
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISABELLA ALMEIDA SANTOS

**MORFOLOGIA MITOCONDRIAL NA JUNÇÃO
MIOTENDÍNEA DE RATOS *Wistar* (*Rattus
norvegicus*)**



Rio Claro - SP
2024

ISABELLA ALMEIDA SANTOS

**MORFOLOGIA MITOCONDRIAL NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DE
RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Coorientador(a): Profa. Dra. Paula Camargo Oliveira

Rio Claro - SP
2024

S237m

Santos, Isabella Almeida

Morfologia mitocondrial na junção miotendínea de ratos Wistar
(Rattus norvegicus) / Isabella Almeida Santos. -- Rio Claro, 2024
30 f. : il., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Biociências, Rio Claro

Orientador: Adriano Polican Ciena

Coorientadora: Paula Camargo Oliveira

1. Ciências Biológicas. 2. Músculo esquelético. 3. Mitocôndria. 4.
Junção miotendínea. 5. Morfologia. I. Título.

ISABELLA ALMEIDA SANTOS

**MORFOLOGIA MITOCONDRIAL NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DE
RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Adriano Polican Ciena (orientador)

Dr. Robson Chacon Castoldi

Me. Jurandyr Pimentel Neto

Aprovado em: 11 de Novembro de 2024

Assinatura do discente

Assinatura do(a) orientador(a)

Assinatura do(a) coorientador(a)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, avó e irmã, que me incentivaram nos momentos mais difíceis da confecção deste trabalho e acreditaram em mim durante todo o processo.

As pessoas queridas que conviveram comigo, me incentivaram e acreditaram em mim e que, certamente, me ajudaram a chegar até aqui.

Ao professor Adriano, por ser meu orientador e desempenhar este papel com dedicação, amizade e conselhos, sempre disposto e paciente para ajudar e me guiar nesse caminho.

Aos colegas do Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF) da Unesp - Rio Claro, que tantas vezes me auxiliaram.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da ESALQ/USP por disponibilizar o uso do microscópio eletrônico de transmissão e permitir a realização deste trabalho.

RESUMO

A junção miotendínea (JMT) é uma região complexa e muito especializada que conecta o músculo esquelético ao tendão e está fortemente associada com a contração e a transmissão de força muscular. O músculo estriado esquelético é um dos tecidos mais abundantes do corpo e é responsável, principalmente, pelo movimento, dependente de contração. A produção e distribuição de força do músculo e da junção miotendínea dependem da molécula carreadora de energia adenosina trifosfato (ATP) sintetizada pelas mitocôndrias. A mitocôndria é uma das principais organelas associadas ao aparato locomotor e sua organização no músculo esquelético é bem descrita, no entanto, sua distribuição na junção miotendínea não é definida. Dessa forma, o objetivo do estudo foi compreender a morfologia mitocondrial na junção miotendínea do músculo tríceps braquial de ratos Wistar. Para a realização deste estudo foram utilizados 5 ratos Wistar adultos, as amostras da JMT foram dissecadas e analisadas através da microscopia eletrônica de transmissão, o que permitiu a descrição das características morfológicas das mitocôndrias presentes nesta região de interface. Os resultados mostram uma diferença significativa no volume mitocondrial intermiofibrilar ao longo das fibras do mesmo tipo e no volume subsarcolemal entre os diferentes tipos miofibrilares. A densidade das cristas apresentam diferenças significativas ao longo das fibras do Tipo II nos dois compartimentos do sarcômero e, no geral, as mitocôndrias subsarcolemais das fibras do Tipo II são maiores e mais esféricas que mitocôndrias intermiofibrilares do mesmo tipo. O estudo inicial mostrou pela primeira vez a organização e localização das mitocôndrias na região da JMT. São necessários estudos futuros sobre a morfologia mitocondrial nesta região de interface.

Palavras-chave: músculo estriado esquelético; junção miotendínea; mitocôndria; morfologia.

ABSTRACT

The myotendinous junction (MTJ) is a complex and highly specialized connection area between skeletal muscle and tendon tissue, and is strongly associated with contraction and muscle force transmission. The striated skeletal muscle is the most ample body tissue and is mainly responsible for contraction dependent movement. Muscle and MTJ force production and distribution depends on adenosine triphosphate (ATP), an energy carrier molecule synthesized by mitochondria. Mitochondria are eukaryotic organelles related to locomotor apparatus and its arrangement on skeletal muscle is well described. Although, its distribution on myotendinous junction is not very known. Thus, the aim is to investigate the mitochondrial morphology on Wistar rats triceps brachii myotendinous junction. To carry out the study, 5 adult Wistar rats were used, the MTJ samples were dissected and analyzed by Transmission Electron Microscopy which allowed the mitochondrial morphological characteristics description in this interface. The results show a significant difference in intermyofibrillar mitochondrial volume along the same fiber type and in subsarcolemmal volume between the different fiber types. The cristae density shows significant differences along Type II fibers in both sarcomere compartments and, in general, the subsarcolemmal mitochondria of Type II fibers are larger and more spherical than intermyofibrillar mitochondria of the same type. The initial study showed for the first time the arrangement and localization of mitochondria in the MTJ region. Future studies on the mitochondrial morphology in this connection area are needed.

Keywords: striated skeletal muscle; myotendinous junction; mitochondria; morphology.

Title in english: Mitochondrial morphology on *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*) myotendinous junction

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Músculo estriado esquelético.....	7
1.2 Junção miotendínea.....	9
1.3 Mitocôndrias.....	10
2 OBJETIVO GERAL.....	12
2.1 Objetivos específicos.....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	13
3.3 Análise estatística.....	15
<i>3.3.1 Morfologia mitocondrial.....</i>	<i>15</i>
<i>3.3.2 Densidade das cristas mitocondriais.....</i>	<i>15</i>
<i>3.3.3 Volume mitocondrial.....</i>	<i>16</i>
<i>3.3.4 Análise de variância.....</i>	<i>16</i>
4 RESULTADOS.....	17
4.1 Morfologia mitocondrial.....	17
4.2 Densidade das cristas mitocondriais.....	20
4.3 Volume mitocondrial.....	21
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

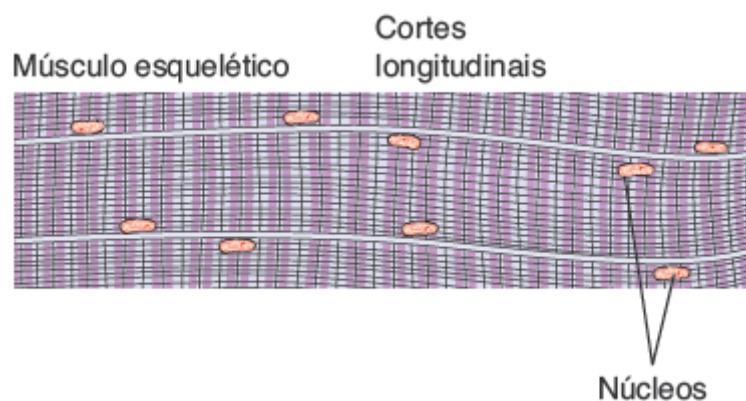
1 INTRODUÇÃO

1.1 Músculo estriado esquelético

O músculo estriado esquelético é responsável por facilitar o movimento, pela manutenção da postura e pela respiração, funções dependentes da habilidade de contração do músculo (Swalsingh *et al.*, 2022). É um dos tecidos mais abundantes do corpo humano e ocupa cerca de 40% do volume corporal, além de ser um dos mais ativos metabolicamente (Drake; Yan, 2017).

Os núcleos das células do músculo esquelético tem característica de elipse e se localizam na periferia das fibras (Figura 1) e abaixo do sarcolema, tecido conjuntivo que envolve as fibras. O tecido conjuntivo que envolve o músculo estriado esquelético tem a função de manter as fibras unidas e transmitir a força gerada pelo músculo para os ossos (Junqueira; Carneiro, 2023).

Figura 1 - Esquema de músculo estriado esquelético.



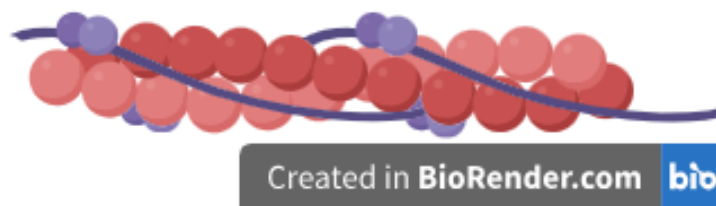
Fonte: modificado de Junqueira; Carneiro, 2023. Características histológicas do músculo esquelético: fibras grandes, longas e multinucleadas. Núcleos na periferia das células.

O músculo estriado esquelético é formado a partir de mioblastos, células progenitoras de origem mesodérmica que, a partir de fatores de transcrição Pax3 e Pax7 originam o músculo esquelético, que é formado por miofibrilas, células grandes, multinucleadas, compostas por sarcômeros e envolvidas pela matriz extracelular (Junqueira; Carneiro, 2023; Jacobson *et al.*, 2020). As células satélite são componentes do tecido muscular esquelético, correspondem às células progenitoras do tecido e são responsáveis por manter e regenerar o músculo. Essas células permanecem quiescentes em condições de homeostase e a regeneração

metabólica permite a ativação e proliferação dessas células, auxiliando na regeneração do tecido lesionado (Hong *et al.*, 2022).

O sarcômero que forma a fibra muscular é composto por uma região delimitada pela linha Z e por diversas proteínas, entre elas a G-actina (Figura 2), proteínas globulares que, em conjunto com outras proteínas, formam dois filamentos finos que interagem e se intercalam com os filamentos espessos de miosina II (Figura 3), proteína em forma de bastão formada por duas cadeias polipeptídicas entrelaçadas, com sítios específicos de reconhecimento da molécula adenosina trifosfato (ATP). O sarcômero da fibra muscular é formado pela banda I, somente com filamentos finos, a banda A, composta por filamentos espessos intercalados com filamentos finos, e banda H, somente com filamentos espessos (Junqueira; Carneiro, 2023) (Figura 4).

Figura 2 - Esquema da proteína G-actina



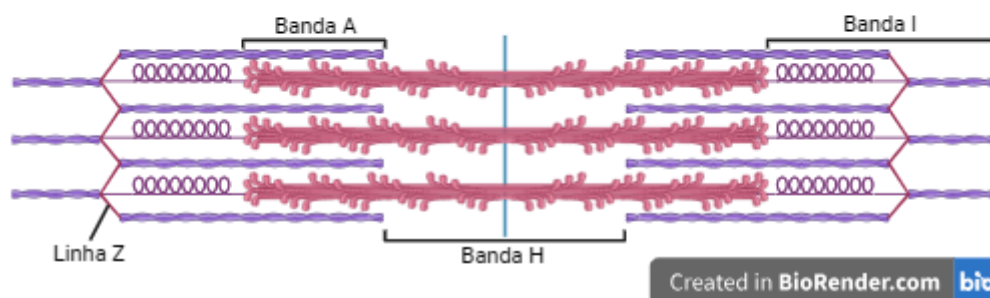
Fonte: Elaborado pelo autor, 2024. Proteína G-actina: formato globular, que se entrelaça com outras proteínas para formar os filamentos finos do sarcômero.

Figura 3 - Esquema da proteína miosina II



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024. Proteína miosina II: bastão formado pela união de duas cadeias polipeptídicas entrelaçadas e formam os filamentos espessos do sarcômero.

Figura 4 - Esquema do sarcômero da fibra muscular



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024. Esquema de sarcômero: banda I, composta por filamentos finos, banda A, composta por filamentos espessos intercalados com filamentos finos e banda H, composta por filamentos finos. O sarcômero é delimitado pela linha Z.

O músculo tríceps braquial, alvo do presente estudo, se localiza na parte posterior do braço, é o principal extensor das articulações do cotovelo e do ombro e um adutor auxiliar na articulação do ombro. É caracterizado por três cabeças: longa, lateral e medial, com origens em regiões diferentes e inserção comum no olécrano (Grzonkowska *et al.*, 2014). Esse músculo tem como característica a abundância de fibras do Tipo II, de contração rápida e com alta produção de ATP por via oxidativa (Sanchis-Moysi *et al.*, 2010).

1.2 Junção miotendínea

A junção miotendínea (JMT) é uma região complexa e altamente especializada que conecta as membranas sarcoplasmáticas do músculo estriado esquelético ao colágeno da matriz extracelular e tem como função principal a transmissão de força gerada pela contração, ou seja, transmissão da força gerada pelas proteínas contráteis intracelulares do músculo para as proteínas extracelulares do tendão (Ciena *et al.*, 2012).

A estrutura da JMT é composta por interdigitações, formadas por invaginações do tecido tendíneo e evaginações sarcoplasmáticas, que aumentam a superfície de contato entre o músculo e o tendão e, conseqüentemente, diminui o estresse, portanto facilita a transmissão de força de um tecido para o outro (Pimentel Neto *et al.*, 2022; Tong *et al.*, 2024).

Os fibroblastos da JMT são derivados do mesoderma lateral e expressam a proteína 1 de determinação de mioblastos (MyoD1), o que demonstra que fibroblastos se transformam em mioblastos e adquirem uma identidade dupla entre

os dois tecidos antes da fusão do tendão com o músculo esquelético (Yamamoto *et al.*, 2022).

Por estar fortemente associado ao aparato locomotor e transmissão de força, a JMT está suscetível a lesões, geralmente acompanhadas por lesão no músculo e/ou tendão, além de ter reparo espontâneo dificultado devido à sua estrutura especializada (Tong *et al.*, 2024).

Os sarcômeros da JMT são fundamentais na ancoragem dos tecidos e possuem duas denominações: o sarcômero distal é o último sarcômero da miofibrila e se fixa na lâmina basal da junção e na última linha Z, o sarcômero proximal é o penúltimo sarcômero da miofibrila (Grillo *et al.*, 2021).

1.3 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas celulares eucarióticas e tem como principal função a produção de energia, isto é, a produção de ATP por meio da fosforilação oxidativa via cadeia de transporte de elétrons (Hong *et al.*, 2022), além de controlar o crescimento e a morte celular.

As mitocôndrias são formadas por duas membranas, uma externa e outra interna e o enovelamento da membrana interna forma estruturas complexas, chamadas de cristas, com propriedades morfológicas e funcionais e proteínas da cadeia transportadora de elétrons, é nas cristas mitocondriais que se localiza a enzima ATP sintase, responsável pela produção da maior parte de ATP da célula (Alberts *et al.*, 2017; Chatzinikita *et al.*, 2023).

Além da produção de ATP, as mitocôndrias estão associadas com outros recursos celulares como a biossíntese e o crescimento celular. As mitocôndrias têm o papel de auxiliar na formação de moléculas de NADPH e moléculas ricas em carbono utilizadas nos processos de biossíntese (Alberts *et al.*, 2017).

A mitocôndria é uma das principais organelas atuantes no músculo esquelético por estar fortemente associada com a demanda energética da contração muscular, ocupa a maior parte do volume celular do tecido e não funciona sozinha, dependendo de interações com outras organelas e “droplets” de lipídio que aumentam sua capacidade funcional na conversão e distribuição de energia contrátil (Kim *et al.*, 2024).

As mitocôndrias do músculo esquelético convertem os macronutrientes ou seus derivados em ATP por meio da fosforilação oxidativa, onde a energia é convertida pelo sistema de transporte de elétrons. Esse sistema está localizado, principalmente, nas cristas mitocondriais, associado ao complexo de ATP sintase (Schytz *et al.*, 2023).

As mitocôndrias passam por remodelação para atender as demandas energéticas e de contração do músculo e se dispõem como facilitadoras na distribuição de energia, formando redes mitocondriais (Swalsingh *et al.*, 2022). Kim *et al.* (2024) demonstraram que a membrana externa da mitocôndria no músculo esquelético é especializada para resistir a demanda energética sem depender do conteúdo muscular, além disso, as mitocôndrias ligadas a “droplets” de lipídio possuem maior capacidade na conversão energética, já que podem ser especializadas para utilizar essa fonte de lipídios e distribuir a energia convertida pela rede mitocondrial.

As mitocôndrias, além da produção de ATP, estão envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos e estão envolvidas em funções celulares como a produção e sinalização das espécies reativas de oxigênio e a apoptose e, para isso, passam por modificações morfológicas por meio da fusão e fissão (Hong *et al.*, 2022).

Ainda que o papel das mitocôndrias no músculo esquelético seja bem descrito, a morfologia e a distribuição dessas organelas na junção miotendínea não são conhecidas. A junção miotendínea é uma região de extrema importância na transmissão de força do aparato locomotor, dessa forma, compreender como as mitocôndrias se organizam na interface é um conhecimento valioso como base para futuros estudos.

2 OBJETIVO GERAL

Descrever a morfologia mitocondrial na junção miotendínea do músculo tríceps braquial de ratos *Wistar* adultos e quantificar as variáveis de volume e densidade na região.

2.1 Objetivos específicos

- Apresentar a localização e organização das mitocôndrias na junção miotendínea;
- Descrever a forma das mitocôndrias na junção miotendínea;
- Quantificar a densidade das cristas mitocondriais na junção miotendínea;
- Determinar o volume mitocondrial na junção miotendínea nas fibras do Tipo I e II.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 5 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* adultos (60 dias) provenientes do Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu, SP e alocados no Biotério do Laboratório de Anatomia do Instituto de Biociências da UNESP - Campus Rio Claro, SP. Os animais foram instalados na mesma gaiola, receberam ração Purina® padrão e água livre “*ad libitum*”, foram mantidos em temperatura ambiente controlada à 23 °C ± 2 °C e períodos de 12h de claro e 12h de escuro. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (0984/2024) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista em Rio Claro.

3.2 Microscopia eletrônica de transmissão

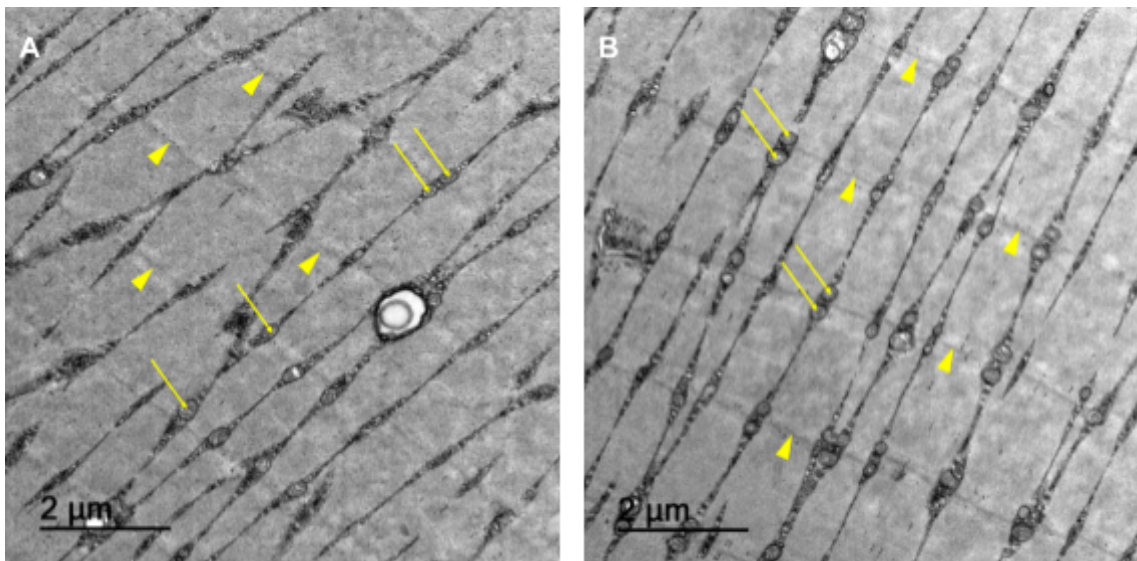
Os animais foram anestesiados utilizando Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) por administração intraperitoneal. Em seguida, perfundidos com solução fixadora Karnovsky modificada com 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em solução tampão fosfato de sódio 0,1M com pH 7,3. As amostras retiradas foram de JMT do músculo tríceps braquial, com dimensões de 3 mm³ e fixadas na mesma solução por 3 horas em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas e pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a 4 °C. Em seguida, as amostras foram incluídas em resina (Low Viscosity Embedding Media Spurr's Kit Electron Microscopy Sciences, USA) e feitos cortes ultrafinos de 90 nm, coletados em telas de cobre de 200 mesh. Os cortes foram contrastados utilizando soluções de acetato de uranila 4% e citrato de chumbo 0,4% (Ciena *et al.*, 2012). As amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL1010 no Laboratório de Microscopia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALq-USP) em Piracicaba, São Paulo.

Por meio da análise das imagens obtidas (ampliação 10.000X), foram realizadas medições do tamanho das mitocôndrias da JMT e do volume mitocondrial na JMT, descrevendo sua forma. Além disso, foi descrita a localização das mitocôndrias nos diferentes compartimentos do sarcômero: subsarcolemal, abaixo

do tecido conjuntivo que envolve as fibras musculares (sarcolema), externas às miofibrilas; e intermiofibrilar, ou seja, entre fibras musculares (Botella *et al.*, 2023).

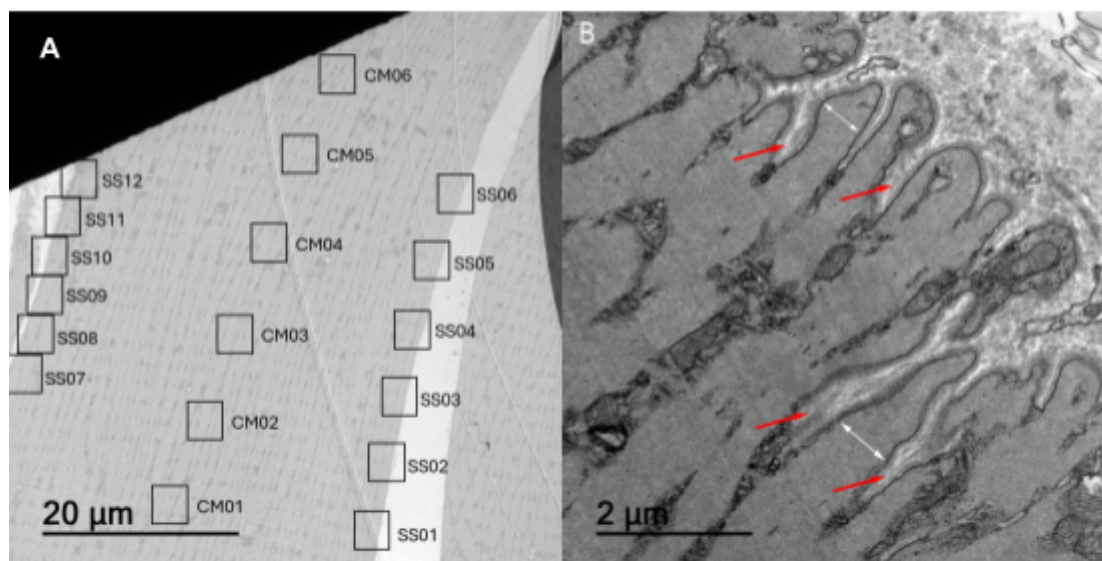
Foram analisadas 6 fibras musculares previamente identificadas por seus tipos (Figura 5) baseado em Nielsen *et al.* (2017), sendo Tipo I (n=2) e Tipo II (n=4). Os compartimentos da fibra foram divididos em pequenas porções, representando sua proximidade com a JMT. O compartimento intermiofibrilar (CM) foi dividido em 6 áreas, sendo CM01 a região mais distante da JMT e CM06 mais próxima da interface. O compartimento subsarcolemal também foi dividido em 6 áreas, no entanto, com 12 imagens diferentes, sendo SS01-SS06 referentes a um lado da fibra e SS07-SS12 a regiões correspondentes do outro lado da fibra. SS01 e SS07 são regiões mais distantes da JMT, SS06 e SS12, por sua vez, são regiões próximas da JMT (Figura 6).

Figura 5 - Organização dos sarcômeros nos diferentes tipos miofibrilares



Fonte: Elaborado pela autora, 2024. Disposição longitudinal dos sarcômeros em série nas fibras do Tipo I (A) e Tipo II (B). Com destaque para a disposição das mitocôndrias (setas) e linhas Z (cabeças de setas) (Ampliação: 10.000X).

Figura 6 - Determinação das áreas de investigação e ultraestrutura da junção miotendínea



Fonte: Elaborado pela autora, 2024. (A) Fibra do músculo tríceps braquial de rato *Wistar* adulto (60 dias) em microscopia eletrônica de transmissão (Ampliação: 1.500X), destaque das áreas de investigação. Compartimento subsarcolemal (SS) e compartimento intermiofibrilar (CM); (B) Destaque para as invaginações (setas vermelhas) e evaginações (setas duplas brancas) da fibra muscular (Ampliação: 12.000X).

3.3 Análise estatística

3.3.1 Morfologia mitocondrial

A morfologia mitocondrial foi avaliada por meio de mitocôndrias traçadas manualmente com o auxílio de descritores de forma do ImageJ® (Botella *et al.*, 2023), utilizando medidas de área, perímetro, circularidade, relação de aspecto (AR), redondeza e solidez. Sendo que AR diz respeito à relação entre largura e altura das mitocôndrias e as medidas de circularidade e redondeza são índices bidimensionais de esfericidade (Picard *et al.*, 2013). Dessa forma, mitocôndrias com valores mais próximos de 1 são mais esféricas.

3.3.2 Densidade das cristas mitocondriais

Para avaliar a estimativa da densidade das cristas mitocondriais (DC) foi utilizado o software ImageJ® e realizadas duas medidas. Com o grid 270x270 nm, examinou-se a área da superfície das cristas mitocondriais, contando as interseções das linhas do grid com as cristas. Por meio da contagem de pontos e grid 90x90 nm foi possível analisar o volume das mitocôndrias. A partir da fórmula estereológica:

$DC = (2 \times IL) / (P \times k/c)$, onde IL é a quantidade de interseções das linhas de teste com as cristas mitocondriais e P é a quantidade de pontos de teste nos perfis mitocondriais, k e c são constantes da fórmula e representam os grids utilizados, chegou-se às medidas de densidade de cristas mitocondriais ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-3}$) (Schytz *et al.*, 2023).

3.3.3 Volume mitocondrial

O volume mitocondrial foi avaliado como a quantidade de mitocôndrias nos diferentes compartimentos do sarcômero: subsarcolemal e intermiofibrilar. Para analisar cada um dos compartimentos foram utilizadas diferentes variáveis. O volume mitocondrial subsarcolemal (SS) ($\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$) foi medido como a quantidade de mitocôndrias presentes na área subsarcolemal. O volume mitocondrial intermiofibrilar (CM) ($\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-3}$) foi analisado por contagem de pontos no software ImageJ® utilizando um grid de 135 nm, a quantidade de pontos nas mitocôndrias foi dividida pela quantidade de linhas do grid. A partir do princípio de Cavalieri, onde a fração média da área (A_A) nas micrografias é igual a fração média de volume (V_V) nas fibras musculares, o volume mitocondrial médio foi derivado (Schytz *et al.*, 2023).

3.3.4 Análise de variância

Após avaliar as variáveis individualmente, foi realizada análise estatística de variância por meio do Teste t de Welch com o auxílio do software GraphPad Prism®, a fim de averiguar as diferenças de volume mitocondrial, densidade de cristas e morfologia mitocondrial não apenas entre os compartimentos da fibra muscular como também em relação à proximidade com a junção miotendínea em uma mesma fibra. Os valores foram apresentados como mediana e a significância estabelecida em $p < 0,05$.

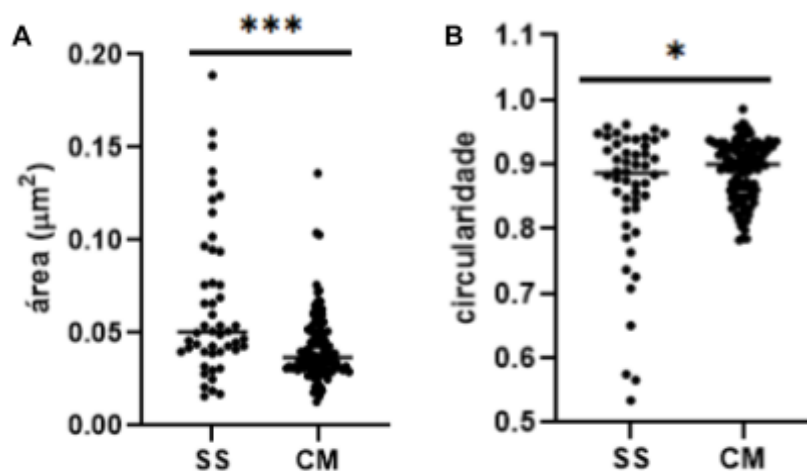
4 RESULTADOS

A partir das análises realizadas, foram obtidos os resultados das variáveis de morfologia mitocondrial, densidade das cristas mitocondriais e volume mitocondrial, apresentados a seguir:

4.1 Morfologia mitocondrial

As mitocôndrias intermiofibrilares das fibras do Tipo I são menores (área) e mais esféricas (circularidade) (Figura 7). As mitocôndrias subsarcolemais mais próximas da junção miotendínea nas fibras do Tipo II possuem perímetro maior que as mitocôndrias mais distantes (Figura 8). As mitocôndrias na região mais distante da JMT no compartimento intermiofibrilar das fibras do Tipo II apresentaram valores de circularidade mais próximos de 1 quando comparadas com mitocôndrias mais próximas da JMT ($p < 0,05$), ou seja, as mitocôndrias das regiões mais distantes são mais esféricas (Figura 9). A região intermiofibrilar mais próxima da JMT das fibras do Tipo I possui mitocôndrias mais esféricas que a mesma região das fibras do Tipo II (Figura 10). As mitocôndrias intermiofibrilares não apresentaram diferenças significativas de tamanho (área e perímetro) entre as regiões CM01 e CM06 no mesmo tipo de fibra (Figuras 11 e 12).

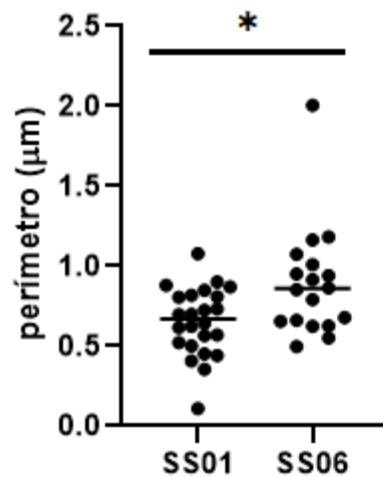
Figura 7 - Determinação da área e da circularidade das mitocôndrias das fibras do Tipo I



(A) Área das mitocôndrias das fibras do Tipo I, as mitocôndrias intermiofibrilares apresentam menor área que as mitocôndrias do compartimento subsarcolemal ($p = 0,0003$). (B)

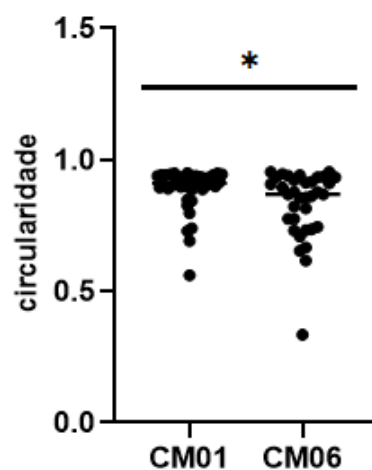
Circularidade das mitocôndrias das fibras do Tipo I, as mitocôndrias intermiofibrilares são mais esféricas que as mitocôndrias subsarcolemas ($p = 0,02$).

Figura 8 - Determinação do perímetro das mitocôndrias subsarcolemas das fibras do Tipo II



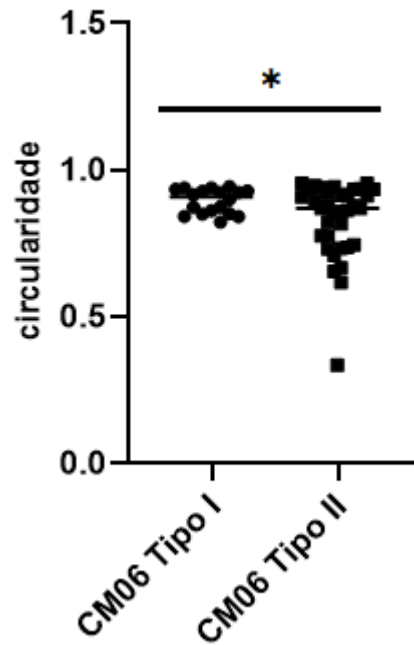
Perímetro das mitocôndrias subsarcolemas das fibras do Tipo II. As mitocôndrias na região mais próxima da JMT (SS06) possuem maior perímetro comparadas com as mitocôndrias da região mais distante (SS01) ($p = 0,01$).

Figura 9 - Determinação da circularidade das mitocôndrias intermiofibrilares nas fibras do Tipo II



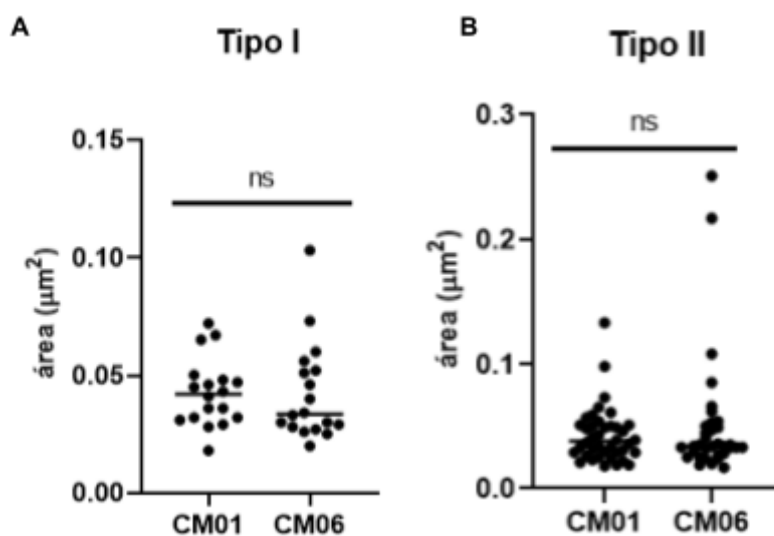
Circularidade das mitocôndrias intermiofibrilares das fibras do Tipo II. As mitocôndrias da região mais distante da JMT são mais esféricas que as mitocôndrias da região mais próxima da JMT ($p = 0,03$).

Figura 10 - Determinação da circularidade das mitocôndrias nos diferentes tipos miofibrilares.



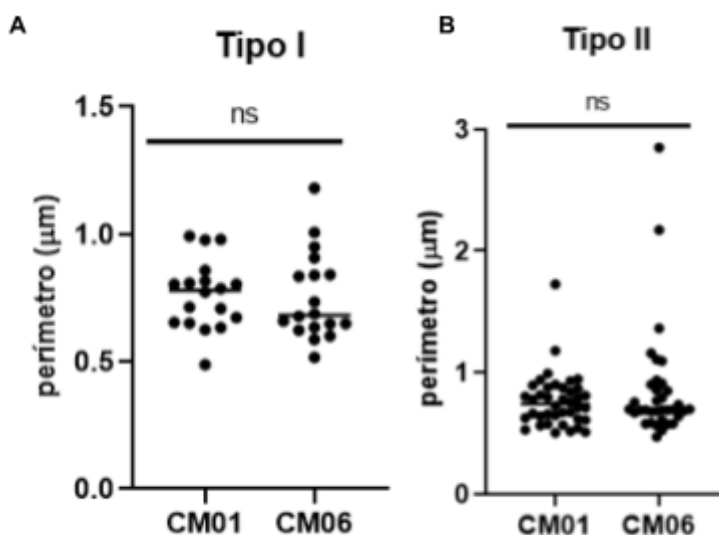
Circularidade das mitocôndrias intermiofibrilares da região mais próxima da JMT entre os diferentes tipos de fibras. As mitocôndrias das fibras do Tipo I são mais esféricas que as mitocôndrias das fibras do Tipo II ($p = 0,01$).

Figura 11 - Determinação da área das mitocôndrias intermiofibrilares nos diferentes tipos de fibras



Área das mitocôndrias intermiofibrilares nas: (A) fibras do Tipo I e (B) fibras do Tipo II. Nos dois tipos, não houve diferença significativa entre as regiões próximas e distantes da JMT. Não houve diferença significativa entre os tipos de fibra (ns).

Figura - 12 Determinação do perímetro das mitocôndrias intermiofibrilares nos diferentes tipos de fibras

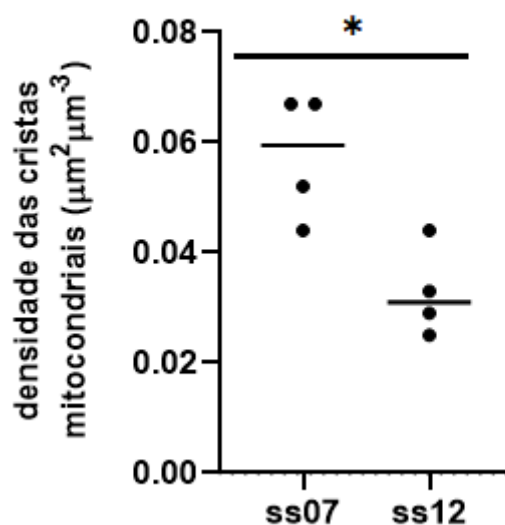


Perímetro das mitocôndrias intermiofibrilares nas: (A) fibras do Tipo I e (B) fibras do Tipo II. Não houve diferença significativa entre as mitocôndrias das regiões mais próximas e mais distantes da JMT (ns).

4.2 Densidade das cristas mitocondriais

As fibras apresentam diferenças na densidade de cristas em seu comprimento. As mitocôndrias subsarcolemais da região mais distante da junção miotendínea das fibras Tipo II possuem maior densidade de cristas mitocondriais quando comparadas com as mitocôndrias da porção mais próxima da JMT ($p < 0,05$) (Figura 13).

Figura 13 - Determinação da densidade das cristas mitocondriais subsarcolemais das fibras do Tipo II

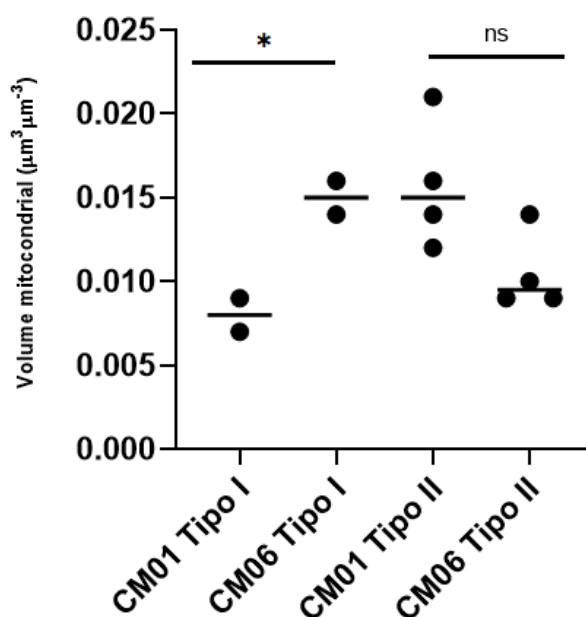


Densidade das cristas mitocondriais subsarcolemais das fibras do Tipo II (n=4). As mitocôndrias da região distante da JMT (SS07) apresentam maior densidade ($p = 0,01$) comparadas com as mitocôndrias da região mais próxima (SS12).

4.3 Volume mitocondrial

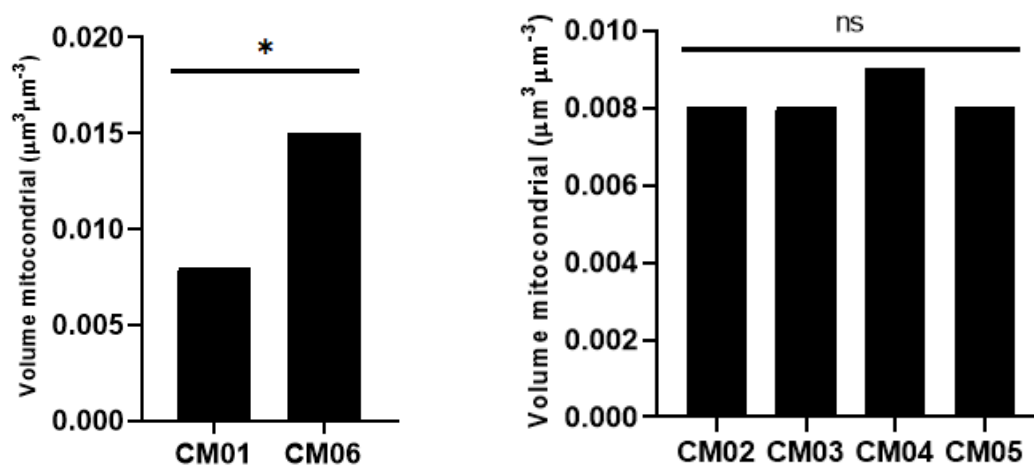
Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) no volume mitocondrial intermiofibrilar ao longo das fibras do Tipo I, a região proximal da JMT (CM06) possui maior volume de mitocôndrias comparada com a porção distal da JMT (Figura 14). Os dados individuais do compartimento intermiofibrilar das fibras do Tipo I sugerem a variação de volume entre as regiões proximal e distal da JMT. No entanto, as regiões intermediárias não possuem grandes diferenças e podem ocultar a variação quando analisadas em conjunto (Figura 15). O volume subsarcolemal apresentou diferenças nos tipos de fibra, as fibras do Tipo II possuem maior volume mitocondrial subsarcolemal ($p < 0,05$) quando comparadas com a mesma região das fibras do Tipo I (Figura 16).

Figura 14 - Determinação do volume mitocondrial intermiofibrilar dos diferentes tipos de fibra



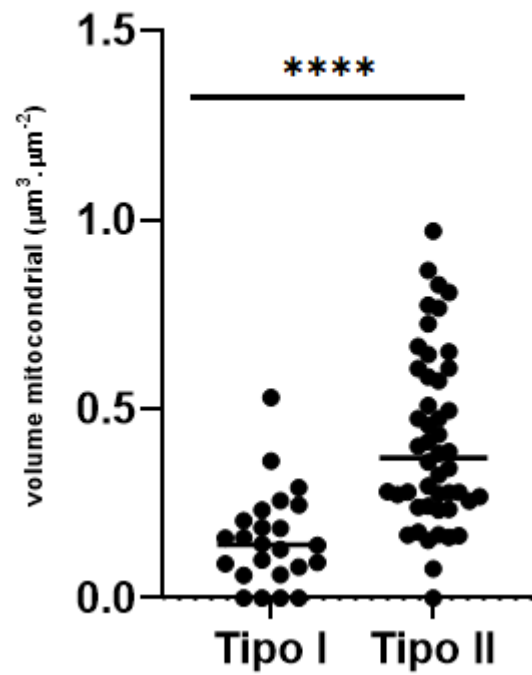
Volume mitocondrial intermiofibrilar dos diferentes tipos de fibra. Comparação entre a região mais distante (CM01) e mais próxima (CM06) da JMT das fibras do Tipo I mostram maior volume mitocondrial na região próxima ($p = 0,03$).

Figura 15 - Determinação do volume mitocondrial intermiofibrilar das fibras do Tipo I



Volume mitocondrial intermiofibrilar das fibras do Tipo I ($n=2$). Os valores de CM01 e CM06 apresentam diferenças significativas ($p=0,03$). Os valores intermediários, por sua vez, não apresentam as mesmas diferenças (ns).

Figura 16 - Determinação do volume mitocondrial subsarcolemal dos diferentes tipos de fibra.



Volume mitocondrial subsarcolemal dos diferentes tipos de fibra. O compartimento subsarcolemal das fibras do Tipo II possuem maior volume mitocondrial comparado ao mesmo compartimento das fibras do Tipo I ($p = 0,0001$).

5 DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos foi analisada e revelada pela primeira vez a organização, localização e morfologia das mitocôndrias na região da junção miotendínea.

No estudo de Botella *et al.* (2023), concluiu-se que as mitocôndrias subsarcolemas das fibras dos tipos I e II são maiores e menos esféricas que as mitocôndrias intermiofibrilares. Di Leo *et al.* (2023), no entanto, concluíram que as mitocôndrias subsarcolemas são mais esféricas que as mitocôndrias intermiofibrilares. Na JMT foi observado que as mitocôndrias subsarcolemas são maiores e menos esféricas que as mitocôndrias intermiofibrilares, mas apenas nas fibras do Tipo I. A morfologia mitocondrial pode variar nos diferentes músculos, além de variar entre o ventre e a JMT. A morfologia das mitocôndrias pode estar associada às funções metabólicas das organelas, com mitocôndrias maiores apresentando maior capacidade de produção de ATP (Di Leo *et al.*, 2023).

Indivíduos ativos fisicamente apresentam maior densidade de cristas mitocondriais quando comparados com indivíduos sedentários, além disso, as diferenças na fosforilação oxidativa entre os indivíduos treinados e sedentários estão associadas ao volume mitocondrial e a densidade das cristas mitocondriais (Schytz *et al.*, 2023). Indivíduos submetidos a exercícios de resistência apresentam maior densidade de cristas mitocondriais nas fibras do Tipo I (Smith *et al.*, 2023). Apresentamos que a densidade das cristas mitocondriais na região da JMT pode apresentar diferenças significativas nos dois compartimentos musculares em relação à proximidade com a interface, independentemente da atividade física.

No ventre muscular, o volume mitocondrial intermiofibrilar é maior em fibras do Tipo I, onde as mitocôndrias se organizam em pares (Nielsen *et al.*, 2017; Botella *et al.*, 2023). No presente estudo, mostramos que na região da JMT o volume mitocondrial intermiofibrilar não apresenta diferenças significativas entre os tipos de fibras, no entanto, as mitocôndrias se organizam em pares nas fibras do Tipo II.

Na junção miotendínea, assim como no ventre muscular, a maioria das mitocôndrias foram localizadas no compartimento intermiofibrilar, essa posição está associada com a função das mitocôndrias intermiofibrilares como vias bioquímicas relacionadas à contração muscular (Cisterna *et al.*, 2023).

Botella e colaboradores (2023) revelaram em seu estudo com atletas de força e indivíduos não treinados, a diferença no volume mitocondrial subsarcolemal nas fibras do Tipo I de atletas, mas não o mesmo no Tipo II. No presente estudo revelamos que na junção miotendínea, o volume subsarcolemal das fibras do Tipo II é maior que o volume mitocondrial subsarcolemal das fibras do Tipo I.

Ainda que estudos destaquem a organização das mitocôndrias nos músculos nos diferentes compartimentos, revelamos pela primeira vez a morfologia, a variação na densidade de cristas mitocondriais e no volume mitocondrial ao longo dos compartimentos do sarcômero em relação à proximidade da junção miotendínea. Revelamos que a organização das mitocôndrias apesar de diferenciarem-se nas extremidades mais próxima e mais distante da JMT, a variação pode ser ocultada quando os valores são analisados em conjunto.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que a morfologia e a localização das mitocôndrias na região de interface entre o músculo e o tendão variam nos diferentes tipos de fibras musculares, nos diferentes compartimentos do sarcômero de um mesmo tipo miofibrilar e em relação a proximidade com a JMT. Revelamos pela primeira vez que a morfologia mitocondrial é particular em uma região altamente especializada de transmissão de força e dependente de alta demanda energética. A pesquisa é um estudo inicial e aponta a necessidade de futuros estudos sobre a morfologia mitocondrial na região da junção miotendínea.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. Tradução de Ardala Elisa Breda Andrade *et al.* 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BOTELLA, J. *et al.* Increased mitochondrial surface area and cristae density in the skeletal muscle of strength athletes. **Journal of Physiology**, v. 601, n. 14, p. 2899-2915, 2023.
- CIENA, A. P. *et al.* Ultrastructural features of the myotendinous junction of the sternomastoid muscle in *Wistar* rats: from newborn to aging. **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 9, p. 1292-1296, 2012.
- CISTERNA, B. *et al.* Aged gastrocnemius muscle of mice positively responds to a late onset adapted physical training. **Cell and Developmental Biology**, v. 11, 2023.
- CHATZINIKITA, E. *et al.* The role of mitophagy in skeletal muscle damage and regeneration. **Cells**, v. 12, n. 716, 2023.
- DI LEO, V; GOMES, T. M. B.; VINCENT, A. E. Interactions of mitochondrial and skeletal muscle biology in mitochondrial myopathy. **Biochemical Journal**, v. 480, n. 21, 2023.
- GRZONKOWSKA, M. *et al.* Growth Dynamics of the Triceps Brachii Muscle in the Human Fetus. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 2, p. 177-184, 2014.
- GRILLO, B. A. C. *et al.* Myotendinous junction components of different skeletal muscles present morphological changes in obese rats. **Microscopy and Microanalysis**, v. 27, n. 5, p. 598-603, 2021.
- HONG, X. *et al.* Mitochondrial dynamics maintain muscle stem cell regenerative competence throughout adult life by regulating metabolism and mitophagy. **Cell Stem Cell**, v. 29, p. 1298-1314, 2022.
- JACOBSON, K. *et al.* Comparative analysis of the extracellular matrix proteome across the myotendinous junction. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 10, p. 3955-3967, 2020.
- JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.
- KIM, Y. *et al.* Reorganization of mitochondria-organelle interactions during postnatal development in skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 602, n. 5, p. 891-912, 2024.
- NIELSEN, J. *et al.* Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 9, p. 2839-2847, 2017.

PICARD, M. *et al.* Acute exercise remodels mitochondrial membrane interactions in mouse skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, v. 115, n. 10, p. 1562-1571, 2013.

PIMENTEL NETO, J. *et al.* Myotendinous junction: exercise protocols can positively influence their development in rats. *Biomedicines*, v. 10, n. 480, p. 1-13, 2022.

SANCHÍS-MOYSI, J. *et al.* The upper extremity of the professional tennis player: muscle volumes, fiber-type distribution and muscle strength. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 20, n. 3, p. 524-534, 2010.

SCHYTZ, C. T. *et al.* Skeletal muscle mitochondria demonstrate similar respiration per cristae surface area independent of training status and sex in healthy humans. *Journal of Physiology*, v. 602, n. 1, p. 129-151, 2023

SMITH, J. A. B.; DYAR, K. A.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and adaptation in skeletal muscle. **Natural Reviews Molecular Cell Biology**, v. 607, n. 24, p. 607-632, 2023.

SWALSINGH G. *et al.* Structural functionality of skeletal muscle mitochondria and its correlation with metabolic diseases. *Clinical Science*, v. 136, n. 24, p. 1851-1871, 2022.

TONG, S. *et al.* A comprehensive review of muscle-tendon junction: structure, function, injury and repair. *Biomedicines*, v. 12, n. 423, p. 1-15, 2024.

YAMAMOTO, M. *et al.* Development and regeneration of muscle, tendon, and myotendinous junctions in striated skeletal muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 6, 2022.‘