS + BSA 1%, após esse procedimento as amostras foram lavadas 2x com PBS por 5 minutos cada rodada de lavagem, em sequência foi aplicado o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:1000 (anti-rabbit) durante 1 hora e finalizando a montagem das lâminas com Prolong® Antifade (Molecular Probes, Eugene, OR) e armazenadas em freezer a -20°C. As imagens foram obtidas com a ajuda de um Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro, SP, Brasil (KRAUSE NETO et al., 2017; ROCHA et al., 2020a).

As análises das variáveis de JNMs referentes a região pré-sinápticas são: perímetro total, perímetro corado, área total, área corada e diâmetro (área corada / área total x 100).

4.9 Região pós-sináptica

Após o processamento inicial, as amostras foram lavadas com a solução tampão PBS e incubadas *overnight* em solução contendo os anticorpos primários α -bungarotoxina conjugada com rodamina (BTX; Molecular Probes®, Eugene, OR, EUA).

Posteriormente, as lâminas foram lavadas 2x com PBS por 5 minutos e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 1:1000 (anti-mouse) logo após foram montadas com Prolong® (Molecular Probes, Eugene, OR), e armazenadas em -20°C. As imagens foram obtidas através da Microscopia de imunofluorescência.

As análises das variáveis de JNMs referentes a região pós sinápticas são: perímetro total, perímetro corado, área total, área corada, dispersão e diâmetro (área corada / área total x 100). As mensurações foram feitas através do software ImageJ® (ROCHA et al., 2021) e as variáveis estatísticas foram rodadas pelo software Graphpad Prism™ 8.4.3 utilizando o teste ANOVA One-Way.

Tabela 1. Anticorpos e especificações para realização da técnica de imunofluorescência.

Anticorpo Primário	Código	Diluição	Anticorpo Secundário	Código secundário	Diluição	Montagem
Anti-S100 β (Mouse)	MA5-12969/ Santa Cruz	1:300	Alexa Fluor 488 (Anti-mouse)	A-11001/ Invitrogen	1:1000	Prolong Antifade DAPI
Anti-BSN (Rabbit)	SAB5200101/ Sigma-aldrich	1:500	Alexa Fluor 488 (Anti-rabbit)	A-11008/ Invitrogen	1:1000	Prolong Antifade
α -Bungarotoxin- tetramethylrhoda mine (Bungarus multicinctus venom)	T0195/ Sigma-aldrich	1:600	-	-	1:1000	Prolong Antifade

5. Resultados

5.1. Massa corporal

Com a obtenção dos valores de massa corporal dos animais foi possível revelar que não houve alteração significativa ($p < 0.05$) antes e depois do protocolo de contração excêntrica realizado. A massa corporal do Grupo C em comparação com PL0H apresentou uma redução de 1,21%, entre o Grupo C e PL24H apresentou um aumento de 4,48%. entre o Grupo C e PL4D, por sua vez, apresentou uma redução de 3,75%, enquanto Grupo C e PL7D houve um aumento de 2,11% (Figura 5A).

5.2 Massa muscular

Ao analisar os valores da massa muscular constatou-se que não ocorreram alterações com significância ($p < 0.05$) entre os grupos. A massa muscular do Grupo C correlacionada com o Grupo PL0H apresentou uma redução de 10,96%, na comparação entre o Grupo C e PL24 a redução foi de 0,38%, em relação ao Grupo C e PL4D houve uma diminuição de 1,69%, enquanto entre o Grupo C e PL7D houve um aumento de 0,12%, (Figura 5B).

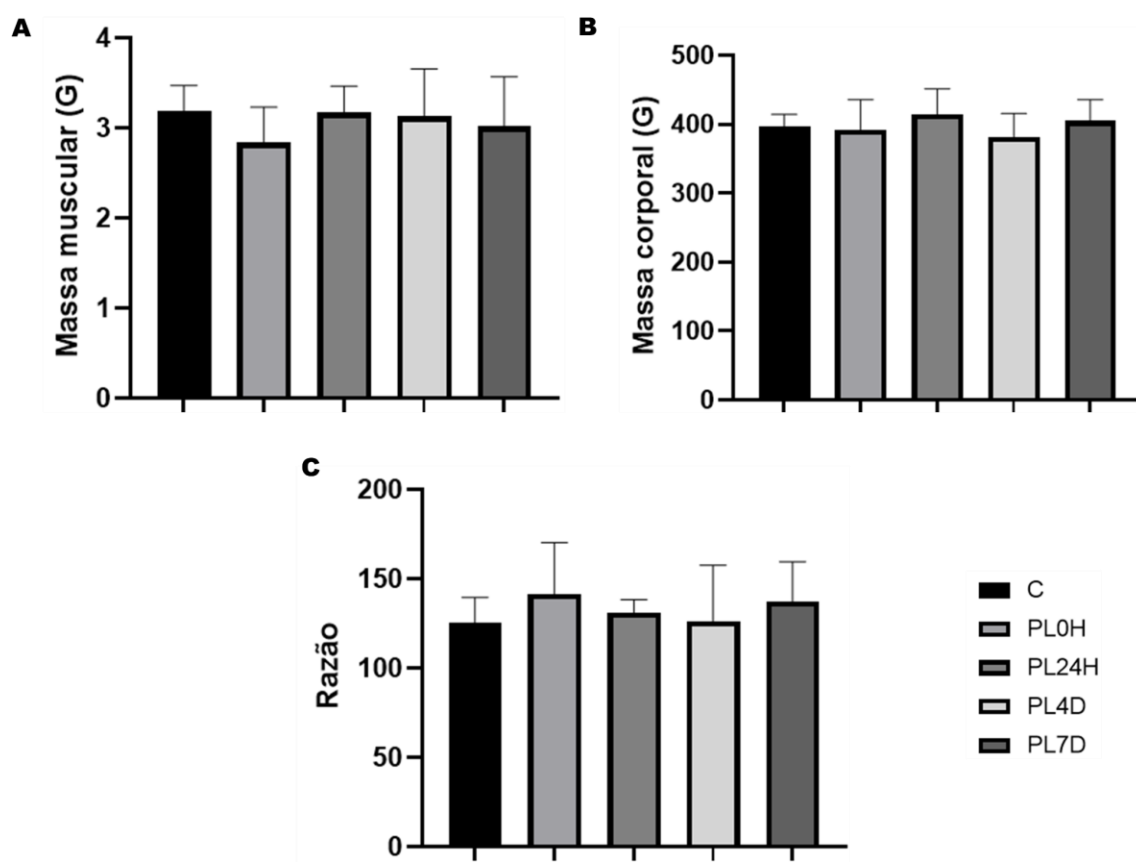


Figura 5. Médias e desvio-padrões, razão / (A) massa muscular (músculo quadríceps femoral), (B) massa corporal e (C) razão entre massa corporal e massa muscular. Legenda: Os dados estatísticos de todos os grupos experimentais (C, PL0H, PL24H, PL4D, PL7D) foram tratados a partir do teste ANOVA one – way com nível de significância de $p < 0.05$.

5.3 Microscopia de Luz

5.3.1 Núcleos Celulares - Hematoxilina e Eosina

No Grupo C as fibras musculares apresentaram um padrão morfológico organizadas paralelamente e separadas pelo tecido conjuntivo intersticial onde foi possível observar a organização nuclear periférica adjacente às fibras musculares (Figura 6).

No grupo PL0h foi possível identificar o encurtamento da distância das fibras musculares no corte transversal, assim como a distinção nos formatos das fibras musculares que por mais que se apresentem em unidades hexagonais, demonstram distintas extensões em uma mesma área, além disso foi possível evidenciar o aumento

nuclear na região periférica das fibras musculares, principalmente nas fibras de menor área ocupada

O Grupo PL24H apresentou um padrão hexagonal das fibras musculares, com conformação equivalente, sem alteração notável em relação a áreas das fibras e distribuição nuclear periférica. Além disso, foi observado que o arranjo dos núcleos é semelhante à distribuição do Grupo C, e em comparação com o Grupo PL0H, a distribuição nuclear é reduzida.

No Grupo PL4D apresentaram fibras musculares de formatos assimétricos, com encurtamento na distância das fibras no corte transversal e visível aumento e propagação dos núcleos na periferia das fibras com semelhança ao observado em PL0H.

O Grupo PL7D, por sua vez, apresentou conformação e organização padrão das fibras musculares paralelas, divididas pelo tecido conjuntivo intersticial com distribuição e composição nuclear periférica compatível com as observadas no Grupo C, sem alterações evidentes na morfologia e na área das fibras musculares.

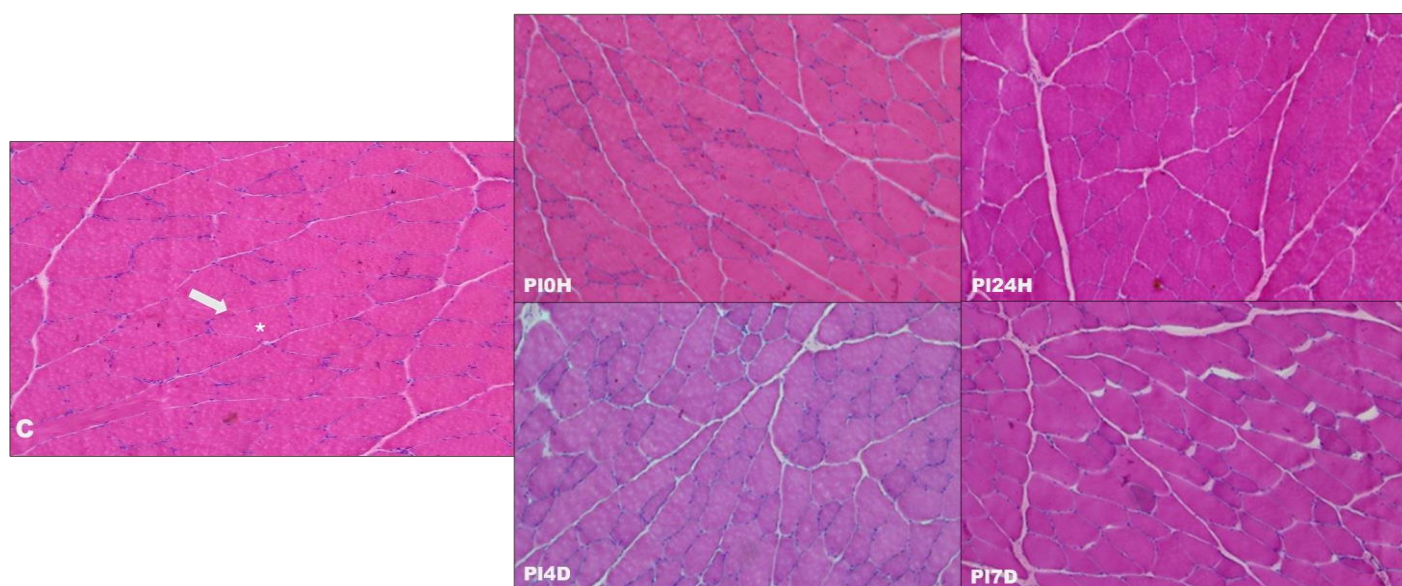


Figura 6. Imagens de microscopia de luz, coradas por Hematoxilina e Eosina. Legenda: Microscopia de luz com coloração de Hematoxilina e Eosina onde evidenciamos as fibras musculares (estrela) e seus núcleos (indicado pela seta) localizados na periferia das fibras. Grupos experimentais: C, PI0H, PI24H, PI4D e PI7D. Ampliação 10x.

Os dados da dimensão fractal, densidade nuclear e área relativa foram mensurados e foi possível analisar a organização nuclear dos diferentes grupos experimentais durante os períodos estipulados para cada grupo (Figura 7).

As análises dos dados da dimensão fractal demonstraram que as médias percentuais do grupo PI0H foram 3% menores quando comparadas ao grupo C, já o grupo PI24H apresentou redução de 8,2% ($p < 0.0001$). As médias percentuais dos grupos PI4D e PI7D quando comparadas ao grupo C apresentaram redução de 10,6% e 11,1% ($p < 0.0001$) respectivamente. Os dados obtidos no grupo PI0H quando comparados aos do grupo PI24H apresentou redução de 5,4% ($p < 0.001$), enquanto que na comparação entre o grupo PI0H e os grupos PI4D e PI7D observamos redução significativa de 7,9% e 8,4% ($p < 0.0001$) respectivamente. As análises comparativas entre os grupos PI24H, PI4D e PI7D não apresentaram alterações significativas, ao revelarem reduções de 2,6% e 3,1% respectivamente.

Os dados comparativos do grupo PI4D e PI7D também não demonstraram alterações significativas, com redução de 0,5% (Figura 7A).

As análises estatísticas da densidade nuclear demonstraram que as médias percentuais

do grupo PI0H foram 9,9% maiores quando comparadas ao grupo C, enquanto que no grupo PI24H apresentou aumento de 6,3%. As médias percentuais dos grupos PI4D e PI7D quando comparadas ao grupo C apresentaram redução de 4,2% e 4,1% respectivamente. Os dados obtidos no grupo PI0H quando comparados aos do grupo PI24H apresentaram redução de 3,3%, já na comparação entre o grupo PI0H e os grupos PI4D e PI7D observamos redução significativa de 12,9% e 12,8% ($p<0.05$ e $p<0.05$), respectivamente. As análises comparativas entre os grupos PI24H, PI4D e PI7D não apresentaram alterações significativas, ao revelarem reduções de 9,9% e 9,8%, respectivamente.

Os dados comparativos do grupo PI4D e PI7D também não demonstraram alterações significativas, apenas um ligeiro aumento de 0,1% (Figura 7B).

Os dados obtidos sobre a área nuclear relativa demonstraram médias percentuais do grupo C, de 9,8% maiores que no grupo PI0H, já quando comparada com o grupo PI24H o grupo C apresentou aumento de 6,2%. As médias percentuais obtidas com os grupos PI4D e PI7D comparadas ao grupo C apresentaram reduções de 3,6% e 3,5%, respectivamente.

A análise comparativa entre o grupo PI0H e o grupo PI24H apresentou redução de 3,2%, já em relação aos grupos PI4D e PI7D houve redução significativa de 12,2% e 12,1% ($p<0.05$ e $p<0.05$), respectivamente. Os dados obtidos através da comparação do grupo PI24H, PI4D e PI7D não apresentaram alterações significativas, apenas redução de 9,2% e 9,1% respectivamente.

Em relação ao grupo PI4D e PI7D obtivemos um ligeiro aumento de 0,09% (Figura 7C).

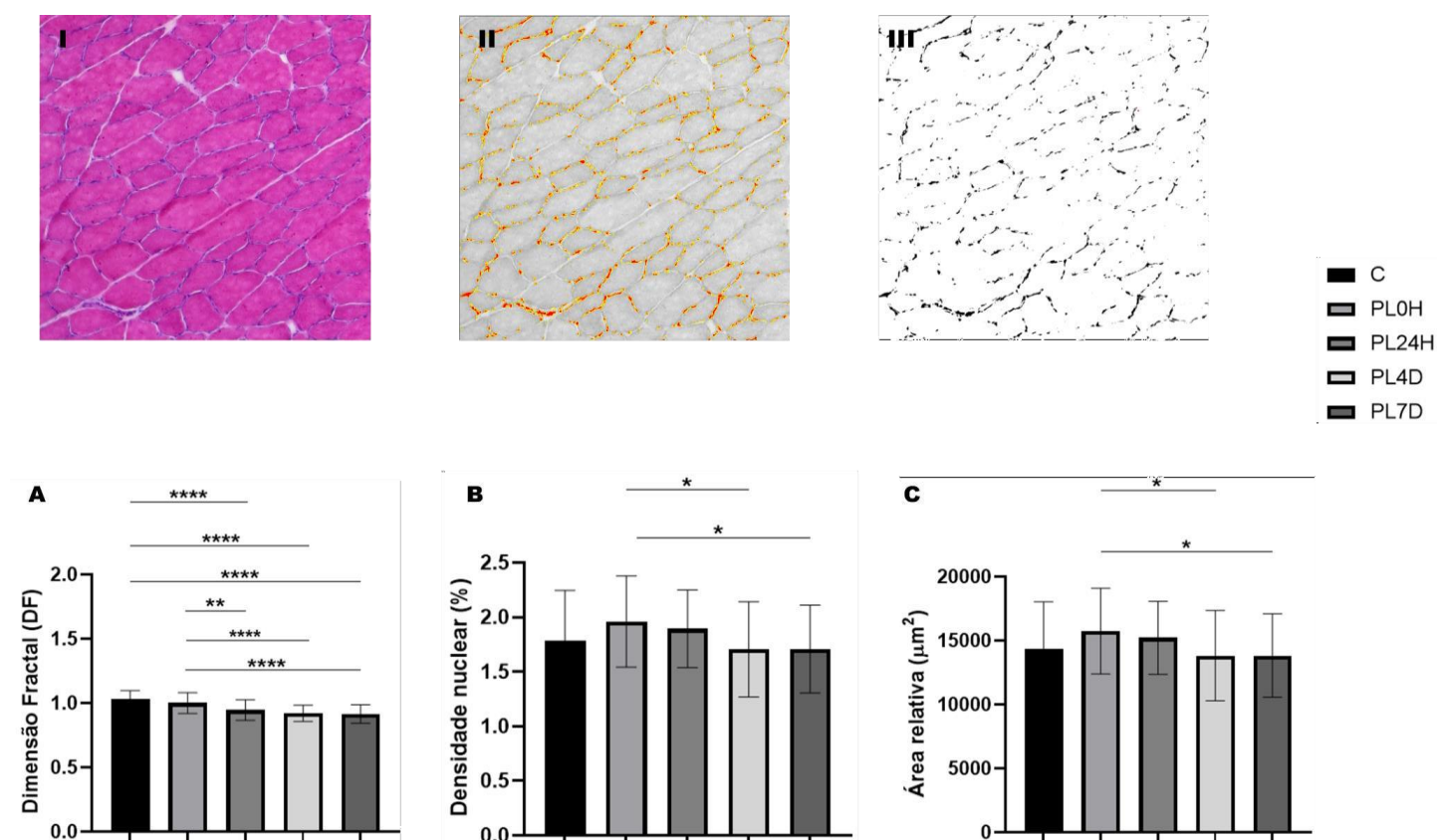


Figura 7. Dados de área e dimensão fractal das imagens de (I) Hematoxilina Eosina (HE) para estabelecer a seleção binária dos núcleos (II e III) dos grupos C, PL0H, PL24H, PL4D e PL7D. Médias e desvios padrões da (A) dimensão fractal, (B) densidade nuclear (%) e (C) área relativa (μm²) dos núcleos de todos os grupos experimentais. Dados estatísticos obtidos por meio da análise ANOVA one-way com nível de significância de $p < 0.05$.

5.4 Imunofluorescência

5.4.1. Região pré-sináptica (Bassoon)

A membrana pré-sináptica identificada com a imunomarcção (Bassoon) revelou no grupo C conformação padrão, com áreas coradas bem ativas, com boa delimitação (Figura 8).

No grupo PL0H evidenciamos uma ligeira redução da área imunomarcada com alguns pontos de menor atividade proteica do que observado no grupo controle (Figura 8).

No grupo PL24H os resultados obtidos revelaram leve aumento de área com uma aparente aumento de atividade na área de membrana pré-sináptica (Figura 8).

No grupo PL4D foi possível evidenciar uma conformação mais próxima à do grupo

controle com uma aparente atividade proteica delimitada pela imunomarcacão (Figura 8).

O grupo PL7D apresentou uma conformação mais semelhante com a do grupo controle, com delimitação evidentes de área e atividade proteica indicando um possível retorno à normalidade após o processo induzido pela lesão (Figura 8).

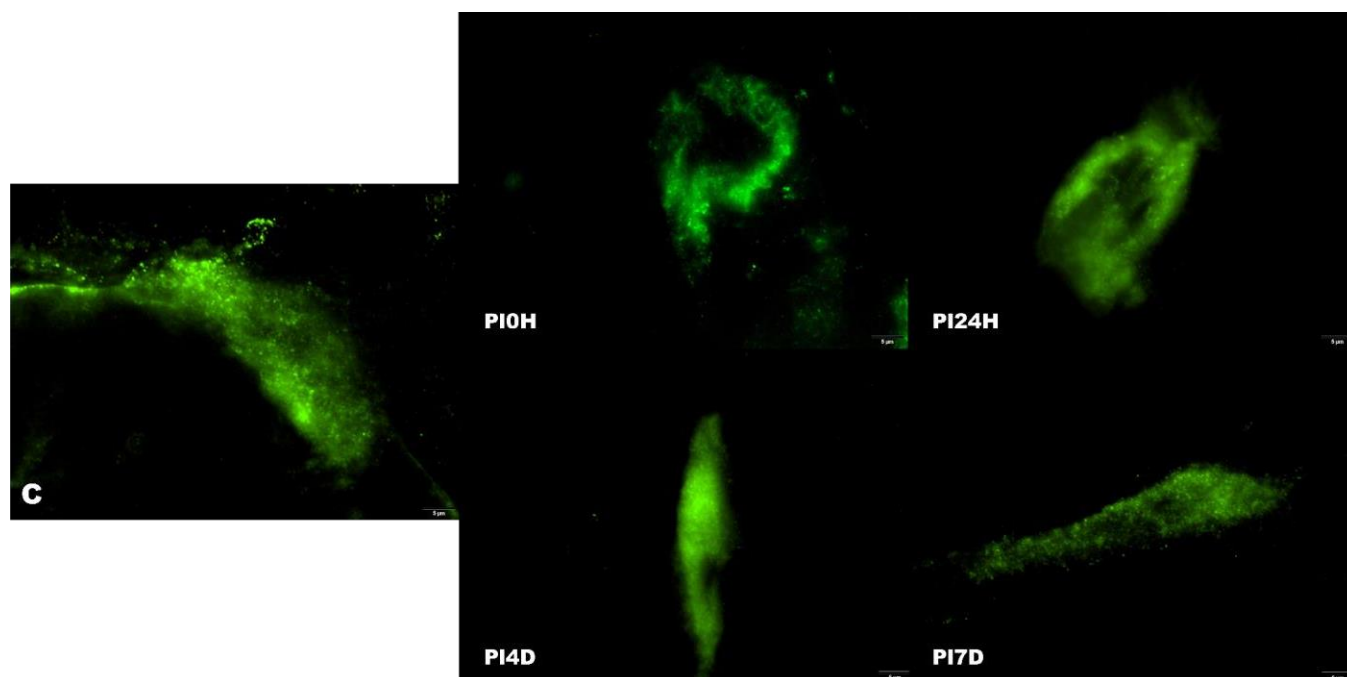


Figura 8. Imunofluorescência da região pré-sináptica marcada com anti-BSN. Legenda: Imagens obtidas através da microscopia de imunofluorescência da região pré-sináptica marcada com o anticorpo anti-Bassoon dos grupos experimentais: C, PI0H, PI24H, PI4D e PI7D. Barras 5 µm.

5.4.2. MORFOMETRIA – RECEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS (BASSOON)

A imunomarcação com Basson foi de suma importância para identificação da região pré-sináptica do músculo quadríceps e possibilitou a mensuração das adaptações desta região em todos os grupos experimentais (Figura 9).

A área corada demarcada pela região pré-sináptica foi mensurada os dados comparativos obtidos entre o grupo C e PI0H apresentou redução de 7,8%, já quando comparado com o grupo PI24H demonstrou aumento de 31,4% ($p < 0.01$), em relação a comparação com os grupos PI4D e PI7D não obtivemos dados com alterações significativas apenas redução de 3,3% e aumento de 0,6% respectivamente.

As análises comparativas entre o grupo PI0H e PI24H demonstraram alteração significativa com aumento de 42,6% ($p < 0.0001$), já na comparação com os grupos PI4D e PI7D não foram obtidas alterações significativas, apenas aumentos de 4,8% e 9,2%, respectivamente.

Os dados obtidos com o grupo PI24H quando comparados com os dos grupos PI4D e PI7D mostraram uma redução significativa de 26,5% e 23,4% ($p < 0.001$ e $p < 0.01$) respectivamente.

A comparação entre os grupos PI4D e PI7D não demonstrou alteração significativa com um leve aumento de 4,1% (Figura 9A).

A mensuração da área total da região pré-sináptica foi analisada e os dados obtidos em relação ao grupo C e PI0H mostraram uma redução de 7,9%, já comparado ao grupo PI24H foi observado um aumento significativo de 34,9% ($p < 0.001$), os dados do grupo C comparados com os dos grupos PI4D e PI7D não apresentaram alteração significativa apenas aumento de 3% e redução de 1,7%, respectivamente.

Os dados obtidos com a comparação entre o grupo PI0H e PI24H demonstraram um aumento significativo de 46,6% ($p < 0.0001$), em relação ao grupo PI0H e os grupos PI4D e PI7D houve um aumento de 5,3% e 10,4% sem significância estatística.

As alterações observadas na comparação do grupo PI24H, PI4D e PI7D foram significativas com redução de 28,1% e 24,6% ($p < 0.0001$ e $p < 0,001$), respectivamente.

A comparação realizada entre os grupos PI4D e PI7D não demonstrou nenhuma alteração com significância apenas um ligeiro aumento de 4,9% (Figura 9B).

A dispersão foi mensurada e os dados obtidos demonstraram que em relação ao grupo C o grupo PI0H demonstrou um aumento sem significância de 0,1%, já o grupo PI24H

demonstrou significativa redução de 2,1% ($p < 0.0001$) e os grupos PI4D e PI7D não demonstraram nenhuma alteração significativa apenas redução de 0,1% e 0,8% respectivamente foram observadas.

Em relação ao grupo PL0H e PI24H observamos alteração significativa com uma redução de 2,3% ($p < 0.0001$), já com os grupos PI4D e PI7D não observamos nenhuma alteração apenas redução de 0,2% e 0,9% respectivamente.

As médias percentuais obtidas na comparação entre o grupo PI24H e os grupos PI4D e PI7D apresentaram alterações significativas com aumento de 2,1% e 1,4% ($p < 0.0001$ e $p < 0.01$) respectivamente.

A análise comparativa entre o grupo PI4D e PI7D não apresentou alteração com significância demonstrando uma redução de 0,7% (Figura 9C).

A mensuração do perímetro corado foi realizada e os dados obtidos com as análises comparativas demonstraram que entre o grupo C e o PI0H houve um aumento significativo de 64,1% ($p < 0.0001$), já com o grupo PI24H ocorreu aumento de 27,8% e dos grupos PI4D e PI7D não foi obtida alteração significativa apenas um aumento de 30,3% e 13,7%.

Em relação ao grupo PI0H e PI24H observamos uma redução significativa de 22,1% ($p < 0.05$), já a comparação com o grupo PI4D não gerou alteração significativa, apenas redução de 20,6% porém com o grupo PI7D houve significância com redução de 30,6% ($p < 0.001$).

Na comparação entre o grupo PI24H e os grupos PI4D e PI7D não obtivemos alterações significativas com aumento de 1,9% e redução de 10,9% respectivamente.

Os dados obtidos da comparação entre o grupo PI4D e PI7D não mostraram nenhuma alteração significativa, apenas redução de 12,6% (Figura 9D).

O perímetro total foi mensurado e os dados em comparação entre o grupo C e o PI0H mostrou alteração significativa com aumento de 74,7% ($p < 0.0001$), já em relação ao grupo PI24H observamos redução de 2,1% e com o grupo PI4D observamos aumento de 5,5% ($p < 0.01$) e do grupo PI7D foi possível observar redução sem significância de 11,9%.

A comparação em relação ao grupo PI0H e PI24H apresentou redução significativa de 22% ($p < 0.05$), já com o grupo PI4D observamos redução de 15,7% e no grupo PI7D houve redução com significância de 29,7% ($p < 0.01$).

As análises comparativas entre o grupo PI24H e os grupos PI4D e PI7D não mostraram alterações significativas, apenas aumento de 8% e redução de 9,8% respectivamente.

Os dados comparativos em relação ao grupo PI4D e PI7D não mostraram alterações

com significância apenas redução de 16,6% (Figura 9E).

O diâmetro da região pré-sináptica também foi mensurado e os dados comparativos obtidos mostraram que não ocorreram alterações significativas entre o grupo C e o PI0H e sim uma redução de 7,9%, já em relação ao grupo PI24H houve um ligeiro aumento de 2,9% e com os grupos PI4D e PI7D não mostraram alterações significativas apenas uma redução de 5,5% e 9,4%, respectivamente.

Os dados observados na comparação entre o grupo PI0H e PI24H não revelaram alterações com significância, com aumento de 11,8% e com os grupos PI4D e PI7D também não foram observadas alterações significativas com aumento de 2,5% e redução de 1,6% respectivamente.

O grupo PI24H e os grupos PI4D e PI7D não apresentaram alterações significativas, ocorrendo redução de 8,3% e 12% respectivamente.

Os dados obtidos na comparação entre o grupo PI4D e PI7D mostraram uma redução de 4% (Figura 9F).

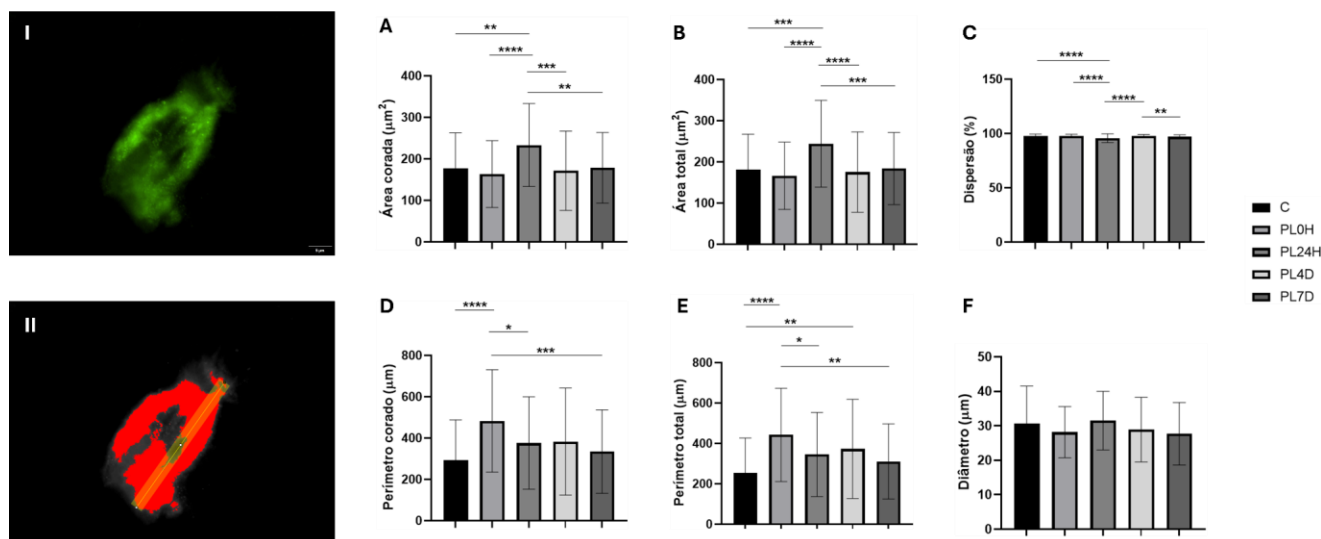


Figura 9. Descrição morfoquantitativa da região pré-sináptica da junção neuromuscular, por meio da imunomarcação com anti-Basson. Legenda: Dados estatísticos obtidos pelo autor, grupos experimentais: C, PI0H, PI24H, PI4D e PI7D. Para as mensurações da região pré-sináptica foi utilizado o software ImageJ®, para isso uma imagem foi selecionada por vez de cada grupo experimental, no exemplo temos duas imagens (barras 5 µm) do grupo PL24H (I) antes do processamento e a imagem (II) com os processos para mensuração da área corada (A), área total (B), dispersão (C), perímetro corado (D), perímetro total (E) e diâmetro (F) com valor de significância $p < 0.05$.

5.4.3 Região pós-sináptica (α -bungarotoxina)

Os receptores de acetilcolina da região pós-sináptica observados no grupo C apresentam uma conformação morfológica com área definida pela imunomarcação sem

alterações (Figura 10).

No grupo PL0H a região pós-sináptica acompanha o ligeiro aumento na área ativa que foi observada na região pré-sináptica em comparação ao grupo controle, com mudança na conformação morfológica da estrutura (Figura 10).

No grupo PL24H também foi possível evidenciar o aumento na área de atividade da região pós-sináptica (Figura 10).

O grupo PL4D observamos a redução parcial da área ativa da região pós-sináptica acompanhando a redução da área observada na região pré-sináptica não indicando um retorno do padrão observado no grupo C (Figura 10).

O grupo PL7D apresentou uma conformação mais aparentada a do grupo controle com boa delimitação de área e atividade proteica porém ainda não alcançando a um retorno à normalidade após o processo induzido pela lesão (Figura 10).

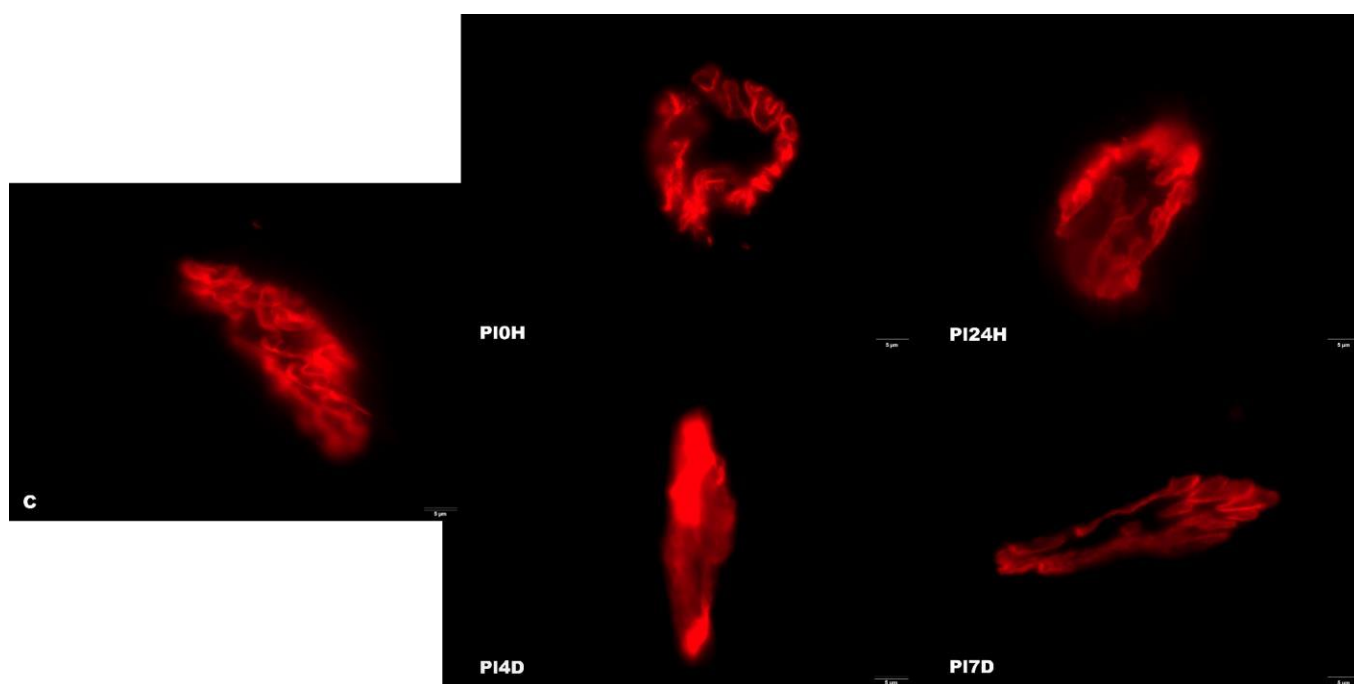


Figura 10. Imunofluorescência da região pós-sináptica marcada com anti- α -bungarotoxina. Legenda: Imagens obtidas através da microscopia de imunofluorescência da região pós-sináptica marcada com o anticorpo anti- α -bungarotoxina dos grupos experimentais: C, PI0H, PI24H, PI4D e PI7D. Barras 5 μ m.

5.4.4. MORFOMETRIA – RECEPTORES PÓS-SINÁPTICOS (AChR)

A imunomarcção com α -bungarotoxina foi de suma importância para identificação da região pós-sináptica do músculo quadríceps e possibilitou a mensuração das adaptações desta região em todos os grupos experimentais (Figura 11).

A área corada demarcada na região pós-sináptica foi mensurada. Os dados da área corada demonstraram que as médias percentuais do grupo C foram 9% maiores que do grupo PI0H, já em relação ao grupo PI24H observamos aumento de 15,4% sem significância e com os grupos PI4D e PI7D também não observamos alterações significativas com redução de 6,5% e 11,2% respectivamente.

Os dados comparativos entre o grupo PI0H e PI24H não mostraram alteração significativa com aumento de 5,8% e entre os grupos PI4D e PI7D também não houve alteração de significância com redução de 14,3% e 18,6%, respectivamente.

A comparação entre o grupo PI24H e os grupos PI4D e PI7D mostraram alterações significativas com redução de 19% e 23,1% ($p<0.05$ e $p<0.01$), respectivamente.

O grupo PI4D quando comparado ao PI7D não mostrou alteração significativa com redução de 5% (Figura 11A).

A área total mensurada demonstrou que as médias percentuais do grupo C em relação ao PI0H mostrou redução sem significância de 2,2%, já com o grupo PI24H houve aumento de 3% sem significância e com o grupo PI4D houve redução de 52,8% e em relação ao grupo PI7D ocorreu alteração significativa com redução de 21,1% ($p<0.05$).

A comparação entre o grupo PI0H e PI24H não observamos alteração significativa com aumento de 5,4% da média percentual, já na comparação com os grupos PI4D e PI7D também não observamos alteração significativa com respectivas reduções de 51,7% e 19,3%.

A comparação do grupo PI24H em relação ao PI4D não mostrou alterações com significância apenas redução de 54,2% e o grupo PI7D demonstrou alteração significativa com redução de 23,5% ($p<0.01$).

Entre os grupos PI4D e PI7D não obtivemos alteração significativa, apenas redução de 5,4% (Figura 11B).

A dispersão da região pós-sináptica foi mensurada e os dados obtidos mostram que houve alteração significativa com a comparação entre os grupos C, PI0H, PI24H, PI4D e PI7D com aumento de 10%, 10,2%, 10,5% e 10,8% ($p<0.0001$) respectivamente.

Os dados obtidos com a comparação do grupo PI0H em relação aos grupos PI24H, PI4D e PI7D mostram que não houve alteração significativa apenas um ligeiro aumento de 0,2%, 0,4% e 0,6% respectivamente.

O grupo PI24H em relação aos grupos PI4D e PI7D mostram que não houve alterações com significância, apenas um aumento de 0,1% e 0,4% respectivamente.

Os dados comparativos obtidos entre o grupo PI4D e PI7D mostraram não terem alterações significativas com aumento de 0,2% (Figura 11C).

O perímetro corado também foi analisado e mensurado, e os resultados do grupo C em relação ao PI 0 H não apresentou alteração significativa com aumento de 14,1%, já no grupo PI24H houve aumento de 15,4% e com os grupos PI4D e PI7D houve uma redução sem significância estatística de 7% e 17,8%, respectivamente.

Os dados comparativos obtidos com o grupo PI0H em relação ao PI24H não mostraram alteração significativa com aumento de 1,1%, já os grupos PI4D e PI7D mostraram alteração significativa com redução de 18,5% e 27,9% ($p<0.05$ e $p<0.0001$), respectivamente.

O grupo PI24H quando comparado aos grupos PI4D e PI7D mostraram alterações significativas com redução de 19,4% e 28,8% ($p<0.05$ e $p<0.0001$), respectivamente.

Os grupos PI4D e PI7D quando comparados não apresentaram nenhuma alteração com significância estatística, ao revelar redução de 11,5% (Figura 11D).

As mensurações do perímetro total foram analisadas, com resultados comparativos entre o grupo C e PI0h sem alterações significativas, teve o aumento de 11,8%, já em comparação com o PI24H mostrou um aumento sem significância de 12,4% e com os grupos PI4D e PI7D obtivemos uma redução não significativa de 8% e 18,9%, respectivamente.

Os dados comparativos do grupo PI0H em relação ao PI24H não apresentaram alterações significativas com o aumento de 0,5%, já em comparação com o PI4D e PI7D ocorreram reduções significativas de 17,8% e 27,5% ($p<0.05$ e $p<0.0001$), respectivamente.

Em relação a comparação entre o grupo PI24H e os grupos PI4D e PI7D obtivemos alterações significativas com redução de 18,2% e 27,9% ($p<0.05$ e $p<0.0001$).

Os grupos PI4D e PI7D quando comparados não resultaram em nenhuma alteração significativa, apenas uma redução de 11,7% (Figura 11E).

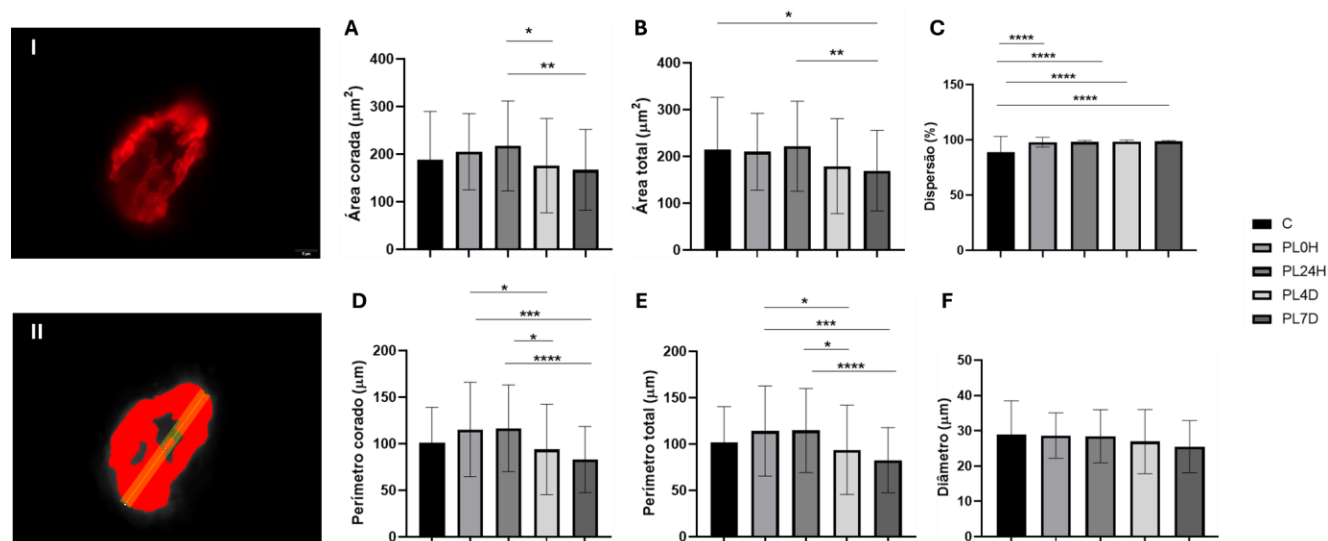
O diâmetro da região pós-sináptica também foi mensurado e os dados comparativos obtidos mostraram que não ocorreram alterações significativas entre o grupo C e o PI0H

com uma redução de 1,1%, já em relação ao grupo PI24H houve uma ligeira redução de 1,8% e os grupos PI4D e PI7D não mostraram alterações significativas apenas uma redução de 7,1% e 12% respectivamente.

Os dados observados na comparação entre o grupo PI0H e PI24H não mostraram alterações com significância, com redução de 0,7% e com os grupos PI4D e PI7D também não foram observadas alterações significativas, apenas uma redução de 6% e 11% respectivamente.

O grupo PI24H e os grupos PI4D e PI7D não apresentaram alterações significativas, ocorrendo redução de 5,3% e 10,3% respectivamente.

Os dados obtidos na comparação entre o grupo PI4D e PI7D mostraram uma redução sem significância de 5,4% (Figura 11F).



5.4.5. Células perissinápticas de schwann e núcleos sinápticos (S100 β e DAPI)

A imunomarcação com S100 β evidenciou as células terminais de schwann, no grupo Controle observamos área de atividade bem definida e delimitada.

No grupo PL0H observamos uma conformação bem definida porém com baixa atividade como demonstrado pela imunomarcação em comparação com o grupo controle que apresenta boa definição da área de atividade.

O grupo PL24H apresentou pouca área ativa pela imunomarcação, sem definição aparente quando comparado ao grupo controle.

O grupo PL4D apresentou redução na área, porém através da imunomarcação observamos uma grande atividade e delimitação bem definida.

O grupo PL7D apresentou redução de área e imunomarcação demonstrou baixa atividade sem muita definição aparente quando comparado ao grupo controle e 4 dias.

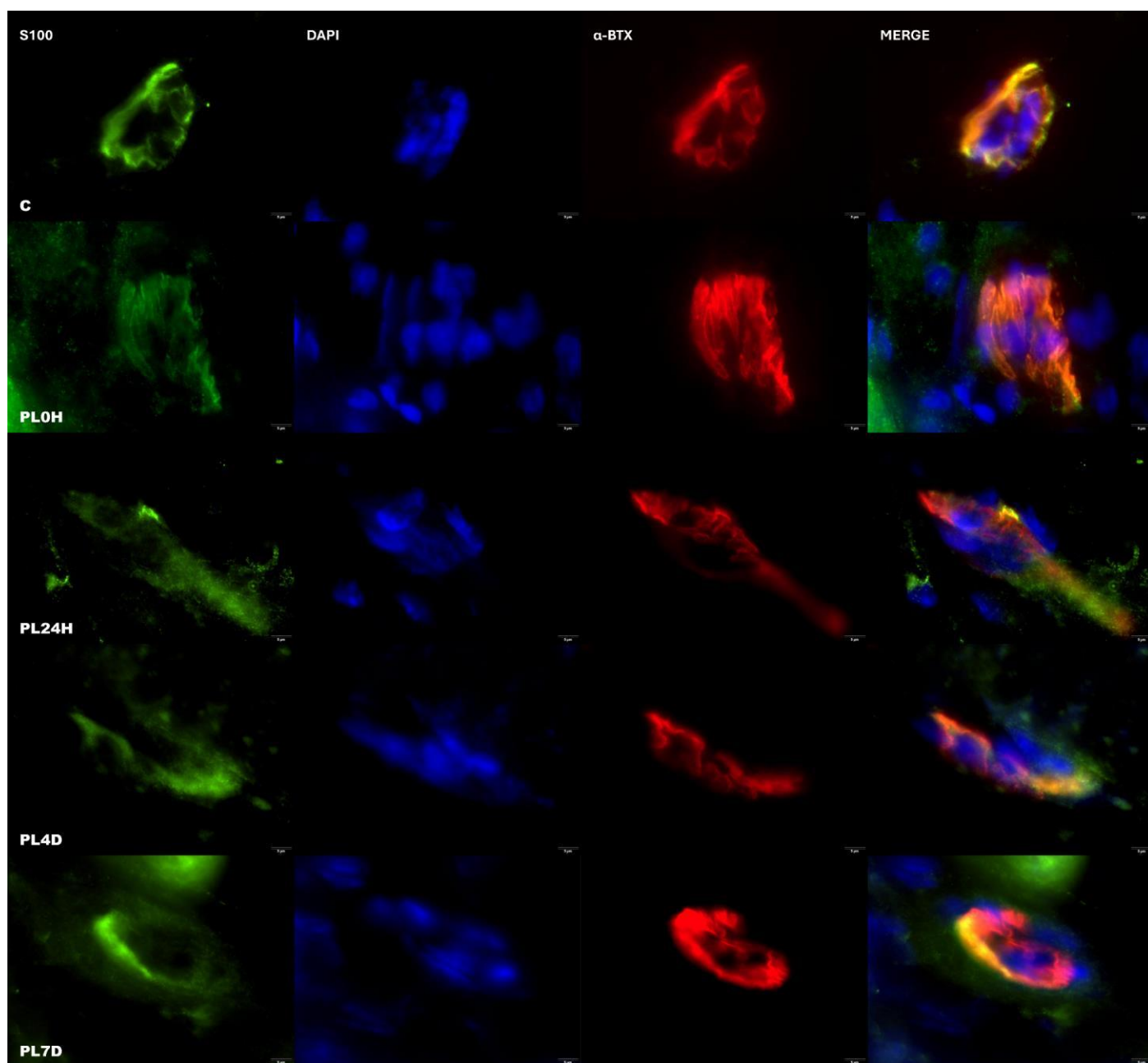


Figura 12. Imunofluorescência das células perissinápticas de Schwann marcado com anti-S100 β . Legenda: Imagens obtidas através da microscopia de imunofluorescência das CPS (anti-S100 β) juntamente com a sobreposição (MERGE) da região pós-sináptica (α -BTX) e dos núcleos (DAPI) dos grupos experimentais: C, PI0H, PI24H, PI4D e PI7D. Barras 5 μ m.

5.4.6. Contagem dos componentes sinápticos (DAPI)

Os núcleos sinápticos observados na sobreposição (entre S100, α -BTX e DAPI) e delimitados pela estrutura da região pós-sináptica foram contabilizados e os dados estatísticos analisados.

Os dados comparativos entre o grupo C e o PI0H mostram aumento significativo de 26,4% ($p<0.01$), em comparação com o PI24H não observamos nenhuma alteração significativa, apenas um aumento de 14,5% e com os grupos PI4D e PI7D não houve alteração significativa com redução de 12,8% e 1,7% respectivamente.

Em relação a comparação entre o grupo PI0H e PI24H obtivemos redução sem significância de 9,4%, com os grupos PI4D e PI7D observamos redução significativa de 31% e 22,3% ($p<0.0001$ e $p<0.01$) respectivamente.

O grupo PI24H mostrou uma significativa redução de 23,8% ($p<0.01$) em relação ao PI4D e quando comparado ao PI 7 D não apresentou alterações significativas, apenas uma redução de 14,2%.

Os dados obtidos na comparação entre o grupo PI4D e PI7D não apresentaram significância, ao revelar redução de 12,7% (Figura 13A).

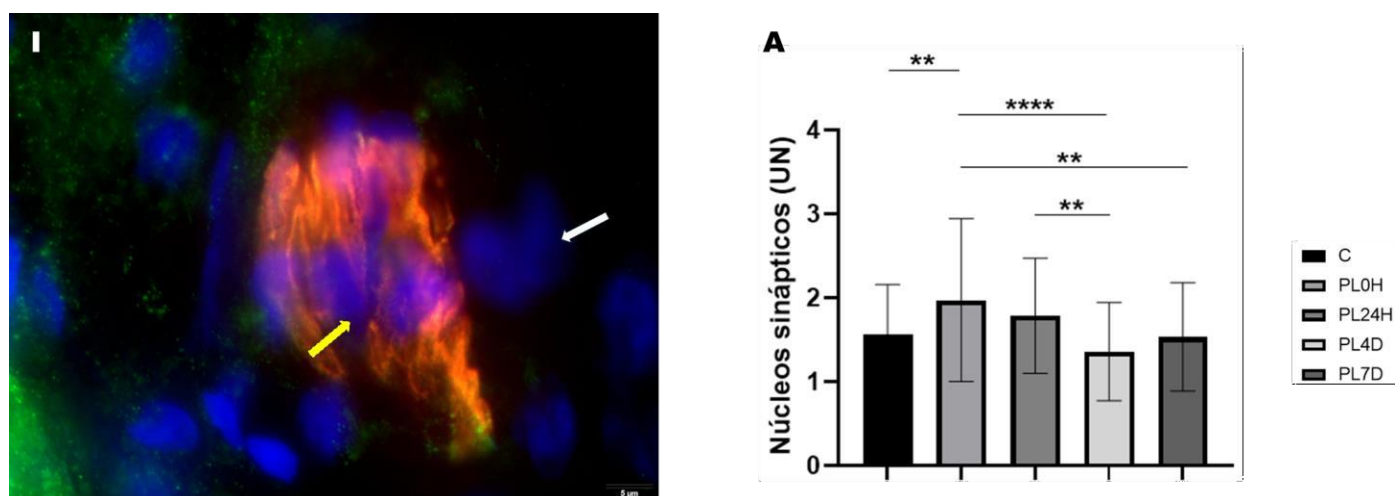


Figura 13. Sobreposição dos componentes estruturais e celulares da JNM. Legenda: Imagem (I) obtidas através da microscopia de imunofluorescência das CPS (anti-S100β) juntamente com a sobreposição (MERGE) da região pós-sináptica (α-BTX) e dos núcleos (DAPI) marcando núcleos sinápticos (flecha amarela) e núcleos não sinápticos (flecha branca) dos grupos experimentais: C, PL0H, PL24H, PL4D e PL7D. Barras 5 μm.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo descrevemos as adaptações agudas dos componentes estruturais da junção neuromuscular através da aplicação de um protocolo baseado na lesão muscular induzida por contração excêntrica, observando que em relação à massa corporal e massa muscular dos animais utilizados não obtivemos alterações significativas, não correndo redução nem aumento dessas variáveis no decorrer do experimento, enquanto a organização, densidade e área nuclear foi observado aumento na concentração nuclear e disposição desses núcleos sendo possível observar núcleos no centro da fibra comprovando a ocorrência da lesão tecidual. Os resultados obtidos com a região pré-sináptica demonstram alteração estrutural nos grupos iniciais PL0H e PL24H e rápida reestruturação ao 7º dia pós experimento, a observar no grupo PL7D o retorno mais próximo da conformação observada no grupo controle.

Os receptores presentes na região pós-sináptica (AChR) também sofreram com efeitos deletérios e degenerativos gerados pelo protocolo nos períodos iniciais, observados nos grupos PL0H e PL24H, com alterações estruturais significativas, por sua vez, com o grupo PL7D revelou uma maior proximidade da conformação padrão observada no grupo controle.

Os resultados obtidos através da análise dos componentes celulares através das CPS apresentando alterações em relação a todos os grupos experimentais analisados e aumento da presença dos núcleos de células sinápticas contidas na JNM em fase inicial (PL0H e PL24H).

Iniciamos com a avaliação da massa corporal dos animais e da massa muscular (quadríceps femoral), que com os resultados obtidos possibilitou a constatação de que o protocolo não foi capaz de gerar alterações significativas em relação à massa corporal e ao trofismo muscular, visto que a duração e intensidade do protocolo não foram suficientes para ocorrência dessas alterações. No estudo realizado por Pimentel (2021), com exercício elaborado com sobrecarga para análise do músculo bíceps braquial com duração de 2 semanas, foi constatado um aumento da massa corporal e muscular em decorrência da intensidade e duração do protocolo.

Isso corrobora que a falta de intensidade e duração de um protocolo interferem no aumento ou redução da massa corporal e muscular, em outro estudo com subida vertical

e sobrecarga, com duração de 21 dias, visando estudar os membros inferiores realizado por Peretti et al. (2017) foi observado que um protocolo de exercício com sobrecarga gerou alterações hipertróficas no músculo tibial analisado, já o protocolo de lesão induzida por contração excêntrica foi realizado em apenas um dia por um curto período de tempo não apresentando alteração de hipertrofia no músculo quadríceps femoral.

A análise de dimensão fractal foi utilizada como instrumento para detalhar estruturas anatômicas e processos fisiológicos como organização dos diferentes tipos de fibras musculares Lemmens et al., 2020, de modo que no presente estudo houve aumento dos núcleos celulares com destaque aos grupos PI0H e PI24H, nas fibras musculares do quadríceps femoral, o que demonstra a adaptação gerada pelo protocolo de contração excêntrica.

Com as análises da microscopia de luz evidenciou-se a lesão tecidual e processo adaptativo do tecido muscular, com a presença e aglomeração de núcleos em diversas regiões de todos os grupos experimentais mas principalmente nos grupos iniciais PL0H e PL24H. Estes resultados também corroboram com o estudo de Cury et al., (2018) que descreveram a organização nuclear de forma próxima aos ocorridos no protocolo de lesão induzida por contração excêntrica. Observamos um processo regenerativo com núcleos centralizados e também presença de núcleos no ventre da fibra demonstrando plasticidade do tecido muscular e ação do organismo para recrutamento celular para criação de novos miotubos conforme descrito por Chen (2021), processo homeostático do organismo com resposta de regeneração tecidual.

Em relação aos resultados obtidos com os receptores de membrana pré-sinápticos Deschenes et al. (2023) descreveu mensurações de variáveis pré-sinápticas marcadas com anticorpo anti-Bassoon, para o presente estudo adaptamos e padronizamos a diluição do anticorpo para essa região. Os dados obtidos a partir da mensuração das variáveis nos permitiu avaliar a extensão da área e perímetro dos receptores pré-sinápticos e sua interação com os receptores pós-sinápticos presentes na placa motora, diante dos efeitos da lesão muscular induzida por contração excêntrica.

A partir da observação morfológica e das variáveis calculadas através das imagens de microscopia de imunofluorescência foi possível constatar um aumento da área dos receptores pré-sinápticos principalmente no grupo PL24H frente às adaptações geradas pela lesão muscular e redução desse parâmetro nos demais grupos experimentais até quase sua normalização no grupo PL7D, em relação aos padrões observados no grupo controle. O que sugere uma rápida resposta adaptativa aos efeitos gerados pela lesão tecidual e destaque para acelerada restauração observada nesta região esse efeito pode ser explicado com um estudo realizado por Chandler (2022), que demonstra a interação entre os componentes celulares e os botões pré-sinápticos da JNM, a ação das CPS quando identificado um processo deletério em região pré-sináptica, esses componentes celulares são ativados com expressão de proteínas como a GPR126 com fatores tróficos que guiam esses componentes celulares até o processo da lesão, exercendo sua função de restauração e reacoplamento da estrutura para o funcionamento padrão dos botões pré-sinápticos.

Na mensuração do perímetro foi possível avaliar um aumento no grupo PL0H e redução no grupo PL24H, PL4D e PL7D que se aproximaram da conformação padrão observada no grupo controle, o que indica uma manutenção da estrutura frente ao processo de lesão, já os dados obtidos pela dispersão foi possível observar aumento no grupo PL0H e redução no PL24H. No estudo de DESCHENES (2011) apresentou resultados semelhantes ao nosso estudo, no entanto, utilizaram esteira rolante, com duração de 10 semanas, onde foram estudados grupo de ratos jovens e ratos idosos, e na ocasião foi também relatado aumento significativo no perímetro.

A redução das zonas ativas é influenciada pela idade dos animais analisados, quanto mais jovem o animal mais rápida a resposta adaptativa desta região e conforme o processo de envelhecimento ocorre as proteínas existentes decompõe naturalmente os receptores presentes na região pré-sináptica. Li et al., (2024) observaram as adaptações e o papel da JNM no envelhecimento, o que torna possível explicar que a idade (adultos com 100 dias de idade) dos animais utilizados em nosso protocolo permitiu uma rápida resposta adaptativa a lesão principalmente pelo fato da mesma não ter ocorrido diretamente nas estruturas da JNM e sim no tecido muscular que a circunda.

Com a mensuração realizada a partir das imagens obtidas da região pós-sináptica foi possível observar comprometimento dessa estrutura com o protocolo de lesão induzida por contração excêntrica como descrito por o Krause Neto et al. (2015), onde os autores demonstraram a partir da análise do músculo dos membros posteriores de ratos que

realizaram exercício com sobrecarga de peso foi observado os efeitos deletérios do protocolo na estrutura da JNM corroborando com os achados das variáveis obtidas por este estudo, como aumento da área e do perímetro nos grupos iniciais PL0H e PL24H, e sem retorno a conformação padrão dos grupos posteriores PL4D e PL7D que demonstram redução de área e do perímetro total frente ao acometimento dessa estrutura como demonstrado por Rudolf et al. (2014) cujo os autores observaram a redução dessa variável em animais idosos e animais com distrofia muscular, corroborando que os avanços da idade e da distrofia impedem o retorno a conformação padrão dessa estrutura mesmo perante a tentativas de regeneração do tecido muscular.

A mensuração dos dados de dispersão da região pós-sináptica mostrou alterações significativas em todos os grupos experimentais demonstrando a não compactação dessa região frente ao protocolo escolhido de lesão induzida por contração excêntrica, indicando os efeitos degenerativos da lesão muscular, Pimentel neto et al. (2021) demonstrou a partir das análises do músculo de membro superior em ratos a redução na variável dispersão indicando compactação dos receptores pós-sinápticos frente ao estímulo executado pelo protocolo de escalada vertical com sobrepeso.

Segundo Wilson et al. (2005) o tipo de exercício realizado resultam em alterações diferentes na morfologia e nas variáveis a serem analisadas, esses dados nos ajudam a correlacionar as áreas pré e pós-sinápticas e como ambas sofreram adaptações distintas frente ao protocolo desenvolvido, além de indicar a disparidade na velocidade da resposta do processo de regenerativo e de reestruturação de cada estrutura avaliada.

A identificação das CPS pela imunomarcação possibilitou uma análise morfológica e permitiu a contagem de núcleos sinápticos delimitados pela estrutura pós-sináptica da JNM

já que esse componente celular está intimamente ligado à região pós-sináptica acompanhando sua estrutura, e visto que sua função é indispensável para os processos adaptativos sofridos pela placa motora onde se acopla juntamente aos receptores pós-sinápticos, como descrito por Astrow et al. (1998).

Outros estudos apontam a importância da localização desses componentes celulares e seu papel nos diversos processos adaptativos que ocorrem nas estruturas pré e pós-sinápticas descritos por Walker (2022) onde o autor aborda como as CPS exercem um papel fundamental na identificação e trofismo mediante a um processo

deletério, com marcações proteicas específicas ele descreveu a ação das CPS frente a lesão em região pré-sináptica movimentando suas estruturas na tentativa de reacoplar a região de forma mais rápida e eficiente dando suporte e proteção para que os reparos necessários sejam realizados.

A contagem de núcleos sinápticos mostrou um aumento significativo nos grupos iniciais PL0H e PL24H condizente com a análise das CPS para suporte, reparo e proteção da JNM como demonstrado no estudo Alhindi et al. (2021) que descreveu os componentes ou núcleos sinápticos da CPS como forma de compreender e descrever extensão total da área de ação das CPS.

Os resultados obtidos a partir deste estudo contribuíram para uma percepção diferente na forma de ação das CPS e na sua intensidade de interação com as estruturas das fendas pré e pós sinápticas. Outros estudos mais aprofundados e com técnicas mais complexas devem ser aplicados para que possamos ter um entendimento mais completo desse mecanismo de ação tão importante.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que o músculo quadríceps femoral apresenta lesão gerada pelo protocolo de contração excêntrica e que o mesmo demonstra promover relevante processo adaptativo estrutural em resposta ao processo de lesão aguda, analisado neste estudo:

- Aumento na distribuição, arranjo e acúmulo de núcleos visíveis pela microscopia de luz pela técnica de HE indicam tentativa de promover o suporte funcional e estrutural para as fibras musculares durante o processo regenerativo;
- Aumento na áreas ativas de região pré-sináptica da JNM dos grupos pós lesão principalmente observadas nos grupos PL0H e PL24H com rápida resposta adaptativa e processo regenerativo indicando a ocorrência de adaptações nessa estrutura;
- Aumento na área e dispersão dos receptores de acetilcolina da região pós-sináptica nos grupos PL0H e PL24H demonstrou ser a região mais afetada pelos efeitos deletérios da lesão e também demonstrou uma dificuldade na resposta às adaptações e processo regenerativo já que mostrou não estar recuperada nos grupos PL4D e PL7D.
- Identificação em todos os grupos experimentais e aumento da atividade proteica notado nas células perissinápticas de Schwann evidencia a importância desse componente celular para estabilidade e funcionamento padrão da JNM
- Contagem dos núcleos sinápticos contidos na JNM evidenciando o aumento nos grupos iniciais PL0H e PL24H demonstraram a contribuição para o processo regenerativo dos componentes estruturais principalmente da região pré sináptica, facilitando o reacoplamento entre o terminal axonal e a fenda pós-sináptica.

8. REFERÊNCIAS

Alvarez-Suarez P, Gawor M, Proszynski TJ (2020) Perisynaptic schwann cells -the multitasking cells at the developing neuromuscular junctions. *Semin Cell Dev Biol* 104:31-38

Bailey, Sarah. / Science experiments traditionally only used male mice – here’s why that’s a problem for women’s health. In: *The Conversation*. 2023.

Krause Neto W, Silva W, Oliveira T, Vilas Boas A, Ciena A, Caperuto ÉC, Gama EF. Ladder-based resistance training with the progression of training load altered the tibial nerve ultrastructure and muscle fiber area without altering the morphology of the postsynaptic compartment. *Front Physiol*. 2024 Apr 17;15:1371839. doi: 10.3389/fphys.2024.1371839. PMID: 38694209; PMCID: PMC11061484.

BHUTDA, S.; SURVE, M.; ANIL, A.; KAMATH, K.; SINGH, N.; MODI, D.; BANERJEE, A. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. **Bio-Protocol**, v. 7, n. 21, 2017.

BURATTI, Pâmela. Avaliação funcional e morfológica do músculo estriado esquelético e junções neuromusculares em ratos submetidos a um modelo de paralisia cerebral / Pâmela Buratti. Cascavel: UNIOESTE, 2017.

Carrasco DI, Seburn KL, Pinter MJ (2016) Altered terminal Schwann cell morphology precedes denervation in SOD1 mice. *Exp Neurol* 275:172-181.

CARDIFF, R. D.; MILLER, C. H.; MUNN, R. J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2014, n. 6, p. 655–658, 2014.

CARVALHO, LS, ARAÚJO VA, SOUZA ES, SANTOS RMC, MENDONÇA WV, ARRUDA JRL, et al. Auto liberação miofascial x alongamento estático: efeitos sobre a flexibilidade de escolares. **Rev Ce Pes Ava Qua Vid** 2017; 9(2):2-8.

Chen B, Banton MC, Singh L, Parkinson DB, Dun XP. Single Cell Transcriptome Data Analysis Defines the Heterogeneity of Peripheral Nerve Cells in Homeostasis and Regeneration. *Front Cell Neurosci*. 2021 Mar 22;15:624826. doi: 10.3389/fncel.2021.624826. PMID: 33828460; PMCID: PMC8019921.

CLARKSON, P. M. Eccentric exercise and muscle damage. *Int. J. Sports Med*, v.18, n.4, p.314-317, 1997.

CURY, S. S.; FREIRE, P. P.; MARTINUCCI, B.; DOS SANTOS, V. C.; DE OLIVEIRA, G.; FERRETTI, R.; DAL-PAI-SILVA, M.; PACAGNELLI, F. L.; DELELLA, F. K.; CARVALHO, R. F. Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 503, n. 1, p. 109-115, 2018.

DE SOUZA J., et. al. Lesão muscular: revisão de modelos experimentais. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, p. 1253 – 1260, 2013.

Deschenes, M.R.; Mifsud, M.K.; Patek, L.G.; Flannery, R.E. Cellular and Subcellular Characteristics of Neuromuscular Junctions in Muscles with Disparate Duty Cycles and Myofiber Profiles. *Cells* 2023, 12, 361. <https://doi.org/10.3390/cells12030361>

Deschenes MR, Roby MA, Glass EK. Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. *Neuroscience*. 2011 Sep 8;190:56-66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.070. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21683772; PMCID: PMC3156295.

DUARTE, J. A. R. Lesões celulares do músculo esquelético induzidas pelo exercício físico, Portugal. Dissertação de Doutoramento em Ciências do Desporto, especialidade Biologia do Desporto, Porto: Faculdades de Ciências do Desporto e de Educação Física, Universidade do Porto, 1993.

Deschenes MR, Kressin KA, Garratt RN, Leathrum CM, Shaffrey EC. Effects of exercise training on neuromuscular junction morphology and pre- to post-synaptic coupling in young and aged rats. *Neuroscience*. 2016 Mar 1;316:167-77. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.12.004. Epub 2015 Dec 19. PMID: 26711679; PMCID: PMC4724510.

DESCHENES MR; TUFTS HL; OH J; LI S; NORONHA AL; ADAN MA. Effects of exercise training on neuromuscular junctions and their active zones in young and aged muscles. **Neurobiol Aging**. 2020 Nov;95:1-8. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.001. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32739557.

DESCHENES, M.R.; TREBELHORN, A.M.; HIGH, M.C.; TUFTS, H.L.; OH J. Sensitivity of subcellular components of neuromuscular junctions to decreased neuromuscular activity. **Synapse**. 2021 Nov;75(11):e22220. doi: 10.1002/syn.22220. Epub 2021 Aug 6. PMID: 34318955.

FU C, XIA Y, MENG F, LI F, LIU Q, ZHAO H, PAN S. MRI Quantitative analysis of eccentric exercise induced skeletal muscle injury in rats. **Acad Radiol**. 2019;19:1–8. doi:10.1016/j.acra.2019.05.01113.

GABRIELA K BARBOSA; CAROLINA S JACOB; MARIANA P RODRIGUES; LARA C ROCHA; JURANDYR PIMENTEL NETO; ADRIANO P CIENA, Morphological Changes in the Motor Endplate and in the Belly Muscle Induced by Previous Static Stretching to the Climbing Protocol, **Microscopy and Microanalysis**, Volume 27, Issue 5, 1 October 2021, Pages 1183–1191, <https://doi.org/10.1017/S1431927621012253>.

GARCIA, T. A.; TAMURA OZAKI, G. A.; CASTOLDI, R. C.; KOIKE, T. E.; TRINDADE CAMARGO, R. C.; SILVA CAMARGO FILHO, J. C. Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. *Tissue and Cell*, v. 54, p. 120–126, 2018. GARRETT JÚNIOR, W. E. Muscle strain injuries. **The American Journal of Sports Medicine**, v.24, n.6, p.2-8, 1996.

GRILLO, B.A.C.; ROCHA, L.C.; MARTINEZ, G.Z.; PIMENTEL NETO, J.; JACOB, C.S.; WATANABE, I.; CIENA, A.P. Myotendinous Junction Components of Different Skeletal Muscles Present Morphological Changes in Obese Rats. **Microscopy and Microanalysis**, v.27, n.3, p.598-603, 2021.

KANAZAWA, Y.; NAGANO, M.; KOINUMA, S; SUJINO, M.; MINAMI, Y.; SUGIYO, S.; TAKEDA, I.; SHIGEYOSHI, Y. Basement membrane recovery process in rat soleus muscle after exercise-induced muscle injury. **Connective Tissue Research**, [S.l.], v. 62, n. 5, p. 1–12, 2020.

KARPERIEN, A.; JELINEK, H. F.; LEANDRO, J. G. SOARES, J. V. B.; JR, R. M. C.; LUCKIE, A. Automated detection of proliferative retinopathy in clinical practice. *Clinical Ophthalmology*, v. 2, n. 1, p. 109-122, 2008.

KRAUSE, W.; SILVA, W.A.S.; CIENA, A.P.; BOCALINI, D.; NUCCI, R.A.B.; ANARUMA, C.A.; GAMA, E.F. Total training load may explain similar strength gains and muscle hypertrophy seen in aged rats submitted to resistance training and anabolic steroids. *The Aging Male*, v. 17, p. 1-12, 2017.

KRAUSE NETO, W; CIENA, A.P; ANARUMA, C.A; SOUZA, R.R; GAMA, E.F; Effects of exercise on neuromuscular junction components across age: systematic review of animal experimental studies. *Bmc Research Notes*, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2015.

Lemmens S, Devulder A, Van Keer K, Bierkens J, De Boever P, Stalmans I. Systematic Review on Fractal Dimension of the Retinal Vasculature in Neurodegeneration and Stroke: Assessment of a Potential Biomarker. *Front Neurosci*. 2020 Jan 28;14:16. doi: 10.3389/fnins.2020.00016. PMID: 32116491; PMCID: PMC7025576.

Li, Y.; Badawi, Y.; Meriney, S.D. Age-Related Homeostatic Plasticity at Rodent Neuromuscular Junctions. *Cells* 2024, 13, 1684. <https://doi.org/10.3390/cells13201684>

LIMA, T.I. Influência do exercício físico na resposta transcricional do músculo esquelético em ratos diabéticos induzidos por stz. *Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas*, p.1-191, 2013.

LIEBER, R. L.; ROBERTS, T. J.; BLEMKER, S. S.; LEE, S. S. M.; HERZOG, W. Skeletal muscle mechanics, energetics and plasticity. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2017.

LOURENÇO, I.; KRAUSE NETO, W.; AMORIM, L. S. P.; ORTIZ, V. M. M.; GERALDO, V. L.; FERREIRA, G. H. S.; CAPERUTO, E. C.; GAMA, E. F. Muscle hipertrophy and ladder-based resistance training for rodents: A systematic review and meta-analysis. *Physiological Reports*, v. n. 17, 2020.

Lourenço Í, Krause Neto W, Dos Santos Portella Amorim L, Moraes Munhoz Ortiz V, Lopes Geraldo V, Henrique da Silva Ferreira G, Chagas Caperuto É, Florencio Gama E. Muscle hypertrophy and ladder based resistance training for rodents: A systematic review and meta-analysis. *Physiol Rep*. 2020 Sep;8(17):e14502. doi: 10.14814/phy2.14502. PMID: 32889774; PMCID: PMC7507488.

LOURENÇO, Í. et al. Previous short-term use of testosterone propionate enhances muscle hypertrophy in Wistar rats submitted to ladder-based resistance training. **Tissue and Cell**, v. 75, 1 abr. 2022. MACINTOSH, B. R. Recent developments in understanding the length dependence of contractile response of skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 6, p. 1059–1071, 2017.

MARCARIA, R. Positive and negative work performances and their efficiencies in human locomotion. In: *Environmental Effects of Work Performance*, edited by G. R. Cumming, D. Snidal, and A. W. Taylor. Windsor, Ont., Canada: Canadian Assoc. Sports Sci., 1972, p. 215-228.

MATHEWSON, M.A., Lieber, R.L., 2015. Pathophysiology of muscle contractures in cerebral palsy. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 26, 57-67.

MOO, E.K.; FORTUNA, R.; SIBOLE, S.C.; ABUSARA, Z; HERZOG, W. In vivo Sarcomere Lengths and Sarcomere Elongations Are Not Uniform across an Intact Muscle. **Frontiers in Physiology**. v.7, p.1-9, 2016.

MOORE, Keith L. Anatomia orientada para a clínica/ Keith.L.Moore,ArthurF. Dalley, Anne M. R. Agur; tradução Claudia Lúcia Caetano de Araújo. – 8. Ed.– Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

PIMENTEL NETO, J.; ROCHA, L. C.; BARBOSA, G. K.; JACOB, C. S.; KRAUSE NETO, W.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Myotendinous junction adaptations to ladder-based resistance training: identification of a new telocyte niche. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

Peretti, Ana Luiza , Sobral Antunes, Juliana , Lovison, Keli , Karvat, Jhenifer , Higuchi, Guilherme , Costa Brancalhão, Rose Meire , Flor Bertolini, Gladson Ricardo , Chasko Ribeiro Lucinéia de Fátima . Ação do exercício de subida em escada com sobrecarga na morfologia do músculo tibial anterior de ratos Wistars após axonotmese. *ConScientiae Saúde* [en linea]. 2017, 16(1), 33-41[fecha de Consulta 8 de Junio de 2025]. ISSN: 1677-1028. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92952141004>

PINTO, S. S. & CASTILLO, A. A. Lesão Muscular: Fisiopatologia e Tratamento. *Rev. Fisioterapia em Movimento*, v.12, n.2, p.23-36, 1998.

RASSIER, D. E. Sarcomere mechanics in striated muscles: from molecules to sarcomeres to cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 313, n. 2, p. C134–C145, 2017.

ROCHA, L. C.; JACOB, C. S.; BARBOSA, G. K.; PIMENTEL NETO, J.; KRAUSE NETO, W.; GAMA, E. F.; CIENA, A. P. Remodeling of the skeletal muscle and postsynaptic component after short term joint immobilization and aquatic training. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 154, p. 621-628, 2020.

Rudolf R, Khan MM, Labeit S, Deschenes MR. Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. *Front Aging Neurosci*. 2014 May 22;6:99. doi: 10.3389/fnagi.2014.00099. PMID: 24904412; PMCID: PMC4033055.

Iyer, S. R., Shah, S. B., & Lovering, R. M. (2021). The Neuromuscular Junction: Roles in Aging and Neuromuscular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8058.

SANTOS TS. Quantificação do uso de crioterapia no desempenho físico e tratamento de lesões na base de dados scielo.org **revista brasileira de prescrição e fisiologia do exercício ISSN 1981-9900 versão eletrônica**. Periódico do instituto brasileiro de pesquisa e ensino em fisiologia do exercício. São Paulo, v 8 n 43 p 44- 49 jan/fev 2014 SCHLEIP R, JAGER H, KINGLER W. What is 'fascia'? A review of different nomenclatures. *Journal of Bodywork & Movement Therapies* 2012; 16(4): 496-502.

SILVINI H, ANTUNES M, LIMA VP, SILVA JB, SANTANA H, PAZ G.A. Efeito agudo da técnica nos agonistas e antagonistas sobre o desempenho de repetições máximas, tempo sob tensão e percepção subjetiva de esforço na cadeira extensora. *Rev Bras Pres Fis Exerc* 2017; 11(69): 684-91.

SULLIVAN KM, SILVEY DB, BUTTON DC, BEHM DG. Roller -massager application to the hamstrings increases sit-and-reach range of motion within five to ten seconds without performance impairments. *Int J Sports PhysTher* 2013; 8(3): 228-236.

Vannucci B, Santosa KB, Keane AM, Jablonka-Shariff A, Lu CY, Yan Y, MacEwan M, Snyder Warwick AK. What is Normal? Neuromuscular junction reinnervation after nerve injury. *Muscle Nerve*. 2019 Nov;60(5):604-612.

Walker, Chandler L. PhD,*. Progress in perisynaptic Schwann cell and neuromuscular junction research. *Neural Regeneration Research* 17(6):p 1273-1274, June 2022.

APÊNDICE 1

Documento Comitê de Ética e Uso de Animais - CEUA, IB UNESP Rio Claro - SP, decisão CEUA N° 26/2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA - IB - UNESP - CRC

DECISÃO CEUA N° 26/2023

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 25.08.2023	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Adaptações da junção neuromuscular e das células perissinápticas de Schwann em modelo experimental de lesão muscular", protocolo nº 2426, sob responsabilidade de Matheus Bertanha Fior (Pesquisador Responsável), e Adriano Polican Ciena (Orientador) que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).	
Subprojeto(s) vinculado(s): ==,==	

Colaboradores: Jurandyr Pimentel Neto	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 54ª reunião ordinária, realizada em 06.12.2023.	
(x)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
()	Não Aprovou.
()	Retirou, devido à permanência das pendências.

Vigência da autorização: 27/10/2023 a 27/10/2025	
Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica	
Espécie/linhagem/raça: Rato isogênico Wistar	
Número de animais: 60; Peso: 300g; Idade: 75 dias; Sexo: Macho	
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério Central da UNESP- Câmpus de Botucatu	

Objetivo Acadêmico:	() TCC
	(x) Mestrado
	() Doutorado
	() Outros
	() Pós- Doutorado

Rio Claro, 06/12/2023

Claudio José Von Zuben
Prof. Dr. Claudio José Von Zuben
Coordenador

