
EDUCAÇÃO FÍSICA

MARIANA BAPTISTA

**ANÁLISES MORFOQUANTITATIVAS DE AVALIAÇÃO
DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR**



Rio Claro - SP
2022

MARIANA BAPTISTA

ANÁLISES MORFOQUANTITATIVAS DE AVALIAÇÃO DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

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 Bacharela em Educação Física.

Orientadora: Ma. Lara Caetano Rocha Braga
Coorientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Rio Claro - SP
2022

B222a Baptista, Mariana
Análises morfoquantitativas de avaliação da junção neuromuscular / Mariana Baptista. -- Rio Claro, 2022 26 f.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Educação Física) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Lara Caetano Rocha Braga
Coorientador: Adriano Polican Ciena

1. Junção Neuromuscular. 2. Morfologia. 3. Educação Física. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

MARIANA BAPTISTA

ANÁLISES MORFOQUANTITATIVAS DE AVALIAÇÃO DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

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 Bacharela em Educação Física.

BANCA EXAMINADORA:

Ma. Lara Caetano Rocha Braga
Prof. Dr. Adriano Polican Ciena
Me. Jurandyr Pimentel Neto
Ma. Carolina dos Santos Jacob

Aprovado em: 09 de novembro de 2022



Mariana Baptista



Ma. Lara Caetano Rocha Braga



Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Dedico esta monografia à minha querida mãe Sandra (in memoriam), guerreira do início ao fim, que me permitiu ter sonhos e concretizá-los. Aqui estão os resultados dos seus esforços.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos, pois acredito que a ciência pode andar junta com a fé, sem perdermos nossos valores.

A minha família, por todo suporte emocional e que me incentivaram nos momentos difíceis. Mesmo de longe, nunca deixaram de cuidar de mim e é por causa deles que eu estou aqui. Sou imensamente grata pela nossa conexão e espero que eu possa transmitir ao mundo o amor que recebi dentro do meu lar.

Aos meus amigos, por fazer com que esta experiência tenha sido ainda melhor. Em especial, à República Só Fadinhas que me recebeu em Rio Claro, se tornando minha segunda família e me permitindo conhecer pessoas maravilhosas.

À minha orientadora Lara Caetano Rocha Braga, por ser uma mulher incrível, e ter me ajudado do início ao fim, com delicadeza, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo dessa experiência.

Ao de Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LMAF), por todo ensinamento e estrutura fornecida para que eu pudesse realizar os meus estudos e à instituição de ensino Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, participando direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

RESUMO

A Junção Neuromuscular (JNM) é a região entre o terminal axonal e a fibra muscular, gerando respostas mecânicas, como a contração muscular. Constituída pela região pré-sináptica, fenda sináptica e a região pós-sináptica - regiões onde ocorrem a transdução do sinal elétrico em químico. A JNM pode sofrer alterações decorrentes de diferentes influências, como a obesidade (comorbidade causada pelo excesso de tecido adiposo), patologias - entre elas a distrofia muscular -, exercício físico e o envelhecimento, sendo de extrema relevância a avaliação destas adaptações da JNM perante estes estímulos internos e externos. Desse modo, o objetivo do estudo foi avaliar as formas de mensurações morfoquantitativas da JNM e de suas regiões pré-sináptica e pós-sinápticas. Desta forma o presente estudo investiga qual a técnica microscópica e metodologias de mensuração apresentam maior eficiência para elucidação das adaptações da JNM e quais suas limitações. Este estudo realizou uma análise prática de mensurações da região pós-sináptica da JNM juntamente com uma análise de relato/discursiva das mensurações. Com base para a avaliação foram utilizados artigos científicos e estudos em plataformas de base de dados como: PubMed, Scopus e Google Scholar, por meio das técnicas de mensuração. Foi utilizado o acervo de imagens das fendas pós-sinápticas de ratos *Wistar*, fornecidas pelo Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LMAF), com aprovação pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA). As técnicas de mensuração foram realizadas por meio das metodologias semi-automatizadas e manuais, medindo variáveis como perímetro total e corado, área total e corada, dispersão, número de clusters, diâmetro, quantidade cluster/area, index de fragmentação, quantidade JNM e densidade integrada. Apesar de ambos os métodos serem de suma importância, a metodologia semi-automatizada se apresentou como mais coerente, pelo fato de padronizar as mensurações até a geração das medidas. Além disso, o método acompanha um material de apoio, que instrui a forma de mensurar, e uma tabela que auxilia na compreensão dos resultados.

Palavras-chave: Junção neuromuscular, terminal axonal, componente pré-sináptico, componente pós-sináptico.

ABSTRACT

The Neuromuscular Junction (NMJ) is the region between the axon terminal and the muscle fiber, generating mechanical responses, such as muscle contraction. Consisting of the presynaptic region, synaptic cleft and the postsynaptic region - regions where an electrical signal is transduced into chemical. The disease can undergo changes after changes in stimuli, such as NMJ muscle disease - due to the exercise of excess tissue to pregnancy after obesity, - among the problems resulting from the evaluation of different stimuli, being from NMJ aging, excess exercises of weight, calculated to them, being the evolution of the dystrophy of the NMJ. internal and external. Thus, the objective of the study was to evaluate the forms of morphoquantitative measurements of the NMJ and postsynaptic region. From these techniques and larger measurement investigations were obtained to elucidate the form of which the NMJ and its major techniques. This study of a practical analysis of post-analysis measurements from NMJ experiments in analysis of a reporting analysis of measurements. As a basis for evaluation, articles and studies were used in scientific database platforms such as: PubMed, Scopus and Google Scholar, through measurement techniques. It was the image collection of the postsynaptic clefts used by Wistar, provided by the Morphology and Physical Activity Laboratory (LAMAF), with approval by the Animal Use Ethics Committee (CEUA). As measurement techniques were performed through semi-automated and manual methodologies, measuring as parameters such as total and stained perimeters, total area, dispersion, number of clusters, quantity, cluster/area, fragmentation index, NMJ quantity and integrated density. Although both methods are of paramount importance, the semi-automated methodology is presented as more coherent, as it standardizes the measurements until the measurements are generated. In addition, the method comes with support material, which instructs the measurement method, and a table that helps in understanding the results.

Keywords: Neuromuscular junction, axon terminal, presynaptic component, postsynaptic component.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Justificativa.....	6
2. OBJETIVO.....	7
3. METODOLOGIA.....	8
3.1 Acervo de imagens	8
3.2 Análises morfoquantitativas	9
4. DESENVOLVIMENTO	11
4.1 Revisão bibliográfica.....	11
4.2 Mensurações	11
5. DISCUSSÃO	14
6. CONCLUSÃO.....	16
REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

A Junção neuromuscular (JNM) é a região de contato entre os terminais de axônios motores (sistema nervoso periférico) e as placas motoras das fibras musculares, responsável pela transdução da contração muscular. Sua ação motora efetua-se desde o sistema nervoso central (SNC), nas áreas relacionadas à motricidade, mais especificamente no giro pós-central, em que cada neurônio motor possui um axônio que se estende até um grupo de fibras musculares esqueléticas. Ao se acoplar ao sarcolema das fibras musculares produz a transdução da sinapse elétrica em sinapse química, através dos neurotransmissores de acetilcolina (ACh) (MONTENEGRO; JERÔNIMO, 2018).

A JNM é composta por três locais específicos: a região pré-sináptica, a fenda sináptica e a região pós-sináptica. A região pré-sináptica é o local que antecede a transdução do sinal químico, é formada pelo botão sináptico (dilatação terminal do axônio), e possui a função de liberação das vesículas de ACh na fenda sináptica. A região terminal do axônio é revestida por uma célula de Schwann perissinápticas - ou célula perissináptica - a fim de aumentar a velocidade em que o potencial de ação atinge a região, além de neutralizar os efeitos negativos da atividade muscular na manutenção do nervo periférico (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2020).

As células de Schwann perissinápticas desempenham um papel ativo no desenvolvimento da JNM, e em sua manutenção e remodelação na vida adulta, através do aumento de sua densidade previamente ao período de amadurecimento sináptico, e desta forma desempenha um papel de orientação durante a inervação do axônio. A falta das células de Schwann pode induzir uma perda completa de sinapses durante o desenvolvimento ou determinar limitações pré-sinápticas e pós-sinápticos no desenvolvimento da JNM (KOIRALA et al., 2003).

A fenda sináptica, desta forma, é o espaço entre as membranas das células - especificamente o terminal do axônio motor e o sarcolema da fibra muscular - onde estão localizados os receptores de ACh (AChR), que dão início ao processo de sinapse química (KRAUSE NETO et al., 2015). Nesta região é determinada a zona ativa, local formado por canais de cálcio que quando ativos servem de estímulo para a neurotransmissão (NISHIMUNE; SHIGEMOTO, 2018). Funcionalmente, a zona ativa também garante o alinhamento preciso dos sítios de liberação das vesículas

sinápticas com os receptores AMPA pós-sinápticos agrupados, potencialmente através de moléculas de adesão sináptica, para transferência de informações entre duas células (BIEDERER et al., 2017).

As fibras musculares em humanos são caracterizadas por sua velocidade de contração ou velocidade metabólica, dividida em três tipos: Tipo I (contração lenta e oxidativa), tipo IIA (contração rápida e oxidativa-glicolítica) e tipo IIB (contração rápida e glicolítica) (PIMENTEL NETO et al., 2021).

O tecido musculoesquelético demanda de inervação para que ocorra a contração de suas fibras musculares, e desta forma realizar a produção de movimentos, quais previnem diferentes efeitos de redução de sua massa, como a atrofia muscular por desuso ou envelhecimento. As características morfológicas da JNM são determinadas pela frequência de descarga do neurônio motor, e pelo tipo miofibrilar innervado. As JNM das fibras musculares do Tipo I possuem um terminal axonal curto e um formato oval. As fibras do Tipo IIA possuem um terminal axonal 2,5 vezes mais abundante que as fibras do tipo I e têm formato elíptico. As fibras do tipo IIB possuem um axônio terminal maior que as fibras do tipo IIA, formato oval e maior extensão de sua área (ROCHA et al., 2020).

As fibras do Tipo I possuem a capacidade de contração lenta, são innervadas por neurônios motores frequentemente ativos em baixas frequências, possuem velocidades de condução lentas, produção de energia aeróbica e podem sustentar a tensão por períodos mais longos. As fibras do Tipo II possuem a capacidade de contração rápida disparam em alta frequência, têm velocidades de condução rápidas, mas podem manter a tensão apenas por curtos períodos e seus subtipos de fibras diferem no metabolismo energético (SEENE et al., 2017).

Por fim, a região pós-sináptica é formada pela membrana sarcoplasmática que recebe os estímulos através dos AChR. Formada pelo sarcolema pós-juncional da fibra muscular, esta região é fundamental para o suporte estrutural e metabólico da JNM. Além disso, é neste local que ocorre a despolarização dos túbulos T da fibra muscular, ativando a liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático, dando início ao processo de contração muscular (LI et al., 2018).

Responsável pela mobilidade, a JNM é suscetível a adaptações, assim como o corpo humano por completo. Associadas ao volume do estímulo, as adaptações repercutem no aumento de sua área promovendo maior capacidade de contração

muscular. Assim como estas podem ser positivas, a ausência de estímulos pode promover malefícios a JNM, tanto internos quanto externos (YAN et al., 2011).

Internamente, indivíduos que levam uma vida sedentária, podem desencadear uma série de comorbidades, dentre elas a obesidade. A obesidade decorre do acúmulo de tecido adiposo e inflamação, promovendo a redução da área de secção transversa, do número de núcleos e capilares por fibra muscular, além de induzir aumento do tecido conjuntivo, que repercute em adaptações na JNM (SINGH et al., 2017). Qualquer alteração morfológica na JNM e/ou comunicação na placa terminal motora pode resultar em comunicação prejudicada entre o sistema nervoso periférico e o sistema musculoesquelético, impedindo a ação correta de excitação-contração, causando declínio na contratilidade muscular e falha na transmissão neuromuscular (BOARETTO et al., 2020).

Externamente, em casos de lesões, como a distrofia muscular (DM), estas podem comprometer a JNM. A DM engloba um grupo de distúrbios que apresentam fraqueza muscular esquelética, alterações musculares histológicas peculiares e consistem em arquitetura muscular anormal com perda de tecido muscular (FALSAPERLA et al., 2016).

Assim como as sinapses no sistema nervoso central (SNC), a JNM representa um local de patologia primária em muitas condições neurológicas, incluindo miastenia gravis - doença autoimune caracterizada por afetar a comunicação entre os nervos e os músculos, produzindo episódios de fraqueza muscular- e distúrbios relacionados, síndromes miastênicas congênitas e doenças do neurônio motor, como amiotrófica lateral esclerose e atrofia muscular espinhal (JONES et al., 2016).

Além das doenças apresentadas, há também a recorrência da sarcopenia, um processo multifatorial caracterizado por alterações morfológicas, fisiológicas e funcionais em todo o sistema neuromuscular relacionadas a idade (GILLON et al., 2018), aumentando o risco de incapacidade, fragilidade e mortalidade dos seres humanos e diminuindo a mobilidade. De acordo com a literatura, a fragmentação da JNM precede o início da sarcopenia no envelhecimento (DESCHENES et al., 2011).

O envelhecimento representa uma deterioração fisiológica e progressiva dos processos homeostáticos de todo o organismo e é amplamente definido como o declínio funcional dependente do tempo que afeta a maioria dos organismos vivos.

Os denominadores comuns do envelhecimento em diferentes organismos incluem instabilidade genômica, desgaste dos telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteases, detecção de nutrientes desregulada, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada (LEPORE et al., 2019).

Em suma, a sinalização na JNM do neurônio motor para o músculo, bem como do músculo para o terminal nervoso pré-sináptico, é importante para o desenvolvimento, reparo e manutenção da integridade neuromuscular (CHITRA et al., 2021), principalmente por meio da atividade física.

A fim de promover alterações positivas na JNM, a atividade física influencia a plasticidade motora da placa terminal, evitando a denervação de fibras musculares, para assim atuar na longevidade do indivíduo, gerando uma melhor qualidade de vida (NISHIMUNE et al., 2014). Exercícios físicos como o alongamento estático, previnem lesões musculares e aumentam a amplitude de movimento articular na prática (BEHM et al., 2015).

1.1 Justificativa

A JNM é de suma importância para o aparelho locomotor devido sua função na transdução da sinapse entre o SNP ao tecido muscular. Com a ausência desta importante estrutura, a região terminal de comunicação, não seria possível realizar a contração muscular, essencial para a mobilidade. O movimento é fundamental para o ser humano, desde atividades do cotidiano até exercícios físicos, esportes e melhora da qualidade de vida.

Estudos dessa região possibilitam a sua compreensão, podendo influenciar funcionalmente o aparelho locomotor a partir de adaptações de estímulos internos e externos. A partir do exercício físico, as adaptações estimulam o aumento da contração muscular, assim como o sedentarismo pode acarretar consequências proporcionalmente inversas, como redução dos sinais elétricos e químicos.

É necessário compreender a morfologia da JNM e suas repercussões ao aparelho locomotor, para proporcionar melhorias no desenvolvimento dos movimentos, bem como na produção de força, de grande importância para idosos e atletas.

Diante das novas metodologias e ferramentas para identificação estrutural e molecular dos componentes da JNM foram destacados os principais softwares e métodos para a aplicação nas análises morfoquantitativas dessa região relacionadas a diferentes protocolos.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as formas de mensurações morfoquantitativas da JNM e de suas regiões pós-sinápticas. Desta forma investigou quais técnicas microscópicas e metodologias de mensuração apresentam maior eficiência para elucidação das adaptações da JNM e quais suas limitações. Portanto, elaborou uma análise discursiva para aprimoramento das técnicas.

3. METODOLOGIA

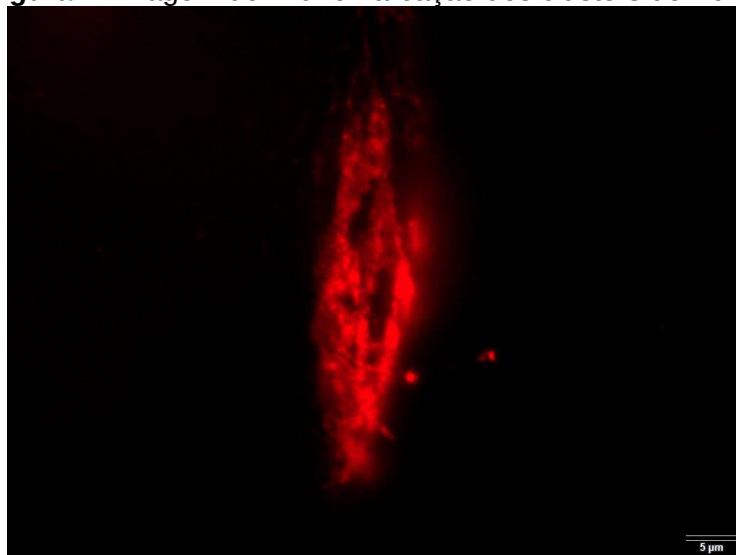
Este estudo realizou uma análise prática de mensurações da região pós-sináptica da JNM juntamente com uma análise de relato/discursiva das mensurações.

3.1 Acervo de imagens

Foram utilizadas imagens da fenda pós-sináptica da JNM, provenientes do acervo de imagens do Laboratório de Morfologia e Atividade Física (LAMAF - Unesp Rio Claro - SP, coordenado pelo Prof. Dr. Adriano Polican Ciena). As imagens foram oriundas de pesquisas realizadas com animais de experimentação (Ratos *Wistar*, *Rattus norvegicus*), com aprovação da Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA nº1096/2021) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro-SP.

As imagens (n=10) foram obtidas através da técnica de imunomarcacão com o anticorpo primário α -bungarotoxina (fenda pós-sináptica) disponibilizadas pelo grupo, fotografadas através do Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro/ SP, Brasil.

Figura 1. Imagem de imunomarcacão dos clusters de AchR.



Fonte: Acervo de imagens LAMAF (2022). Barra: 5 μ m.

3.2 Análises morfoquantitativas

Foram aplicadas metodologias de mensuração (morfometrias) da região pós-sináptica da JNM em metodologias manuais e semiautomatizadas (Tabela 1) de quantificação das variáveis apresentadas na Tabela 2, através do software ImageJ (National Institutes of Health - NIH).

Tabela 1. Diferenças entre as metodologias aplicadas através do software ImageJ.

Referência	Metodologia
Deschenes et al. (2016)	Manual
Jones et al. (2016)	Semiautomatizado
Pimentel Neto et al. (2021)	Semiautomatizado

Elaborado pela autora.

As metodologias foram selecionadas sendo as mais citadas nos artigos científicos das bases de dados como: PubMed, Scopus e Google Scholar, após a busca se utilizando de termos como: *neuromuscular junction*, *endplate*, *presynaptic*, *postsynaptic*, *stained area*, *morphometry*, publicados entre os anos de 2010 a 2021.

Foram utilizados como critério artigos científicos que abordaram como assunto e protocolo somente modelo experimental de ratos e/ou camundongos; aplicação de protocolos de atividade física; e/ou assuntos relacionados ao desenvolvimento, envelhecimento, lesões, patologias e outras associações a prática de exercício físico e a JNM; e que utilizem imagens de imunomarcção da região pós-sináptica.

As variáveis de regiões equivalentes foram analisadas estatisticamente no software Graph Pad Prism 8.0 ® através do teste de Welch's T test, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Tabela 2. Variáveis de morfometria da região pós-sináptica, e referências de mensuração utilizadas.

Variáveis	Referência		
	Deschenes et al. (2016)	Jones et al. (2016)	Pimentel Neto. (2021)
Área total (μm^2)	X	X	X
Área corada (μm^2)	X	X	X
Perímetro total (μm)	X	X	X
Perímetro corado (μm)	X	X	X
Diâmetro (μm)		X	X
Dispersão (%)	X	Compactividade	X
Número de cluster		X	
Quantidade cluster/área		X	
Index de fragmentação		X	
Quantidade JNM			X
Densidade integrada			X

Elaborado pela autora. A demarcação (X) representa variáveis equivalentes mensuradas por ambos os métodos.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Revisão bibliográfica

Com base para a avaliação foram utilizados artigos científicos e estudos em plataformas de base de dados como: PubMed, Scopus e Google Scholar. De acordo com esta literatura, é amplo o campo de mensurações para avaliar a JNM.

Primeiramente, Deschenes et al., (2016), utiliza o método manual no software ImageJ, mensurando variáveis como perímetro e área total e corada. Gillon et al. (2018) e Rocha et al. (2020) também utilizam do mesmo método com a inserção de novas variáveis, entre elas a dispersão.

Segundo, na metodologia de Jones et al., (2016), o autor utiliza a técnica automática padronizada para facilitar a análise morfométrica comparativa de sinapses, delimitando em '*variáveis principais*', como a área e perímetro do terminal nervoso, e '*variáveis derivadas*' como ramos de comprimento médios (variáveis de pouca relevância para este estudo). A dispersão também é uma variável analisada, porém é renomeada com compactividade.

Barbosa et al. (2021) e Jacob et al. (2022) também utilizam o método de Jones, nas seguintes variáveis em comum: diâmetro da placa terminal, área e perímetro dos AchR, área e perímetro da placa terminal e número de *clusters* de AchR. Pimentel et al. (2021), por sua vez, também utiliza o método de Jones (2016) adaptado, porém analisando novas variáveis, entre elas a quantidade de JNM e a densidade integrada, qual é a soma de todas as intensidades de pixels da imagem.

4.2 Mensurações

Através das imagens de imunomarcações do acervo, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 3, seguindo as metodologias referenciadas.

Na região pós-sináptica, a área total apresentou maior valor quando mensurado de forma manual seguindo a metodologia de Deschenes et al. (2016), quando comparado ao método usado por Jones et al. (2016) que apresentou menor valor (sem significância estatística). Também apresentaram maior valor na metodologia de

Deschenes (2016) a área corada, dispersão e número de clusters, sendo que esta última variável apresentou significância estatística ($p < 0,0005$).

Nesta mesma região, o perímetro total apresentou maior valor quando mensurado de forma automática do método de Jones et al. (2016) quando comparado à forma manual de Deschenes et al. (2016), com significância estatística ($p < 0,05$). Também apresentaram maior valor nesta metodologia o perímetro corado, porém sem valor estatisticamente significativo.

Algumas variáveis não podem ser comparadas pelo fato de apenas algum autor ter utilizado em seu estudo, como por exemplo a quantidade cluster/área (μm^2) e o index de fragmentação no método de Jones et al., (2016).

Além do mais, em relação a quantidade de imagens utilizadas, foi possível identificar marcação inespecífica no método de Jones et al. (2016), ou seja, a borda da JNM ultrapassava a delimitação da imagem, por isso este método utilizou apenas 9 imagens na mensuração das variáveis.

Tabela 3. Médias e desvio-padrão (DP) da comparação entre as variáveis correspondentes da região pós-sináptica da JNM entre diferentes metodologias nas mesmas imagens.

Variável	Ampliação	Deschenes et al. (2016)			Jones et al. (2016)			Pimentel Neto et al. (2021)			<i>p</i>
		Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	
Área total (μm^2)	1.000X	521,61	283,33	10	450,9	176,34	9				0,51
Perímetro total (μm)		118,89	38,28	10	231,4	133,56	9				<0,05
Área corada (μm^2)		242,22	126,90	10	214,2	92,95	9	242,22	126,90	10	0,58
Perímetro corado (μm)		221,21	96,72	10	268,9	231,33	9	221,21	96,72	10	0,57
Dispersão (%)		49,93	15,48	10	48,38	11,55	9	49,93	15,48	10	0,8
Número de clusters		17,4	7,80	10	3,888	4,04	9				<0,0005
Quantidade cluster/área (μm^2)					2,415	2,43	9				
Index de fragmentação					0,525	0,33	9				
Densidade de JNM	200X							4,4	0,84	10	
Densidade integrada								11153282	6575357	10	
Área total (μm^2)								67,36	21,09	10	

Elaborada pela autora.

5. DISCUSSÃO

A JNM é importante para a transmissão do impulso nervoso, em que o axônio e todas as fibras musculares que ele inerva formam uma unidade motora, permitindo assim a realização da contração muscular, gerando o movimento. A partir do movimento, o ser humano se desenvolve biológica, social e psicologicamente, sendo fundamental para a sua aprendizagem. Composta pela região pré-sináptica, a fenda sináptica e a região pós-sináptica, a JNM identifica os fatores neuromusculares que influenciam a força, potência e flexibilidade, descrevendo as suas adaptações crônicas e agudas ao treino.

Apesar do envelhecimento potencializar a instabilidade da JNM - permitindo o avanço de doenças como a sarcopenia, gerando o declínio funcional dependente do tempo, o exercício físico evita a denervação de fibras musculares, estimulando a plasticidade motora e assim atua indiretamente na longevidade do indivíduo, gerando uma melhor qualidade de vida. (LI et al., 2018).

As mensurações apresentadas neste estudo foram baseadas em três metodologias: primeiramente, o método de Deschenes et al., (2016), em que as medidas são realizadas de forma manual, desde a delimitação. O método de Jones et al., (2016), em que o autor automatiza as medidas para padronizá-las e facilitar o processo de demarcação. Por último, o método de Pimentel Neto et al., (2021), metodologia baseada na de Jones, porém com a inserção de novas variáveis.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as formas de mensurações morfoquantitativas da região pós-sináptica da JNM. Desta forma, demonstramos as diferenças, e algumas significantes estatisticamente sobre os diferentes métodos de mensuração de uma mesma estrutura, o que implica em limitações de reprodutibilidade de estudos.

As formas aplicadas nas mensurações seguiram as metodologias de Deschenes et al., (2016) - manual - e de Jones et al., (2016) – semi-automatizada. A primeira consistiu em mensurar as variáveis da fenda pós-sináptica da JNM de forma detalhada, se utilizando das ferramentas do software ImageJ, porém, de forma manual ao delimitar os limites e bordas da estrutura.

A segunda, por sua vez, busca padronizar as mensurações das imagens, reajustando suas cores e medindo as variáveis por meio da coloração avermelhada

presente devido à fluorescência do anticorpo. Por se tratar de uma metodologia semi-automatizada, está se apresentou mais rápida, menos complicada em questão de delimitação de bordas e limites da estrutura, além de facilitar a análise morfométrica comparativa, desta forma garante maior exploração (JONES et al., 2016).

Algumas dificuldades foram encontradas para as morfometrias, tanto manual quanto semi-automatizada. De forma manual, as dificuldades encontradas foram diante de estrutura ambiental, como a necessidade de um bom equipamento para manuseio do software e iluminação adequada para melhor visualização da imagem. Além disso, é necessário compreender as delimitações da fenda pós-sináptica, para realizar as devidas demarcações. Uma limitação dessa metodologia é a demarcação das variáveis, pois em algumas imagens, as mesmas não ficam são de fácil visualização e delimitação contínua na mensuração.

O método semi-automatizado, de Jones et al. (2016), por sua vez, tende a ser mais fácil na delimitação das variáveis, principalmente na área corada, devido ao degradê de cores das imagens, entretanto, o que dificulta é compreender os processos para a padronização da mensuração, visto que há material de apoio ao software produzido pelos autores. Uma limitação encontrada deste método foi que, por ser automatizado, reconhece manchas da imagem que não são estruturas pertencentes à AchR, podendo alterar o resultado da mensuração. Para que isso não ocorra, é necessário, de maneira manual, ocultar as manchas desnecessárias.

Em aspectos de reprodutibilidade e confiabilidade, o método semi-automatizado de Jones et al., (2016), se apresenta como o mais adequado, pois padroniza de acordo com uma série de estudos (SINGH et al., 1990; PRAKASH et al., 1996; HOPKINS et al., 1985 e LANDINI, 2008). Um exemplo desta afirmação foi a marcação inespecífica em uma das imagens. O método automatizado apontou a marcação assim que foram delimitadas as JNM em coloração avermelhada, algo que não ocorreu na forma manual. Entretanto, no método manual houve a identificação precisa da morfologia da JNM.

Em relação às variáveis, todas representaram as imagens mensuradas, entretanto teve-se dificuldade de visualizá-las na imagem, como por exemplo o número de clusters, que são aglomerados de AChR presentes na JNM. Manualmente, não foi possível visualizá-las com tanta precisão em comparação à forma semi-automatizada.

6. CONCLUSÃO

A partir das análises morfológicas da JNM, conclui-se que ambas metodologias apresentadas são de suma importância para a compreensão das variáveis, auxiliando na delimitação das variáveis, seja ela feita manualmente, delimitando todos os clusters, ou de forma semi-automatizada, a partir de padronizações do software e degradê de cores em pixels da imagem.

O método de Jones et al. (2016) se apresentou como mais coerente, pelo fato de padronizar as mensurações, desde a delimitação das variáveis, como por exemplo a área corada, com o degradê de cores, facilitando a visualização das mesmas, até a geração das medidas. Além disso, o método acompanha um material de apoio, que instrui a forma de mensurar, e uma tabela que auxilia na compreensão dos resultados.

É interessante, para estudos futuros, a mensuração de novas variáveis, como o número de pontos de ramificação - variável analisada apenas no método de Jones et al., (2016) - para maior comparação das metodologias.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-SUAREZ, P.; GAWOR, M.; PRÓSZYNSKI, T. J. Perisynaptic Schwann cells - The multitasking cells at the developing neuromuscular junctions. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, n. 104, p. 31-38, 2020.
- BEHM, DG; KAY, AD; TRAJANO, GS; BLAZEVIČH, AJ. Mechanisms underlying performance impairments following prolonged static stretching without a comprehensive warm-up. **Eur J Appl Physiol** 121, 67–94, 2021.
- BIEDERER, THOMAS; KAESER, PASCAL S.; BLANPIED, THOMAS A. Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. **Neuron**, v. 1, n. 96, p. 680-696, 2017.
- BOARETTO, M. L.; ANDRADE, B. Z.; MACIEL, J. I. H. N.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, C. M. T.; GUIMARÃES, A. T. B.; TORREJAIS, M. M.; SCHNEIDER, S. C. S.; RIBEIRO, L. F. C.; BERTOLINI, G. R. F. Alterations in neuromuscular junctions and oxidative stress of the soleus muscle of obese Wistar rats caused by vibratory platform training. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 4, n. 20, p. 570-578, 2020.
- DESCHENES, MICHAEL R.; A ROBY, MACKENZIE; GLASS, EMILY K. Aging Influences Adaptations of the Neuromuscular Junction to Endurance Training. **National Institutes of Health**, [s. l], v. 190, n. 8, p. 56-66, 2011.
- FALSAPERLA, R.; PRÁTICÒ, A. D.; RUGGIERI, M.; PARANO, E.; RIZZO, R.; CORSELLO, G.; VITALITI, G.; PAVONE, P. Congenital muscular dystrophy: from muscle to brain. **Italian Journal Pediatrics**. v. 42, n. 1, p.78, 2016.
- GILLON, ASHLEY; NIELSEN, KATHRINE; STEEL, CHARLOTTE; CORNWALL, JON; SHEARD, PHILIP. Exercise attenuates age-associated changes in motoneuron number, nucleocytoplasmic transport proteins and neuromuscular health. **Crossmark**, v. 40, n. 1, p. 177-198, 2018.
- HOPKINS, W G; BROWN, M C; KEYNES, R J. Postnatal growth of motor nerve terminals in muscles of the mouse. **Journal Neurocytol.** 14, 525– 540, 1985.
- IYER, CHITRA C.; CHUGH, DEEPTI; BOBBILI, PRAMEELA J.; III, ANTRON J. BLATNIK; CRUM, ALEXANDER E.; YI, ALLEN F.; KASPAR, BRIAN K.; MEYER, KATHRIN C.; BURGHESE, ARTHUR H.M.; ARNOLDA, W. DAVID. Follistatin-induced muscle hypertrophy in aged mice improves neuromuscular junction innervation and function. **Elsevier: Neurobiology of Aging**, v. 2021, n. 104, p. 32-41, 2021.
- IYER, CHITRA C; CHUGH, DEEPTI; BOBBILI, PRAMEELA J; III, ANTON J BLATNIK; CRUM, ALEXANDER E; YI, ALLEN F; KASPAR, BRIAN K; MEYER, KATHRIN C; BURGHESE, ARTHUR H M; ARNOLD, W DAVID. Follistatin-induced muscle hypertrophy in aged mice improves neuromuscular junction innervation and function. **Neurobiol Aging**, v. 104, n. 1, p. 32-41, 2021.
- JONES, R. A; REICH, C.D; DISSANAYAKE, K. N; KRISTMUNDSDOTTIR, F; FINDLATER, G. S; RIBCHESTER, R. R; SIMMEN, M. W; GILLINGWATER, T. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure–function relationships at the neuromuscular junction. **Trends Neurosci.** v. 6, n.160240, 2016.

KOIRALA, S; REDDY, LV; KO, C.-P. Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. **J. Neurosci.** v 32, 987–1002, 2003.

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.

LANDINI, G. Advanced shape analysis with ImageJ. In **Proceedings of the Second ImageJ User and Developer Conf.** Luxembourg, pp. 116–121, 2008.

LEPORE, ELISA; CASOLA, IRENE; DOBROWOLNY, GABRIELLA; MUSARÒ, ANTONIO. Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. **Cells** , v. 906, n. 8, p. 1-15, 2019.

LI, L.; XIONG, W.; MEI, L. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. **Annual Review of Physiology**, v. 80, n. 1, p. 159-188, 2018.

MONTENEGRO, YORRAN HARDMAN A.; JERÔNIMO, ALINE FERREIRA DE ARAÚJO. Avanços no diagnóstico e avanços no diagnóstico e tratamento de distrofias relacionadas à junção neuromuscular: um enfoque molecular. **Congresso Nacional de Biólogos**, v. 8, n. 1, p. 30-34, 2018.

Nishimune H, Stanford JA & Mori Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. **Muscle Nerve**, v.49, 315–324, 2014.

NISHIMUNE, H.; SHIGEMTO, K. Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. **Neurological Clinical**, v. 36, n. 2, p. 231-240, 2018.

PIMENTEL NETO, J; ROCHA, L.C; JACOB, C. S; BARBOSA, G. K; CIENA, A. P. Postsynaptic cleft density changes with combined exercise protocols in an experimental model of muscular hypertrophy. **European Journal of Histochemistry**, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2021.

PRAKASH, Y S; MILLER S M; HUANG, M; SIECK G C. Morphology of diaphragm neuromuscular junctions on different fibre types. **J. Neurocytol.** 25, 88 – 100, 1996.

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. 20, n. 418, p. 1-8, 2020.

SEENE, TEE; UMNOVA, MARIA; KAASIK, PRIIT. Morphological peculiarities of neuromuscular junctions among different fiber types: Effect of exercise. **Eur J Transl Myol**, v. 3, n. 27, p. 139-146, 2017.

SINGH R. K; KUMAR, P; MAHALINGAM, K. Molecular genetics of human obesity: A comprehensive review. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 2, p. 87-108, 2017.

TOMAS, L; , FENOLL, R; MAYAYO, E; SANTAFE. Branching pattern of the motor nerve endings in a skeletal muscle of the adult rat. **J. Anat.** 168, 123– 135, 1990.

YAN, Z.; OKUTSU, M.; AKHTAR, Y.N.; LIRA, V.A. Regulation of exercise induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. **Journal Of Applied Physiology**, v. 110, n. 1, p. 264-274, 2011.