
BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

BRUNA ALÉXIA CRISTOFOLETTI GRILLO

**DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVE ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO
MIOTENDÍNEA EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE**



Rio Claro
2021

BRUNA ALÉXIA CRISTOFOLETTI GRILLO

DIETA HIPERLIPÍDICA PROMOVE ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA
EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE

Orientador: Prof. Dr. Adriano Polican Ciena

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Educação Física.

Rio Claro
2021

G859d

Grillo, Bruna Aléxia Cristofolletti

Dieta hiperlipídica promove adaptações na junção miotendínea em modelo experimental de obesidade / Bruna Aléxia Cristofolletti Grillo. -- Rio Claro, 2021

50 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Educação Física) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Adriano Polican Ciena

1. Morfologia. 2. Obesidade. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Músculo esquelético. 5. Microscopia eletrônica de transmissão. 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.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família e amigos, que me proporcionaram o apoio e incentivo que me fizeram descobrir a pesquisa e dar continuidade nesse trabalho. Agradeço pela compreensão que tiveram nos dias difíceis e nos momentos em que não parecia haver saída, pelo acalento de cada lágrima e por todo amor que me ajudou a superar as dificuldades.

Agradeço a todos os membros do laboratório pelo apoio e auxílio no desenvolvimento de cada etapa, pois todo esse trabalho foi realizado e finalizado graças ao trabalho em conjunto.

Em especial agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Polican Ciena, pela oportunidade e aprendizado acadêmico e pessoal, que me proporcionou muita evolução profissional e pessoal. Agradeço por cada conversa e conselho que naquele momento eu não entendi, mas que posteriormente me mostrou os erros e o que deveria ser feito. Por fim, agradeço principalmente pela confiança de que conseguiríamos alcançar todos os objetivos que traçamos e por mostrar que a pesquisa é linda e fascinante.

Não menos importante, agradeço a minha coorientadora Ma. Lara Caetano Rocha, por toda paciência e plenitude em me guiar pelos caminhos certos, por me mostrar que sempre existe um lado positivo em cada porta que se fecha, e sobretudo por ser meu exemplo de quem eu almejo ser no futuro.

Finalizo agradecendo aos técnicos do laboratório da Unesp de Rio Claro, e dos outros laboratórios que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, aos animais que deram sua vida em prol da ciência e a financiamento pela bolsa 2018/20962-5 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*“A ciência é maravilhosa, só quem não
conhece não gosta”*

Gilson Volpato

RESUMO

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo que resulta na inflamação crônica, e promove extensas alterações que comprometem a integridade estrutural e funcional dos músculos esqueléticos. A obesidade pode impactar seriamente a região de transmissão de força entre o músculo e o tendão, a junção miotendínea (JMT). O presente estudo teve como objetivo descrever as adaptações estruturais e ultraestruturais do ventre muscular e JMT do tibial anterior (TA) e sóleo (SO) em modelo experimental de obesidade. Dessa forma, foram utilizados ratos *Wistar* (n = 20) divididos nos grupos Sedentário e Obeso (induzido por dieta hiperlipídica). A obesidade resulta em menor área de seção transversal (AST) das fibras musculares tipo I e IIa e maior AST de fibras tipo IIx nos músculos TA e SO. Na região JMT-TA foram observados sarcômeros menores adjacentes às projeções da JMT (sarcômeros proximais e distais), assim como, menor comprimento nas invaginações e evaginações sarcoplasmáticas. Na região JMT-SO, a obesidade resultou no sarcômero distal menor, bem como, maior comprimento das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas. Concluimos que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove adaptação semelhante nas fibras musculares dos músculos TA e SO; entretanto, na região da JMT, as projeções sarcoplasmáticas e o sarcômero adjacente demonstram adaptações diferentes de acordo com os distintos fenótipos musculares.

Palavras-chave: obesidade. músculo esquelético. sarcômero. junção miotendínea.

ABSTRACT

Obesity is characterized by excess adipose tissue that results in chronic inflammation, and promotes extensive changes that compromise skeletal muscles' structural and functional integrity. Obesity can seriously impact the force transmission region between the muscle and the tendon, the myotendinous junction (MTJ). The present study aimed to describe the structural and ultrastructural adaptations of belly muscle and MTJ of tibialis anteriores (TA) and soleus (SO) in experimental obesity model. That way was used *Wistar* rats (n = 20) divided into Sedentary and Obese groups (induced by a high-fat diet). Obesity results in a lower cross-section area (CSA) of muscle fibers type I and IIa and higher CSA of fibers type IIx in TA and SO muscle. The TA JMT region was observed with less sarcomeres adjacent to JMT projections (proximal and distal sarcomeres), lower length in sarcoplasmic invaginations and evaginations. The SO JMT region, obesity results in the long distal sarcomere, higher length of sarcoplasmic invaginations e evaginations. We conclude that obesity by high-fat diet-induced promotes similar adaptation in the muscle fibers of muscle TA e SO; however, in the JMT region, the sarcoplasmic projections and adjacent sarcomere demonstrate different adaptation according to different muscle phenotypes.

Keywords: obesity. skeletal muscle. sarcomere. myotendinous junction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Obesidade	10
2.2 Músculo estriado esquelético	11
2.3 Junção miotendínea	13
3 OBJETIVO GERAL	16
3.1 Objetivos específicos.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Dieta padrão e hiperlipídica (modelo experimental de obesidade).....	17
4.2 Histoquímica (ATPase Miofibrilar)	18
4.3 Microscopia eletrônica de transmissão	19
4.4 Análise morfométrica	20
5 RESULTADOS.....	22
5.1 Fibras musculares.....	22
5.2 Sarcômero	22
5.3 Junção miotendínea	23
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXOS	39

1 INTRODUÇÃO

A incidência da obesidade foi constantemente agravada pela súbita disseminação global de COVID-19, que ocasionou no primeiro momento, o isolamento social como forma de impedir índices mais altos de contaminação e mortalidade, no entanto, acompanhado com o isolamento, existem outros fatores que agravam a ocorrência da obesidade, dentre eles: o aumento das dificuldades socioeconômicas; a deterioração da saúde psicossocial; a perturbação na homeostase energética; e por fim, a inatividade física (CLEMMENSEN et al., 2020). Juntos, todos esses fatores, implicam no aumento de incidência da obesidade, e consequentemente, em níveis cada vez mais baixos de qualidade de vida.

A obesidade é uma condição patológica com etiologia multifatorial que está intimamente relacionada à baixa qualidade de vida e alta taxa de mortalidade (GOMES et al., 2016; RINGSEIS et al., 2015). Esta patologia é resultado do desequilíbrio entre a ingestão de alimentos e o gasto energético, com isso, o consumo excessivo de calorias associado ao sedentarismo é uma das principais causas da obesidade (GUEDES et al., 2020).

O desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético, promove a expansão anormal do tecido adiposo, e implica em uma série de eventos inflamatórios que são prejudiciais ao organismo (GUEDES et al., 2020; IZAOLA et al., 2015; PICCHI et al., 2011). Dessa forma, a obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo e a inflamação crônica (LEE et al., 2019).

A qualidade de vida reduzida com a obesidade decorre do comprometimento de vários órgãos, dentre eles o músculo estriado esquelético. A associação entre sobrecarga adiposa e o estado inflamatório acarreta no comprometimento funcional e estrutural dos músculos, principalmente aqueles ativos na locomoção (TOMLINSON et al., 2016). No aspecto morfológico, a obesidade resulta na remodelação negativa da matriz extracelular (GUMINA et al., 2014), regeneração muscular prejudicada (WANG et al., 2018), atrofia muscular (PELLEGRINELLI et al., 2015), além da disfunção mitocondrial que altera o fenótipo metabólico muscular (COUTURIER et al., 2013).

Na extremidade distal do músculo, está localizada uma região especializada do aparelho locomotor, denominada de junção miotendínea (JMT), região de interface entre o músculo e o tendão, que exerce papel indispensável no

desenvolvimento dos movimentos, como a locomoção, uma vez que uma de suas principais funções é transmitir as forças contráteis geradas no músculo para o tendão (YUAN et al., 2020). No entanto, essa região também sofre com cargas excessivas durante a contração muscular, e com isso, é associada com a predisposição a lesões (KOSTROMINOVA et al., 2009).

A JMT apresenta características ímpares, uma vez que tem sido demonstrada em diversos trabalhos com uma capacidade de adaptação singular, que pode comprometer a transmissão e estabilização das forças contráteis na interface entre o músculo e o tendão (JACOB et al., 2019; PALMA et al., 2011; PIMENTEL NETO et al., 2020). Além disso, a remodelação dessa região está relacionada à composição da fibra muscular (HYODO et al., 2001), dessa forma, músculos antagonistas, como Tibial Anterior (TA-glicolítico) e Sóleo (SO-oxidativo), podem apresentar diferentes adaptações.

Sendo assim, considerando que distúrbios como envelhecimento (SIERRA et al., 2018), menopausa (JACOB et al., 2019) e diferentes modelos de treinamento (ROCHA et al., 2020) promovem a remodelação da JMT, a associação entre inflamação metabólica e sobrecarga adiposa imposta aos músculos ativos na locomoção, podem afetar seriamente a ancoragem dos tecidos. Assim como, podem desempenhar impacto negativo na adaptação da JMT, visto que a miogênese dos músculos prejudicada pela obesidade compromete a plasticidade do tecido muscular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Obesidade

A incidência da obesidade foi constantemente agravada pela súbita disseminação global de COVID-19, que ocasionou no primeiro momento, o isolamento social como forma de impedir índices mais altos de contaminação e mortalidade, no entanto, acompanhado com o isolamento, existem outros fatores que agravam a ocorrência da obesidade, dentre eles: o aumento das dificuldades socioeconômicas, que provoca maior ingestão de alimentos processados ricos em calorias, devido ao preço baixo; a deterioração da saúde psicossocial, no qual a redução significativa da interação social, resulta em uma tempestade de sentimentos que induz a insegurança psicossocial e repercute na alimentação descontrolada de alimentos ricos em calorias; a perturbação na homeostase energética, causada pela alteração nos sistemas neuroendócrinos que regulam o metabolismo energético; e por fim, a inatividade física, agravada pelo fechamento das academias e esportes coletivos, que exacerbam todos os outros fatores citados acima (CLEMMENSEN et al., 2020). Juntos, todos esses fatores, implicam no aumento da incidência da obesidade, e consequentemente, em níveis cada vez mais baixos de qualidade de vida.

A obesidade possui alto índice de mortalidade, e está intimamente relacionada a baixa qualidade de vida (RINGSEIS et al., 2015). Esta patologia possui etiologia multifatorial, sendo uma de suas principais causas o consumo excessivo de calorias associado ao sedentarismo, que implica na expansão patológica do tecido adiposo (GUEDES et al., 2020). Dessa forma, a obesidade é caracterizada por um excesso de tecido adiposo, e consequentemente a metainflamação (inflamação desencadeada metabolicamente) (LEE et al., 2019).

O tecido adiposo é um órgão vital para o controle da homeostase energética, no entanto, a hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos devido à alta ingestão de calorias, prejudica o desempenho de suas funções (IZAOLA et al., 2015; WANG et al., 2018). Com a expansão do tecido adiposo surgem áreas hipóxicas, que provocam a infiltração e ativação de macrófagos do tipo M1 (pró-inflamatórios), responsáveis por iniciar uma cascata de eventos inflamatórios através da secreção citocinas pró-

inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-10, entre outros) (ELIAS et al., 2015; IZAOLA et al., 2015).

Os macrófagos são indispensáveis no aspecto imunológico, e por meio de suas distinções fenóticas atuam na inibição e morte inflamatória (tipo 1), e na proliferação e cicatrização anti-inflamatória (tipo 2), no qual a expressão de cada tipo é de extrema importância para a homeostase do organismo. Com a adiposidade excessiva característica da obesidade, ocorre uma troca fenotípica, que favorece o aumento na expressão e infiltração dos macrófagos tipo 1 no tecido adiposo, e se instala o estado inflamatório (SOLTANI et al., 2020).

Existem diversos estudos que relacionam o estado inflamatório da obesidade com o desenvolvimento de outras comorbidades, como hipertensão, doença arterial coronária, acidente vascular cerebral, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa não alcoólica, neurodegeneração, e vários tipos de câncer que agravam a nocividade da obesidade e diminuem a qualidade de vida dos indivíduos obesos (KOLB et al., 2016; LEISEGANG et al., 2019; SERTIE et al., 2019).

Além de sua relação com o desenvolvimento de inúmeras comorbidades, a obesidade também provoca diversas alterações no aparelho locomotor que implicam na dificuldade de realizar as atividades diárias, visto que a associação entre a sobrecarga adiposa e o estado inflamatório, provoca o comprometimento funcional e estrutural dos músculos, sobretudo aqueles ativos na locomoção (TOMLINSON et al., 2016).

2.2 Músculo estriado esquelético

Responsável pela locomoção e manutenção da postura, o músculo estriado esquelético é um dos tecidos mais ativos metabolicamente, com extraordinária capacidade de adaptação em suas propriedades estruturais (BOFF, 2008; IIZUKA et al., 2014; NATALI et al., 2008).

O músculo esquelético é constituído por estruturas heterogêneas denominadas fibras musculares, estas são as verdadeiras responsáveis pela ampla plasticidade dos músculos esqueléticos. As fibras musculares podem ser diferenciadas por suas propriedades contráteis e metabólicas em: tipo I, identificadas pelo seu caráter de contração lenta e oxidativa, com alta resistência à fadiga; tipo IIa, fibras de contração rápida e lenta, que atuam no metabolismo oxidativo e glicolítico,

com certa resistência à fadiga; e tipo IIx, conhecidas por sua contração rápida com predominância glicolítica, no entanto mais sensível à fadiga (PIOVESAN et al., 2009; QAISAR et al., 2016).

A proporção entre os tipos de fibras musculares em cada músculo, promove diferentes funções contráteis e metabólicas. Dentre os músculos ativos na locomoção, destacam-se o TA e SO, que apresentam funções e fenótipos diferentes. O músculo TA atua na dorsiflexão durante a locomoção, dessa forma, possui uma maior proporção de fibras tipo IIa e IIx, que o caracteriza como um músculo glicolítico (MOO et al., 2016). Enquanto o SO, além de atuar na flexão plantar do tornozelo durante a locomoção, também é um músculo antigravitacional, visto que é responsável pela manutenção da posição ortostática, assim se faz necessária maior proporção de fibras tipo I que o caracteriza como um músculo oxidativo (CHEN e DELP, 2016).

No entanto, os músculos podem alterar seus fenótipos de acordo com estímulos internos e externos advindos da patologia (TOGOE et al., 2019), treinamento (BUCCI et al., 2005) e envelhecimento (DEGENS e ALWAY, 2006). Especificamente, o processo inflamatório da obesidade prejudica capacidade enzimática oxidativa, que provoca a disfunção mitocondrial, e consequentemente resulta na redução da proporção de fibras tipo I, visto que são ricas em mitocôndrias. Em contrapartida, a obesidade aumenta a capacidade enzimática glicolítica, promovendo maior proporção de fibras tipo IIa e IIx. Dessa forma, a obesidade provoca a alteração no fenótipo metabólico do músculo (COUTURIER et al., 2013).

A nível morfológico, as fibras musculares são constituídas por inúmeras proteínas contráteis organizadas em estruturas denominadas de sarcômeros, unidade básica de contração do músculo esquelético, formada por miofilamentos finos (actina) e grossos (miosina) (BOFF, 2008).

Nos limites laterais de cada sarcômero estão localizadas linhas densas proteicas, chamadas de linhas Z; além de identificarem um importante nó de sinalização e atuar em diversos processos celulares, elas também proporcionam a flexibilidade necessária para se adequar às forças contráteis durante a contração muscular. Ancorado nas linhas Z são encontrados os miofilamentos finos, que compõem as bandas I, e por sua vez é dividida pelas linhas Z. Já entre as bandas I que formam um único sarcômero, está localizada a banda A, que em seus limites laterais os miofilamentos finos sobrepõem os miofilamentos espessos, e em seu

centro estão localizados apenas os miofilamentos espessos, essa região do centro da banda A é chamada de banda H. No centro da banda H também está localizada a linha M, fruto de uma série de linhas de elétrons, que atuam na estabilização dos miofilamentos espessos durante a contração, e garantem o metabolismo dinâmico do músculo (HENDERSON et al, 2017).

A organização das inúmeras proteínas nos sarcômeros, são idealmente projetadas para a produção de força, com isso, a ampla adaptação em seus comprimentos, pode resultar no comprometimento ou melhora da geração de força, visto que a produção de força depende diretamente de seus comprimentos, assim como também, pode indicar maior propensão a “popping”, lesões musculares causadas por rompimentos dos sarcômeros (BARROSO et al., 2005; LIEBER e WARD, 2011; RASSIER, 2017). Dessa forma, os sarcômeros são aspectos chave na compreensão das propriedades e funções musculares (MOO et al., 2016).

Além disso, a ativação excessiva da autofagia está relacionada com a desintegração dos sarcômeros, no entanto, apesar da obesidade ser compreendida como uma patologia que provoca a atrofia muscular devido ao aumento do fluxo autofágico provocado pela inflamação (FAN e XIAO, 2020), permanecem desconhecidas as alterações nos comprimentos dos sarcômeros.

2.3 Junção miotendínea

Na interface entre o músculo e o tendão, está localizada uma complexa e altamente especializada região do aparelho locomotor denominada junção miotendínea (JMT), no qual sua principal função é transmitir das forças geradas pelas proteínas intracelulares do músculo para as proteínas extracelulares do tendão (PALMA et al., 2011). Além de atuar na transmissão de força, a JMT auxilia na estabilização articular, resistência muscular, movimentação do aparelho locomotor e armazenamento de energia elástica (CIENA et al., 2012a).

Na região da JMT, as projeções, dos feixes de fibras de colágeno provenientes da matriz extracelular, formam as invaginações sarcoplasmáticas; em contraste a elas, o sarcolema se dobra em extensões que se projetam em direção à matriz extracelular, e formam as evaginações sarcoplasmáticas. Juntas, essas projeções proporcionam maior área de interação do músculo com o tendão, e

asseguram que as forças contráteis cheguem como força de cisalhamento ao tendão (CIENA et al., 2010; TROTTER, 2002).

Devido às altas cargas impostas nessa região, a JMT é suscetível a modificações ultraestruturais mediante as condições patológicas, que podem causar seu comprometimento, e com isso, prejudicar o desempenho de suas funções. Entretanto, o remodelamento dessa região está relacionado com o fenótipo das fibras musculares, dessa forma, músculos antagônicos como o TA e SO, podem apresentar diferentes adaptações (CURZI et al., 2016).

Os estímulos atróficos na interface musculotendínea provocam a redução das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, que afeta negativamente a transmissão das forças pela JMT (CURZI et al., 2013), enquanto estímulos do treinamento aumentam as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, e permite uma distribuição vantajosa das forças (JACOB et al., 2019). Contudo, a obesidade possui tanto estímulos atróficos quanto estímulos da sobrecarga adiposa, que podem comprometer ou não a principal região de transmissão de força do aparelho locomotor.

Além das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas, na região da JMT também estão localizados os sarcômeros terminais das fibras musculares, que possui características ímpares durante a contração muscular. Estes sarcômeros possuem denominações específicas, no qual o penúltimo sarcômero é chamado de proximal, enquanto o último sarcômero é denominado de distal (SIERRA et al., 2018).

Recentes evidências apresentaram diferentes plasticidades nos comprimentos sarcoméricos da JMT e do ventre muscular. Especificamente, as adaptações dos sarcômeros distais estão relacionadas com a JMT, visto que um de seus pontos de fixações é a lâmina basal da JMT, e com isso exercem papel fundamental na ancoragem dos tecidos (ROCHA et al., 2020).

Entretanto, essa relação entre o sarcômero distal e a JMT, é muito mais complexa, pois esta região é comumente associada com a suscetibilidade a lesões. No entanto, a característica de fragilidade durante estresses excessivos advém dos sarcômeros da JMT, visto que as lesões ocorrem no tecido muscular próximo a JMT (CURZI et al., 2016).

Concomitantemente a JMT, apresenta diferentes arranjos morfológicos em músculos com diferentes características, dentre elas o ângulo de penação.

Indivíduos obesos apresentam alterações no ângulo de penetração de músculo ativos na locomoção, com isso, espera-se que a JMT também demonstre adaptações em suas ultraestruturas, sejam elas nocivas, devido as implicações da inflamação, ou benéficas, para suportar as cargas da sobrecarga adiposa.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo consistiu em descrever as adaptações estruturais e ultraestruturais do ventre muscular e junção miotendínea do tibial anterior (TA) e sóleo (SO) em modelo experimental de obesidade.

3.1 Objetivos específicos

- Identificar os diferentes tipos de fibras musculares e mensurar a área de secção transversa (AST);
- Mensurar os comprimentos dos sarcômeros em diferentes regiões;
- Descrever as características ultraestruturais da JMT;
- Mensurar os comprimentos das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

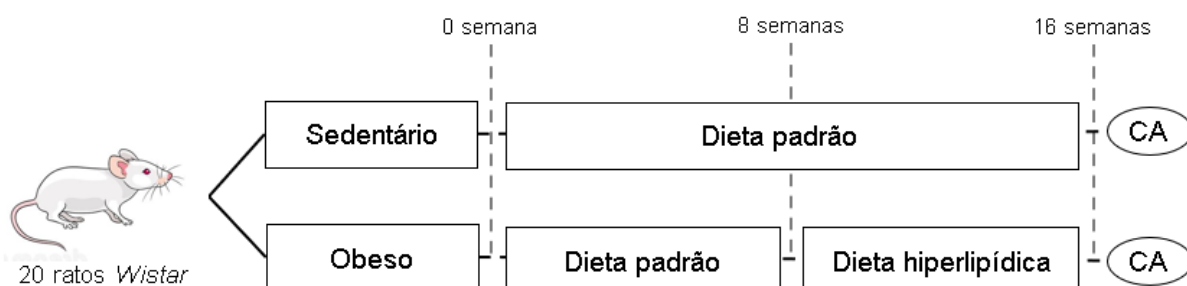
Foram utilizados 20 ratos *Wistar* adultos com 4 semanas de idade, divididos em 2 grupos distintos (n=10):

- Grupo Sedentário (S): submetidos à dieta padrão;
- Grupo Obeso (O): submetidos à dieta hiperlipídica;

Todos os animais originários do Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu, foram alojados em gaiolas com 5 ratos cada no Biotério do Laboratório de Anatomia Humana - Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro. Os animais foram mantidos em temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo claro/escuro e com ração e água “*ad libitum*”. Os procedimentos apresentados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA (nº14/2019) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro-SP.

4.1 Dieta padrão e hiperlipídica (modelo experimental de obesidade)

Com 4 semanas de vida, os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos S e O. Os animais dos grupos S e O foram alimentados com dieta equilibrada (PURINA® - 3,028 kcal/kg) “*ad libitum*” até a 8 semana de vida. Em seguida, os animais do grupo S foram mantidos na dieta equilibrada (PURINA® - 3,028 kcal/kg) “*ad libitum*”, enquanto os animais grupos O foram alimentados com dieta hiperlipídica (5,350 kcal/kg) “*ad libitum*” até a 16 semanas de vida (final do experimento) (Figura 1). A composição detalhada das dietas utilizadas está descrita na tabela 1.

Figura 1. Delineamento dos grupos experimentais.

Fonte: Elaborado pela Autora. Orgonograma da divisão dos grupos experimentais (Sedentário e Obeso), elucidando o período de indução da obesidade através da dieta hiperlipídica. Coleta das amostras (CA).

Tabela 1. Composição detalhada das dietas utilizadas no protocolo experimental.

Ingredientes (kg)	Dieta padrão	Dieta hiperlipídica
Amido de milho	465,7	264,1
Caseína	140	140
Dextrina	155	87,9
Sacarose	100	56,7
Lipídios	40	352
Óleo vegetal	40	40
Origem animal	-	312
Fibra (Cel. Microcrist.)	50	50
Mistura de sais minerais	35	35
Mistura de vitaminas	10	10
L-cistina	1,8	1,8
Bitartarato de colina	-	2,5
Cloreto de colina	2,5	-

Dados nutricionais da dieta hiperlipídica consultados em Moura et al. (2012). Celulose Microcristalina (Cel. Microcrist.).

4.2 Histoquímica (ATPase Miofibrilar)

As amostras do ventre muscular (n=5) do TA e SO de cada grupo experimental, foram seccionadas transversalmente (10 µm de espessura - Criostato HM 505 E, MICROM®), as secções foram incubadas durante 30 min a 37° C em uma solução contendo 10 mg de ATP dissolvidos em 2 gotas de água destilada adicionadas em conjunto com 10ml de glicina/tampão NaCl, CaCl₂ atingindo o pH 9,4 adicionado com DDT. Em seguida os cortes foram lavados em água destilada e incubados por 2 minutos em cloreto de cobalto a 2% o processo de lavagem e incubação foi repetido 3 vezes. Posteriormente, ocorreu uma nova lavagem das

amostras em água destilada e desidratação em série crescente de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%) e finalizar em xilol, para concluir a fixação das amostras.

Para o método de pH 4,3 e 4,6, as secções foram pré incubadas em solução tampão de acetato de sódio 0,1M com EDTA 10 mm durante 10 minutos a 4°C, as amostras foram posteriormente lavadas com água destilada e incubadas durante 2 min em 2% de cloreto de cobalto processo que foi repetido 3 vezes. Em seguida as amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas em séries crescente de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%), finalizando com xilol antes da montagem das lâminas com Entellan® (KRAUSE NETO et al., 2017). A aquisição das imagens realizou-se através do Microscópio de Luz Leica DM750 - Laboratório de Microbiologia/CEIS, Unesp Rio Claro/SP.

4.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, eutanasiados com overdose de anestésico – (Ketamina 100mg/Kg, via intraperitoneal), as amostras do ventre muscular e da JMT (3mm³) dos músculos TA e SO foram dissecadas imersas em solução de cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,4 durante 48 horas à 4°C. Posteriormente foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio a 1% durante 2 horas, à 4°C lavadas com solução salina 0,9% por três vezes e fixadas com a solução de acetato de uranila 0,5% durante 12 horas, à temperatura ambiente e na ausência de luminosidade (CIENA et al., 2010). Em seguida, as amostras foram submetidas a uma desidratação em série crescente de álcoois 70%, 80%, 90% e 95%, banho de 15 minutos em álcool etílico absoluto por quatro vezes e duas vezes em óxido de propileno por duas vezes. Após a desidratação, as amostras permaneceram 1 hora em uma mistura de resina Spurr e óxido de propileno na proporção de 1:1, sob agitação e em temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi novamente trocada para proporção de 3:1 durante 1 hora e 30 minutos, posteriormente em resina pura durante 12 horas em temperatura ambiente com ausência de luminosidade. A seguir, as amostras foram aquecidas por 1 hora em estufa a 37°C, com frasco aberto para total evaporação de líquidos das amostras. Para a inclusão das amostras, os blocos foram trimados para a realização de cortes ultrafinos (10µm) em ultramicrótomo e corados com o método de azul de toluidina 1%.

Após selecionada a área de interesse, foram realizados cortes ultrafinos de (60 μm), coletados em telas de cobre de 200 “Mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uralina 4%, por 3 minutos, e em seguida, lavados em água destilada, contrastados em solução aquosa de citrato de chumbo 0,4% por 3 minutos e lavados com água destilada (CIENA et al., 2012a). As imagens histológicas do ventre e da JMT dos músculos TA e SO foram analisadas através do microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 100[®] do laboratório de Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo – Campus Piracicaba/SP

4.4 Análise morfométrica

As mensurações foram realizadas com o auxílio do software ImageJ[®], no qual após definir o tamanho da barra em pixels com a ferramenta “Straight Line” foi determinada a escala da imagem na opção “Analyze” posteriormente “Set Escala” e então substituído o valor na caixa “Know Distance” pelo valor na barra, unidade de escala em μm “Unit of Length”.

Através dos cortes histológicos do ventre muscular, foi realizada a mensuração da área de seção transversal (AST) das fibras tipo I, IIa e IIx (n = 50/por fibra) em cada grupo experimental, com o intuito de determinar o efeito da obesidade nos fenótipos das fibras musculares dos músculos TA e SO.

Por meio de eletromicrografias, foi realizada a análise morfométrica das ultraestruturas a fim de avaliar as adaptações provocadas pela obesidade na JMT dos músculos TA e SO.

Os sarcômeros foram analisados em dois locais, na JMT e ventre muscular. Na região da JMT, foi mensurado o comprimento dos sarcômeros distal (último) e proximal (penúltimo), bem como os sarcômeros presentes no ventre muscular (TA - n = 55; SO - n = 55). O comprimento do sarcômero proximal e ventre corresponde à distância entre um par de linhas Z; porém, o comprimento do sarcômero distal corresponde à distância entre a última linha Z e a lâmina basal (ROCHA et al., 2020; SIERRA et al., 2018).

Na interface miotendínea, também foram mensurados os comprimentos (TA - n = 60; SO - n = 40) e espessuras (TA - n = 60; SO - n = 60) das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (PIMENTEL NETO et al., 2020).

Todos os dados obtidos pela análise morfométrica foram analisados estatisticamente por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Fibras musculares

A análise das fibras musculares por meio da AST, permitiu identificar distintas adaptações fenótípicas nos músculos TA e SO após indução da obesidade (Tabela 2).

No músculo TA, o grupo O apresenta menor AST nas fibras do tipo I ($p < 0,001$) e nas fibras do tipo IIa ($p < 0,0001$), enquanto nas fibras tipo IIx foram observadas maior AST ($p < 0,0001$). Assim como, no músculo SO, o grupo O demonstra menor AST nas fibras do tipo I ($p < 0,01$) e do tipo IIa ($p < 0,0001$), bem como maior AST nas fibras tipo IIx ($p < 0,01$).

Tabela 2. Área de secção transversa (AST) dos diferentes tipos de fibras dos grupos experimentais.

Variáveis	Grupos	
	Sedentário	Obeso
TA AST (μm^2)		
Tipo I	$2,879 \pm 1,699$	$1,858 \pm 0,435^{**}$
Tipo IIa	$2,228 \pm 0,894$	$1,781 \pm 0,248^{***}$
Tipo IIx	$2,610 \pm 1,616$	$3,867 \pm 1,142^{***}$
SO AST (μm^2)		
Tipo I	$4,096 \pm 0,977$	$3,567 \pm 0,889^*$
Tipo IIa	$4,124 \pm 1,003$	$3,278 \pm 0,839^{***}$
Tipo IIx	$2,634 \pm 1,192$	$2,985 \pm 0,729^*$

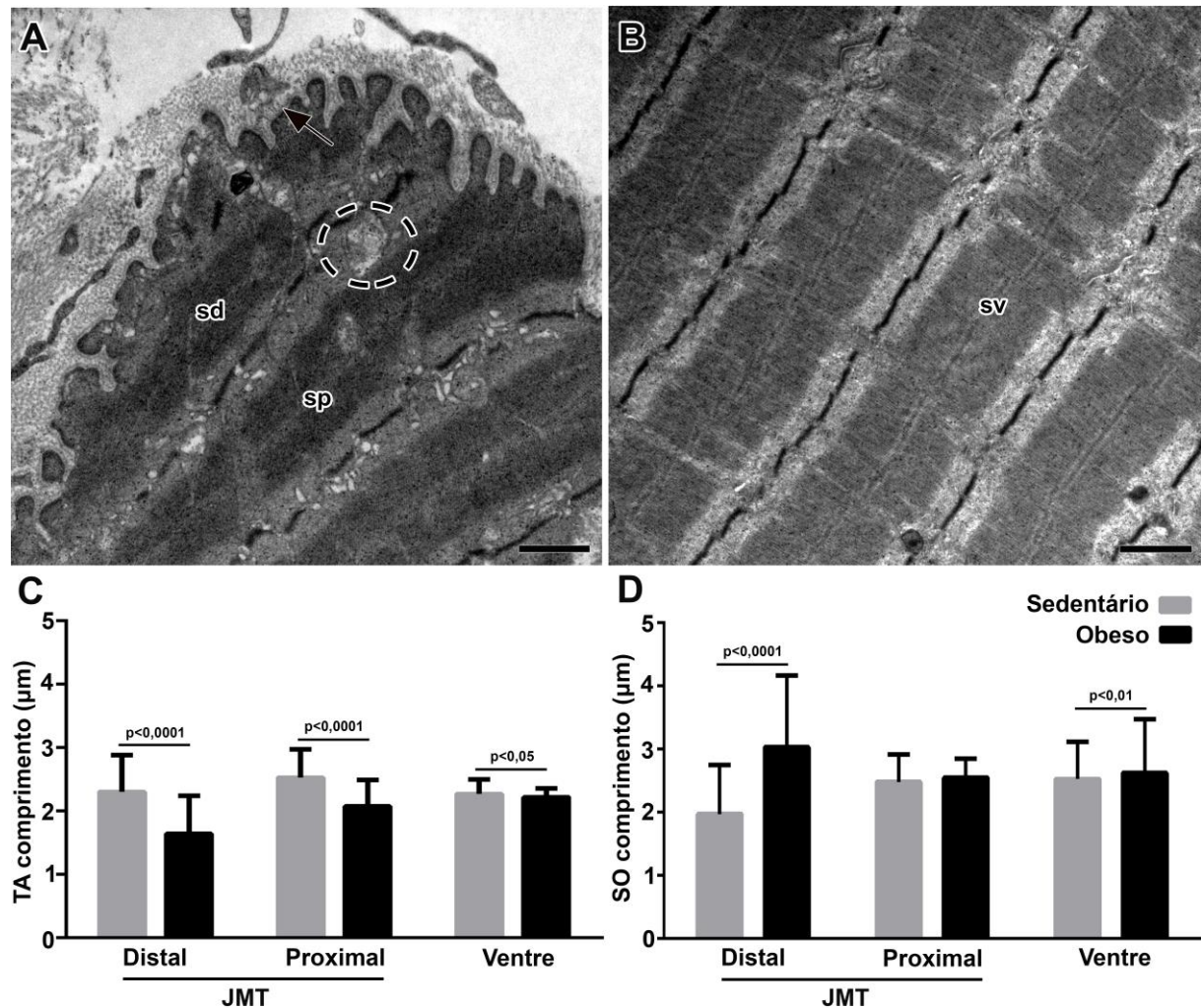
Fonte: Elaborada pela Autora. Tibial anterior (TA); Sóleo (SO); * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

5.2 Sarcômero

Através da análise morfométrica da JMT e do ventre muscular, revelamos as adaptações provocadas pela obesidade nos comprimentos sarcoméricos dos músculos TA e SO (Figura 2).

No grupo O do músculo TA, observamos menores comprimentos no sarcômeros distais ($p < 0,0001$), sarcômeros proximais ($p < 0,0001$) e sarcômeros do ventre ($p < 0,05$) (Figura 2C). Já no grupo O do músculo SO, foram observados maiores comprimentos no sarcômeros distais ($p < 0,0001$) e sarcômeros do ventre ($p < 0,01$) (Figura 2D).

Figura 2. Análise morfométrica dos sarcômeros distais, proximais e do ventre dos grupos Sedentário (S) e Obeso (O).



Fonte: Elaborada pela Autora. (A) Micrografia eletrônica de transmissão da região da junção miotendínea (JMT) do músculo tibial anterior (TA) do grupo O, no qual está localizada a interface miotendínea (seta), o sarcômero distal (sd) e proximal (sp), assim como a presença de gotículas lipídicas (círculo de linha pontilhada) adjacente aos sarcômeros nesta região. Barra: 2 μm (B) Micrografia eletrônica de transmissão do ventre do músculo TA do grupo O, onde foram identificados os sarcômeros do ventre (sv) organizados em séries. Barra: 1 μm. (C) Média ± desvio padrão dos comprimentos dos sarcômeros distais, proximais e ventre (μm) do músculo TA. (D) Médias ± desvio padrão dos comprimentos dos sarcômeros distais, proximais e ventre (μm) do músculo sóleo (SO). As diferenças significativas foram identificadas nos gráficos com os respectivos $p < 0,05$.

5.3 Junção miotendínea

No presente estudo, demonstramos as adaptações morfo-quantitativas da obesidade nas projeções sarcoplasmáticas da JMT dos músculos TA e SO (Figura 3).

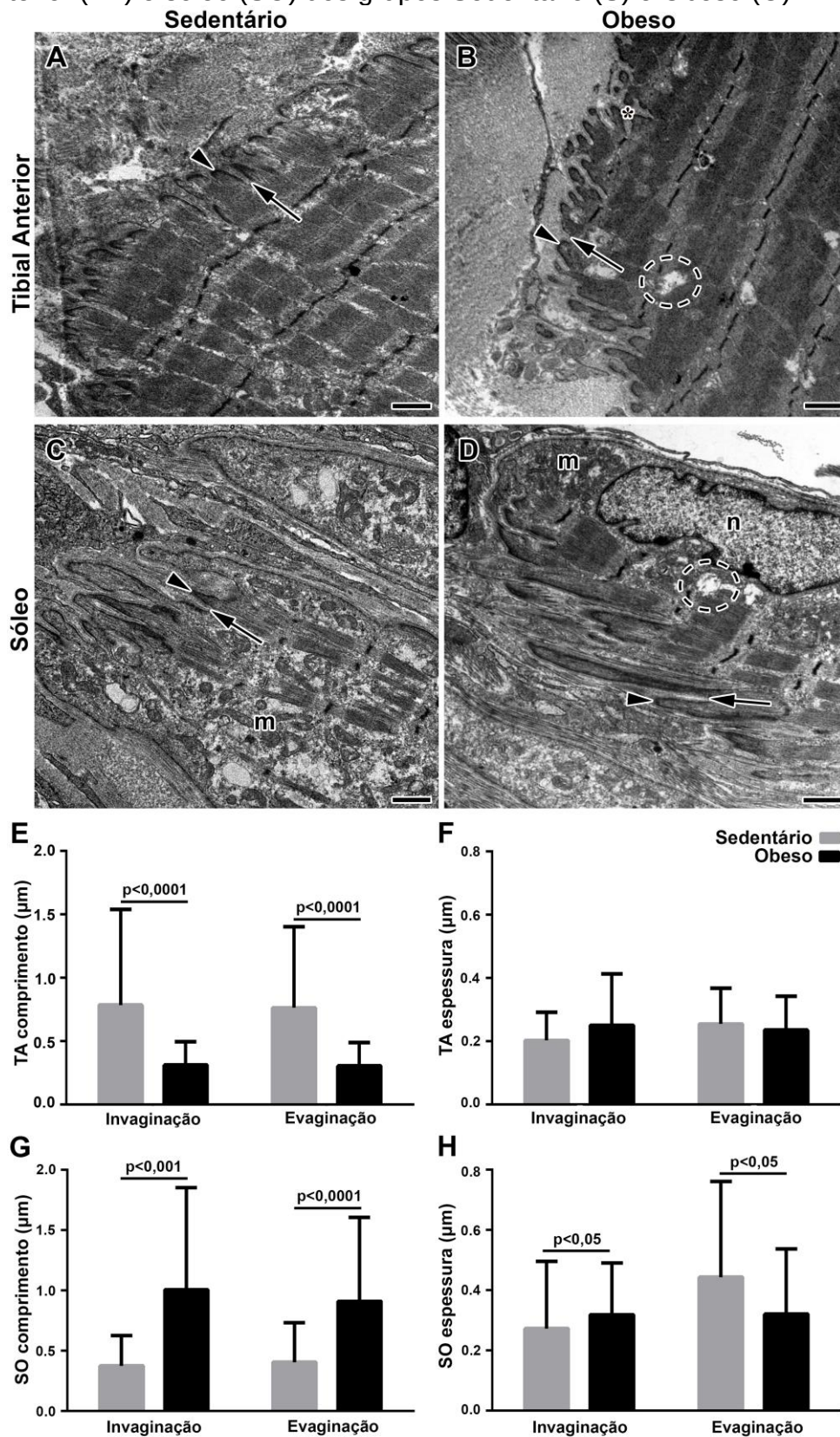
O músculo TA do grupo S, revelou invaginações e evaginações sarcoplasmáticas com comprimento variável e arranjo paralelo aos feixes de miofibrilas, além de invaginações delgadas com extremidades cônicas (Figura 3A).

Enquanto o músculo TA do grupo O, apresentou arranjo morfológico distinto na JMT, com invaginações e evaginações sarcoplasmáticas curtas e dispostas irregularmente em relação aos feixes de miofibrilas. Além disso, foram identificadas duas particularidades na interface miotendínea, as bifurcações nas extremidades das invaginações sarcoplasmáticas e a presença de gotículas lipídicas próximas aos sarcômeros dessa região (Figura 3B). Após a análise morfométrica das ultraestruturas, o grupo O demonstrou menores comprimentos nas invaginações e evaginações sarcoplasmáticas ($p < 0,0001$) (Figura 3E).

No músculo SO do grupo S, foram observadas invaginações sarcoplasmáticas delgadas e evaginações dispostas em paralelo, e adjacente à JMT, foi identificado um grupo mitocondrial subsarcolemal (Figura 3C).

Enquanto o músculo SO do grupo O, demonstrou projeções sarcoplasmáticas delgadas e alongadas com arranjo paralelo aos feixes de miofibrilas, no entanto, em alguns pontos da interface miotendínea, as invaginações sarcoplasmáticas apresentam-se curtas. Além disso, identificamos um núcleo de miofibra e gotículas lipídicas adjacentes à região de JMT, próximo ao grupo mitocondrial subsarcolemal (Figura 3D). Através da análise morfométrica do grupo O, demonstramos maiores comprimentos de invaginações ($p < 0,001$) e evaginações sarcoplasmáticas ($p < 0,0001$) e menores espessuras de evaginações sarcoplasmáticas ($p < 0,05$) (Figura 3G e 3H).

Figura 3. Componentes ultraestruturais da junção miotendínea (JMT) dos músculos tibial anterior (TA) e sóleo (SO) dos grupos Sedentário (S) e Obeso (O).



Fonte: Elaborada pela Autora. (A) Micrografia eletrônica de transmissão da região JMT-TA no grupo S, no qual estão identificadas as invaginações (seta) e evaginações sarcoplasmáticas (ponta de seta).

Barra: 2 μm . (B) Micrografia eletrônica de transmissão da região JMT-TA do grupo O, demonstra as invaginações (seta) e evaginações sarcoplasmáticas (ponta de seta), com destaque as bifurcações encontradas nas extremidades das invaginações sarcoplasmáticas (*) e a presença de gotículas lipídicas (círculo de linha pontilhada) adjacente aos sarcômeros da região da JMT. Barra: 2 μm . (C) Micrografia eletrônica de transmissão da região JMT-SO do grupo S, revela as invaginações (seta) e evaginações sarcoplasmáticas (ponta de seta), bem como a localização de mitocôndrias subsarcolemas (m) presentes nesta região. Barras: 2 μm . (D) Micrografia eletrônica de transmissão da região JMT-SO do grupo O, onde foram identificadas as invaginações (seta) e evaginações sarcoplasmáticas (ponta de seta), um núcleo (n) e gotículas lipídicas (círculo de linha pontilhada) próximo ao agrupamento mitocondrial subsarcolemal (m) presentes nesta região. Barras: 1 μm . (E) Médias $\pm$ desvio padrão dos comprimentos das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (μm) do músculo TA. (F) Médias $\pm$ desvio das espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (μm) do músculo TA. (G) Médias $\pm$ desvio padrão dos comprimentos das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (μm) do músculo SO. (H) Médias $\pm$ desvio padrão das espessuras das invaginações e evaginações sarcoplasmáticas (μm) do músculo SO. As diferenças significativas foram identificadas nos gráficos com os respectivos $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Através dos resultados obtidos neste estudo, comprovamos que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove amplas adaptações na morfologia da JMT. Além disso, demonstramos as distintas alterações nos sarcômeros, invaginações e evaginações sarcoplasmáticas em músculos com diferentes funções e fenótipos (TA e SO).

A obesidade induzida por dieta hiperlipídica resulta em adaptações semelhantes nas fibras musculares dos músculos TA e o SO. A AST menor nas fibras do tipo I e IIa observada no grupo O de ambos os músculos (TA e SO), comprovam os efeitos atroficos da obesidade relatados em outros estudos (COLLINS et al., 2018; QIU et al., 2014). De maneira mais aprofundada, a dieta hiperlipídica aumenta a infiltração dos macrófagos pró-inflamatórios no músculo esquelético, que inibe a diferenciação dos mioblastos, e consequentemente prejudicam a remodelação dos músculos esqueléticos e implicam na atrofia muscular (WANG et al., 2018).

Entretanto, as adaptações provocadas pela obesidade se tornam mais complexas do que a atrofia, visto que o estresse oxidativo resulta na mudança do fenótipo muscular para uma predominância glicolítica (ACEVEDO et al., 2017). Dessa forma, a maior AST das fibras tipo IIx do TA e SO em ratos obesos, comprovam a maior atividade glicolítica nos músculos esqueléticos após a indução da obesidade.

No entanto, quando analisadas as fibras IIx no grupo O dos músculos TA e SO, observamos que a adaptação é menos acentuada no SO, visto que é um músculo com predominância oxidativa. Diante disso, nossos resultados indicam que as respostas adaptativas das fibras musculares de ratos obesos provavelmente estão relacionadas com a predominância fenotípica do músculo estudado, assim como Chanseume et al. (2006) observaram nas mitocôndrias.

No presente estudo demonstramos as adaptações provocadas pela obesidade nos diferentes tipos de fibras musculares, que são explicados ou completam dados de outros trabalhos que visam elucidar os efeitos da obesidade no músculo esquelético. Contudo, o amplo conhecimento da obesidade não se estende aos componentes estruturais das fibras musculares, os sarcômeros, principalmente na região de interface entre o músculo e o tendão que sofre com cargas excessivas.

A região da JMT tem sido evidenciada como um local de grandes variações nos comprimentos sarcoméricos, conforme foram descritos por Rocha et al. (2020) e Sierra et al. (2018). Especificamente o último sarcômero do miofilamento, denominado de sarcômero distal, possui uma especialidade funcional devido à sua localização adjacente à JMT. Com isso, as alterações nos sarcômeros distais estão relacionadas à adaptação compensatória da obesidade, que indica as repercussões do aumento da transmissão de força pela interface miotendínea.

Além disso, quando observamos os menores sarcômeros na JMT do músculo TA de ratos obesos, é possível associar à necessidade de maior produção de força causada pela sobrecarga adiposa, visto que sarcômeros mais curtos apresentam maior força relativa devido à sensibilidade ao Ca^{2+} , conforme descrito por MacIntosh (2017). Ao mesmo tempo, os menores sarcômeros demonstram propensão reduzida a “*popping*” (ALLEN, 2004), e possivelmente promovem maior estabilidade para a região JMT de ratos obesos.

Inusitadamente, após a indução da obesidade, o músculo SO demonstrou adaptações sarcoméricas distintas do TA, no qual os sarcômeros distais apresentaram comprimentos maiores em ratos obesos, que provavelmente implicam na redução da produção de força e, conseqüentemente, na transmissão pela JMT e estabilidade da região de interface. Além disso, a diminuição da sobreposição entre os miofilamentos devido aos maiores comprimentos sarcoméricos, está diretamente relacionada à maior suscetibilidade a “*popping*” (CHOI, 2014).

Nas projeções sarcoplasmáticas que caracterizam a JMT, existem diversos trabalhos que comprovam o remodelamento de seu formato, comprimento ou disposição diante de várias estímulos externos e internos (CURZI et al., 2012; FRENETTE e CÔTÉ, 2000; NIELSEN et al., 2018; RICCETTI et al., 2020; SIERRA et al., 2018). Palma et al. (2011) e Jacob et al. (2019) demonstraram a redução da área de interface músculo-tendão em modelos experimentais (desuso e sarcopenia) que se assemelham com a obesidade, visto que resultam na atrofia muscular.

Na JMT do músculo TA de ratos obesos, observamos invaginações e evaginações sarcoplasmáticas curtas, que indicam menor interação entre o tecido muscular e tendíneo (CURZI et al., 2013), e possivelmente implicam em um local de ancoragem reduzido.

Entretanto, no músculo SO, a obesidade resultou em invaginações e evaginações sarcoplasmáticas com maiores comprimentos, provavelmente

relacionadas ao aumento da deposição de colágeno decorrente da obesidade induzida por dieta hiperlipídica descrita por Pincu et al. (2015), visto que a JMT é composta por vários tipos de colágenos (JACOBSON et al., 2020). Tais adaptações na JMT do SO aumentam a área de contato entre o tecido muscular e tendíneo, proporcionando distribuição vantajosa das forças contráteis em toda a interface JMT (CURZI et al., 2016), além do mais, esta é uma modulação compensatória para reduzir a fragilidade desencadeada pelos sarcômeros adjacentes.

Na JMT do SO, também observamos a presença de algumas estruturas excepcionais nessa região, sendo um grupo mitocondrial subsarcolemal, que provavelmente está relacionado à disfunção mitocondrial induzida por dieta rica em gordura (VALERIO et al., 2006), e um núcleo de fibra muscular adjacente JMT, que indica a alta atividade celular nessa região (CIENA et al., 2012b).

Além disso, observamos a presença de gotículas lipídicas intramiocelulares próximas a JMT de ambos os músculos (TA e SO) de ratos obesos, as quais provocam mudanças estruturais deletérias, visto que repercutem em alterações mecânicas no músculo e prejudicam o encurtamento dos sarcômeros (ANDRICH et al., 2018). Esse é o primeiro estudo que relata sua localização adjacente a JMT após a indução da obesidade, que sugerem o impacto negativo das gotículas lipídicas na estrutura e a função da região de interface musculotendínea.

Ao longo de nossos resultados, surpreendentemente observamos que a obesidade promove diferentes adaptações nos sarcômeros e nas projeções sarcoplasmáticas dos músculos analisados. As respostas específicas de cada músculo foram descritas anteriormente por Tallis et al. (2018), associado ao distinto predomínio fenotípico e funcional dos músculos TA (glicolítico) e SO (oxidativo), ambos com ações distintas na locomoção. Contudo a relação entre o fenótipo muscular e a adaptação ultraestrutural da JMT é inusitada.

Diante disso, demonstramos que a adaptação da JMT é específica para o fenótipo muscular, corroborando pelo estudo de Collins et al. (2017), que indica o predomínio oxidativo do SO como mecanismo de proteção contra os efeitos nocivos na integridade estrutural e metabólica provocada pela dieta hiperlipídica. Porém, os autores realizaram a indução da obesidade por 4 semanas, enquanto em nosso estudo os animais foram submetidos a dieta hiperlipídica por 8 semanas (COLLINS et al., 2017).

Por fim, gostaríamos de esclarecer que nosso estudo teve limitações em variáveis diretamente relacionadas aos efeitos da obesidade (ou seja, acúmulo de lipídios/glicogênio, colesterol, triglicerídeos e teste de glicose no sangue), o que poderia ter fornecido perspectivas essenciais sobre as influências da obesidade.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em ratos promove adaptações semelhantes nas fibras musculares dos músculos TA e SO. No entanto, na região JMT, as projeções sarcoplasmáticas (invaginações e evaginações sarcoplasmáticas) e sarcômero adjacente (sarcômero distal) demonstram adaptações diferentes de acordo com os distintos fenótipos musculares. Futuros estudos podem ser realizados para entender a influência dos mecanismos moleculares da obesidade envolvidos na plasticidade da JMT.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, L. M.; RAYA, A. I.; RÍOS, R.; AGUILERA-TEJERO, E.; RIVERO, J. L. Obesity-induced discrepancy between contractile and metabolic phenotypes in slow- and fast-twitch skeletal muscles of female obese Zucker rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 123, n. 1, p. 249–259, 2017.
- ALLEN, D. G. Skeletal muscle function: Role of ionic changes in fatigue, damage and disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 8, p. 485–493, 2004.
- ANDRICH, D. E.; OU, Y.; MELBOUCI, L.; LEDUC-GAUDET, J.; AUCLAIR, N.; MERCIER, J.; SECCO, B.; TOMAZ, L. M.; GOUSPILLOU, G.; DANIALOU, G.; COMTOIS, A.; ST-PIERRE, D. H. Altered lipid metabolism impairs skeletal muscle force in young rats submitted to a short-term high-fat diet. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 1327, p. 1–12, 2018.
- BARROSO, R.; TRICOLI, V.; UGRINOWITSCH, C. Adaptações neurais e morfológicas ao treinamento de força com ações excêntricas. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 2, p. 111–121, 2005.
- BOFF, S. R. The muscle fiber and the factors that interfere with its phenotype. **Acta Fisiatrica**, v. 15, n. 2, p. 111–116, 2008.
- BUCCI, M.; VINAGRE, E. C.; CAMPOS, G. E. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Efeitos do treinamento concomitante hipertrofia e endurance no músculo esquelético. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 13, n. 1, p. 17–28, 2005.
- CHANSEAUME, E.; MALPUECH-BRUGÈRE, C.; PATRAC, V.; BIELICKI, G.; ROUSSET, P.; COUTURIER, K.; SALLES, J.; RENOU, J.; BOIRIE, Y.; MORIO, B. Diets high in sugar, fat, and energy induce muscle type-specific adaptations in mitochondrial functions in rats. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 8, p. 2194–2200, 2006.
- CHEN, X.; DELP, S. L. Human soleus sarcomere lengths measured using in vivo microendoscopy at two ankle flexion angles. **Journal of Biomechanics**, v. 49, n. 16, p. 4164–4167, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2016.11.010>>.
- CHOI, S. J. Cellular mechanism of eccentric-induced muscle injury and its relationship with sarcomere heterogeneity. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 10, n. 4, p. 200–204, 2014.
- CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; ALMEIDA, S. R. Y.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011–1014, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2010.04.006>>.

CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; BOLINA, C. S.; BOLINA-MATOS, R. S.; RICCI, R. E. G.; SILVA, M. C. P.; MIGLINO, M. A.; WATANABE, I. 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, 2012a.

CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; DIAS, F. J.; BOLINA, C. S.; ISSA, J. P. M.; IYOMASA, M. M.; OGAWA, K.; WATANABE, I. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastric muscle and intermediate tendon in adults rats. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 258–262, 2012b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.08.009>>.

CLEMMENSEN, C.; PETERSEN, M. B.; SØRENSEN, T. I. A. Will the COVID-19 pandemic worsen the obesity epidemic? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 9, p. 469–470, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41574-020-0387-z>>.

COLLINS, K. H.; HART, D. A.; SMITH, I. C.; ISSLER, A. M.; REIMER, R. A.; SEERATTAN, R. A.; RIOS, J. L.; HERZOG, W. Acute and chronic changes in rat soleus muscle after high-fat high-sucrose diet. **Physiological Reports**, v. 5, n. 10, p. 1–10, 2017.

COLLINS, K. H.; HERZOG, W.; MACDONALD, G. Z.; REIMER, R. A.; RIOS, J. L.; SMITH, I. C.; ZERNICKE, R. F.; HART, D. A. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: Common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 112, 2018.

COUTURIER, A.; RINGSEIS, R.; MOOREN, F.; KRÜGER, F.; MOST, E.; EDER, K. Carnitine supplementation to obese Zucker rats prevents obesity-induced type I to type II muscle fiber transition and favors an oxidative phenotype of skeletal muscle. **Nutrition & Metabolism**, v. 10, n. 48, p. 1–11, 2013.

CURZI, D.; SALUCCI, S.; MARINI, M.; ESPOSITO, F.; AGNELLO, L.; VEICSTEINAS, A.; BURATTINI, S.; FALCIERI, E. How physical exercise changes rat myotendinous junctions: An ultrastructural study. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, n. 2, p. 117–122, 2012.

CURZI, D.; LATTANZI, D.; BURATTINI, S.; TIDBALL, J. G.; FALCIERI, E. Morphological changes of myotendinous junction generated by muscle disuse atrophy. **Microscopie**, v. 19, n. 1, p. 46–52, 2013.

CURZI, D.; SARTINI, S.; GUESCINI, M.; LATTANZI, D.; PALMA, M. D.; AMBROGINI, P.; SAVELLI, D.; STOCCHI, V.; CUPPINI, R.; FALCIERI, E. Effect of different exercise intensities on the myotendinous junction plasticity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.

DEGENS, H.; ALWAY, S. E. Control of muscle size during disuse, disease, and aging. **International Journal of Sports Medicine**, v. 27, n. 2, p. 94–99, 2006.

ELIAS, R. G. M.; FARIAS, J. P.; FARIA, W. F.; NETO, A. S.; SILVA, C. C.; RINALDI, W. Efeito do exercício físico sobre os marcadores inflamatórios de adolescentes com

excesso de peso: Uma revisão sistemática. **Revista da Educação Física**, v. 26, n. 4, p. 633–645, 2015.

FAN, Z.; XIAO, Q. Impaired autophagic flux contributes to muscle atrophy in obesity by affecting muscle degradation and regeneration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.110>>.

FRENETTE, J.; CÔTÉ, C. H. Modulation of structural protein content of the myotendinous junction following eccentric contractions. **International Journal of Sports Medicine**, v. 21, n. 5, p. 313–320, 2000.

GOMES, S. F.; SILVA, F. C.; VOLP, A. C. P. What Is the Role of Inflammatory Mediators on Energy Metabolism? **Inflammation and Cell Signaling**, p. 1–8, 2016.

GUEDES, J. M.; PIERI, B. L. S.; LUCIANO, T. F.; MARQUES, S. O.; GUGLIELMO, L. G. A.; SOUZA, C. T. Exercícios físicos de resistência, hipertrofia e força muscular reduzem igualmente adiposidade, inflamação e resistência à insulina em camundongos obesos por dieta hiperlipídica. **Einstein (São Paulo)**, v. 18, p. 1–9, 2020.

GUMINA, S.; CANDELA, V.; PASSARETTI, D.; LATINO, G.; VENDITTO, T.; MARIANI, L.; SANTILLI, V. The association between body fat and rotator cuff tear: The influence on rotator cuff tear sizes. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, v. 23, n. 11, p. 1669–1674, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jse.2014.03.016>>.

HENDERSON, C. A.; GOMEZ, C. G.; NOVAK, S. M.; MI-MI, L.; GREGORIO, C. C. Overview of the muscle cytoskeleton. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 3, p. 891–944, 2017.

HYODO, M.; KAWAKITA, S.; DESAKI, J. Scanning electron microscopic study of the muscle fiber ends at the myotendinous junction in the posterior cricoarytenoid and cricothyroid muscles in rats. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 121, n. 8, p. 953–956, 2001.

IIZUKA, K.; MACHIDA, T.; HIRAFUJI, M. Skeletal muscle is an endocrine organ. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 125, n. 2, p. 125–131, 2014.

IZAOLA, O.; LUIS, D.; SAJOUX, I.; DAMINGO, J. C.; VIDAL, M. Inflamación y obesidad (lipoinflamación). **Nutrición Hospitalaria**, v. 31, n. 6, p. 2352–2358, 2015.

JACOB, C. S.; ROCHA, L. C.; WATANBE, I.; CIENA, A. P. Effects of physical training on sarcomere lengths and muscle-tendon interface of the cervical region in an experimental model of menopause. **European Journal of Histochemistry**, v. 63, n. 3, p. 131–135, 2019.

JACOBSON, K. R.; LIPP, A. A.; LENG, Y.; BU, Y.; CALVE, S. Comparative analysis of the extracellular matrix proteome across the myotendinous junction. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 10, p. 3955–3967, 2020.

KOLB, R.; SUTTERWALA, F. S.; ZHANG, W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. **Current opinion in pharmacology**, v. 29, p. 77–89, 2016.

KOSTROMINOVA, T. Y.; CALVE, S.; ARRUDA, E. M.; LARKIN, L. M. Ultrastructure of myotendinous junctions in tendon-skeletal muscle constructs engineered in vitro. **Histology and Histopathology**, v. 24, n. 5, p. 541–550, 2009.

KRAUSE NETO, W.; SILVA, W. A.; CIENA, A. P.; ANARUMA, C. A.; GAMA, E. F. Divergent effects of resistance training and anabolic steroid on the postsynaptic region of different skeletal muscles of aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 98, p. 80–90, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.018>>.

LEE, C. H.; SHIN, S. H.; KANG, G. M.; KIM, S.; KIM, J.; YU, R.; KIM, M. Cellular source of hypothalamic macrophage accumulation in diet-induced obesity. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2019.

LEISEGANG, K.; HENKEL, R.; AGARWAL, A. Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 82, n. 5, p. 1–14, 2019.

LIEBER, R. L.; WARD, S. R. Skeletal muscle design to meet functional demands. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1570, p. 1466–1476, 2011.

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.

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, n. 187, p. 1–9, 2016.

MOURA, L. P.; DALIA, R. A.; ARAÚJO, M. B.; SPONTON, A. C. S.; PAULI, J. R.; MOURA, R. F.; MELLO, M. A. R. Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos à uma dieta. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 6, p. 685–693, 2012.

NATALI, L. H.; SILVA, T. S.; CIENA, A. P.; PADOIN, M. J.; ALVES, E. P. B.; ARAGÃO, F. A.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos da corrida em esteira em músculos sóleos de ratos encurtados por imobilização. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 6, p. 490–493, 2008.

NIELSEN, K. B.; LAL, N. N.; SHEARD, P. W. Age-related remodelling of the myotendinous junction in the mouse soleus muscle. **Experimental Gerontology**, v. 104, p. 52–59, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.01.021>>.

PALMA, L. D.; MARINELLI, M.; PAVAN, M.; BERTONI-FREDDARI, C. Involvement of the muscle-tendon junction in skeletal muscle atrophy: An ultrastructural study. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 52, n. 1, p. 105–109, 2011.

PELLEGRINELLI, V.; ROUAULT, C.; RODRIGUEZ-CUENCA, S.; ALBERT, V.; EDOM-VOVARD, F.; VIDAL-PUIG, A.; CLÉMENT, K.; BUTLER-BROWNE, G. S.; LACASA, D. Human adipocytes induce inflammation and atrophy in muscle cells during obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 9, p. 3121–3134, 2015.

PICCHI, M. G.; MATTOS, A. M.; BARBOSA, M. R.; DUARTE, C. P.; GANDINI, M. A.; PORTARI, G. V.; JORDÃO, A. A. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 25–30, 2011.

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. 14124, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70971-6>>.

PINCU, Y. LINDEN, M. A.; ZOU, K.; BAYNARD, T.; BOPPART, M. D. The effects of high fat diet and moderate exercise on TGF β 1 and collagen deposition in mouse skeletal muscle. **Cytokine**, v. 73, n. 1, p. 23–29, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.013>>.

PIOVESAN, R. F.; MARTINS, M. D.; FERNANDES, K. P. S.; BUSSADORI, S. K.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. **Fisioterapia em Movimento**, v. 22, n. 2, p. 211–220, 2009. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/public/7/archive/0007-00002704-ART07.PDF>>.

QAISAR, R.; BHASKARAN, S.; VAN REMMEN, H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 56–67, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>>.

QIU, S.; MINTZ, J. D.; SALET, C. D.; HAN, W.; GIANNIS, A.; CHEN, F.; YU, Y.; SU, Y.; FULTON, D. J.; STEPP, D. W. Increasing muscle mass improves vascular function in obese (db/db) Mice. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 3, p. 1–18, 2014.

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. 134–145, 2017.

RICCETTI, M.; OPPLERT, J.; DURIGAN, J. L. Q.; COMETTI, C.; BABULT, N. Acute Static Stretching Results in Muscle-Specific Alterations amongst the Hamstring Muscles. **Sports**, v. 8, n. 9, p. 119, 2020.

RINGSEIS, R.; EDER, K.; MOOREN, F.; KRÜGER, K. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. **Exercise and Innate Immune Activation**, p. 58–68, 2015.

ROCHA, L. C.; PIMENTEL NETO, J.; SANT'ANA, J. S.; JACOB, C. S.; BARBOSA, G. K.; KRAUSE NETO, W.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Repercussions on sarcomeres of the myotendinous junction and the myofibrillar type adaptations in response to different trainings on vertical ladder. **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 10, p. 1190–1197, 2020.

SERTIE, R. A. L.; CURI, R.; OLIVEIRA, A. C.; ANDREOTTI, S.; CAMINHOTTO, R. O.; LIMA, T. M.; PROENÇA, A. R. G.; REIS, G. B.; LIMA, F. B. The mechanisms involved in the increased adiposity induced by interruption of regular physical exercise practice. **Life Sciences**, v. 222, p. 103–111, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.051>>.

SIERRA, L. R.; FÁVARO, G.; CERRI, B. R.; ROCHA, L. C.; ALMEIDA, S. R. Y.; WATANABE, I.; CIENA, A. P. Myotendinous junction plasticity in aged ovariectomized rats submitted to aquatic training. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 8, p. 816–822, 2018.

SOLTANI, N.; MARANDI, S. M.; KAZEMI, M.; ESMAEIL, N. The Exercise Training Modulatory Effects on the Obesity-Induced Immunometabolic Dysfunctions. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 785–810, 2020.

TALLIS, J.; JAMES, R. S.; SEEBACHER, F. The effects of obesity on skeletal muscle contractile function. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n.13, 2018.

TOGOE, E. B.; SILVA, I. S.; CURY, J. L.; GUARNIER, F. A. Muscle changes with high-intensity aerobic training in an animal model of renal disease 1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 34, n. 5, 2019.

TOMLINSON, D. J.; ERSKINE, R. M.; MORSE, C. I.; WINWOOD, K.; ONAMBÉLÉ-PEARSON, G. The impact of obesity on skeletal muscle strength and structure through adolescence to old age. **Biogerontology**, v. 17, n. 3, p. 467–483, 2016.

TROTTER, J. A. Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 133, n. 4, p. 1127–1133, 2002.

VALERIO, A.; CARDILE, A.; COZZI, V. BRACALE, R.; TEDESCO, L.; PISCONTI, A.; PISCONTI, A.; PALOMBA, L.; CANTONI, O.; CLEMENTI, E.; MONCADA, S.; CARRUA, M. O.; NISOLI, E. TNF- α downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 10, p. 2791–2798, 2006.

WANG, X.; ZHAO, D.; CUI, Y.; LU, S.; GAO, D.; LUI, J. Proinflammatory macrophages impair skeletal muscle differentiation in obesity through secretion of tumor necrosis factor- α via sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 3, p. 2566–2580, 2018.

YUAN, C.; ARORA, A.; GAROFALO, A. M.; GRANGE, R. W. Potential cross-talk between muscle and tendon in Duchenne muscular dystrophy. **Connective Tissue**

Research, p. 1–13, 2020. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1080/03008207.2020.1810247>>.

ANEXOS

- Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA (nº14/2019)

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de Rio Claro

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

DECISÃO CEUA Nº 14/2019

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 20/03/2019	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Nova perspectiva sobre adaptação sarcomérica na junção miotendínea em modelo experimental de obesidade associado ao treinamento de esteira", protocolo nº 1988, sob responsabilidade de Adriano Polican Ciena (Pesquisador Responsável), e Bruna Aléxia Cristofolletti Grillo (orientanda) 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: -----	
A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 40ª reunião ordinária , realizada em 05.06.2019 .	
(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: 01/7/19 a 01/07/20	
Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica	
Espécie/linhagem/raça: rato isogênico (<i>Wistar</i>) Número de animais: 32 Peso: 300g	
Idade: 90 dias Sexo: Machos	
Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério Central da Unesp de Botucatu.	
Objetivo Acadêmico:	☒ TCC ☐ Mestrado ☐ Doutorado ☐ Outros – (Iniciação Científica) ☐ Pós- Graduação

Rio Claro, 05/06/2019

Marco A. Pizo
 Prof. Dr. Marco Aurélio Pizo Ferreira
 Coordenador

- Apresentação de trabalho no Congresso Nacional de Educação Física (2018)



- Apresentação de trabalho na 1ª fase do 30º Congresso de Iniciação Científica (2018)



Certificamos que o trabalho intitulado "OS SARCÔMEROS EM SÉRIES APRESENTAM COMPRIMENTOS DIFERENTES? CARACTERIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DAS ADAPTAÇÕES NA JUNÇÃO MIOTENDÍNEA DE RATOS OBESOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO AERÓBICO" foi apresentado na 1ª fase do 30º Congresso de Iniciação Científica da Unesp, na cidade de Rio Claro - SP, no período de 04 a 05 de setembro de 2018, por Bruna Alécia Cristofolletti Grillo, na forma Oral, orientada pelo Prof. Adriano Polican Ciena.

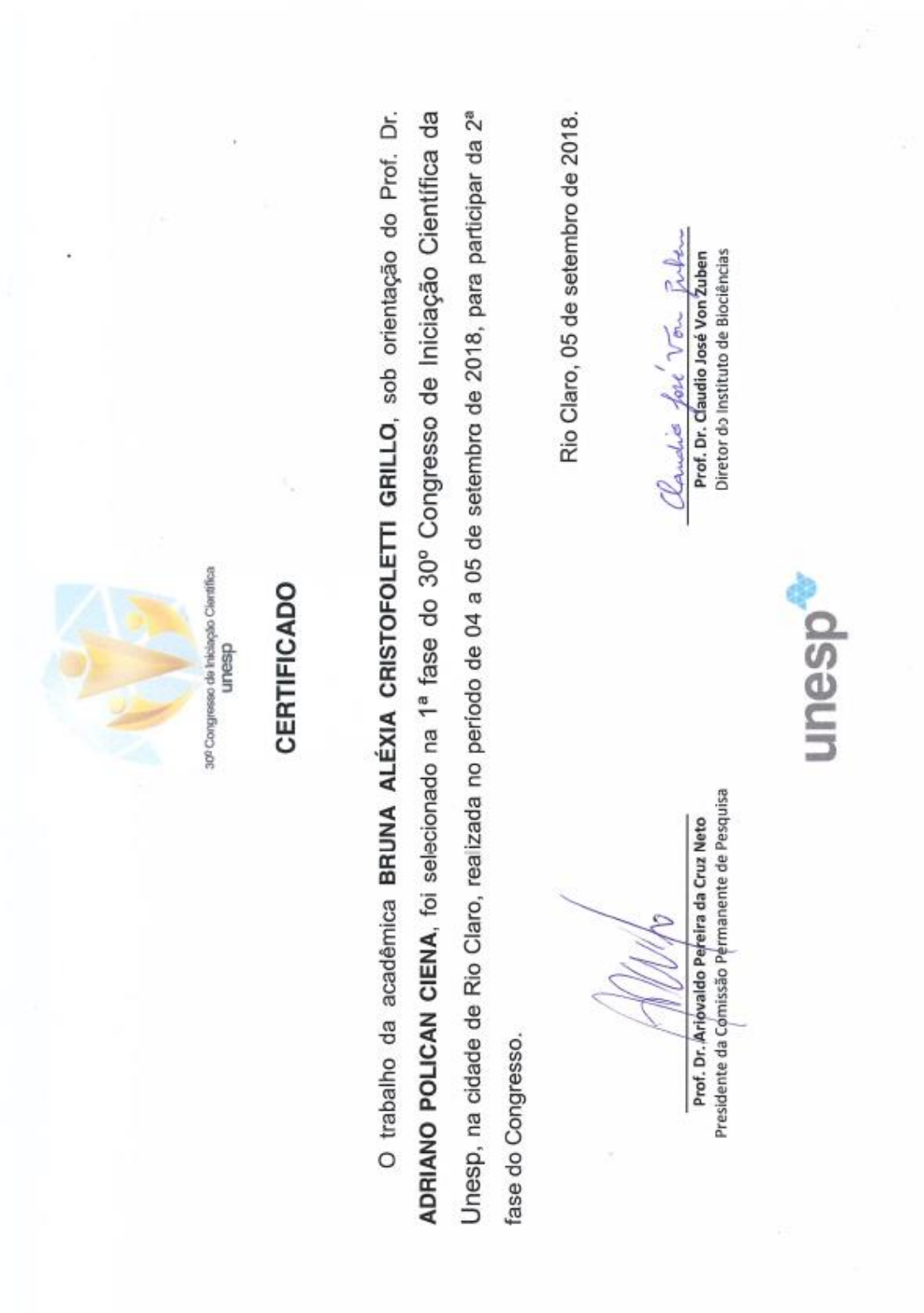
Rio Claro, 05 de setembro de 2018

Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff
Pró-Reitor de Pesquisa

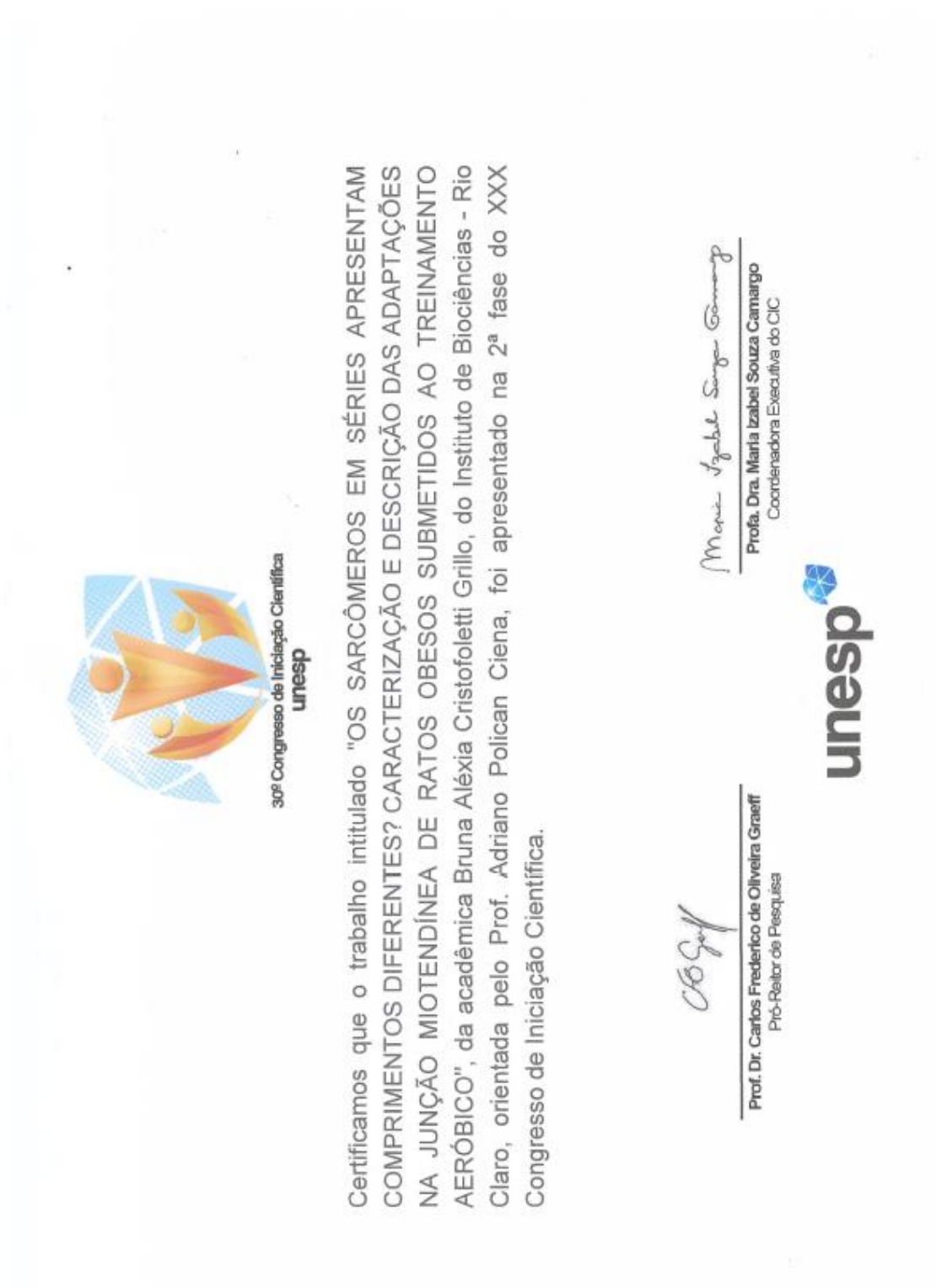
Prof. Dra. Maria Izabel Souza Camargo
Coordenadora Executiva do CIC



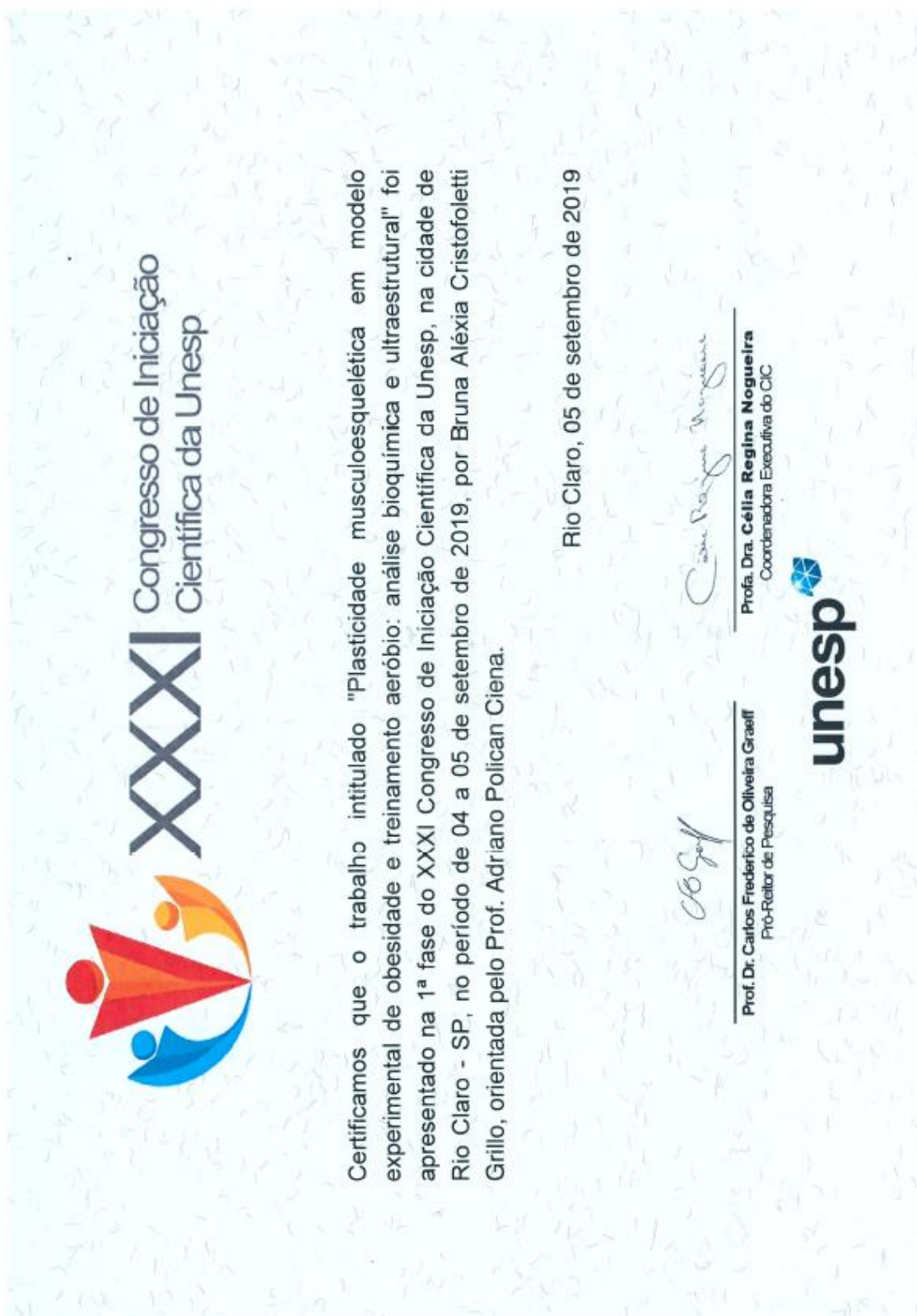
- Premiação na 1ª fase do 30º Congresso de Iniciação Científica (2018)



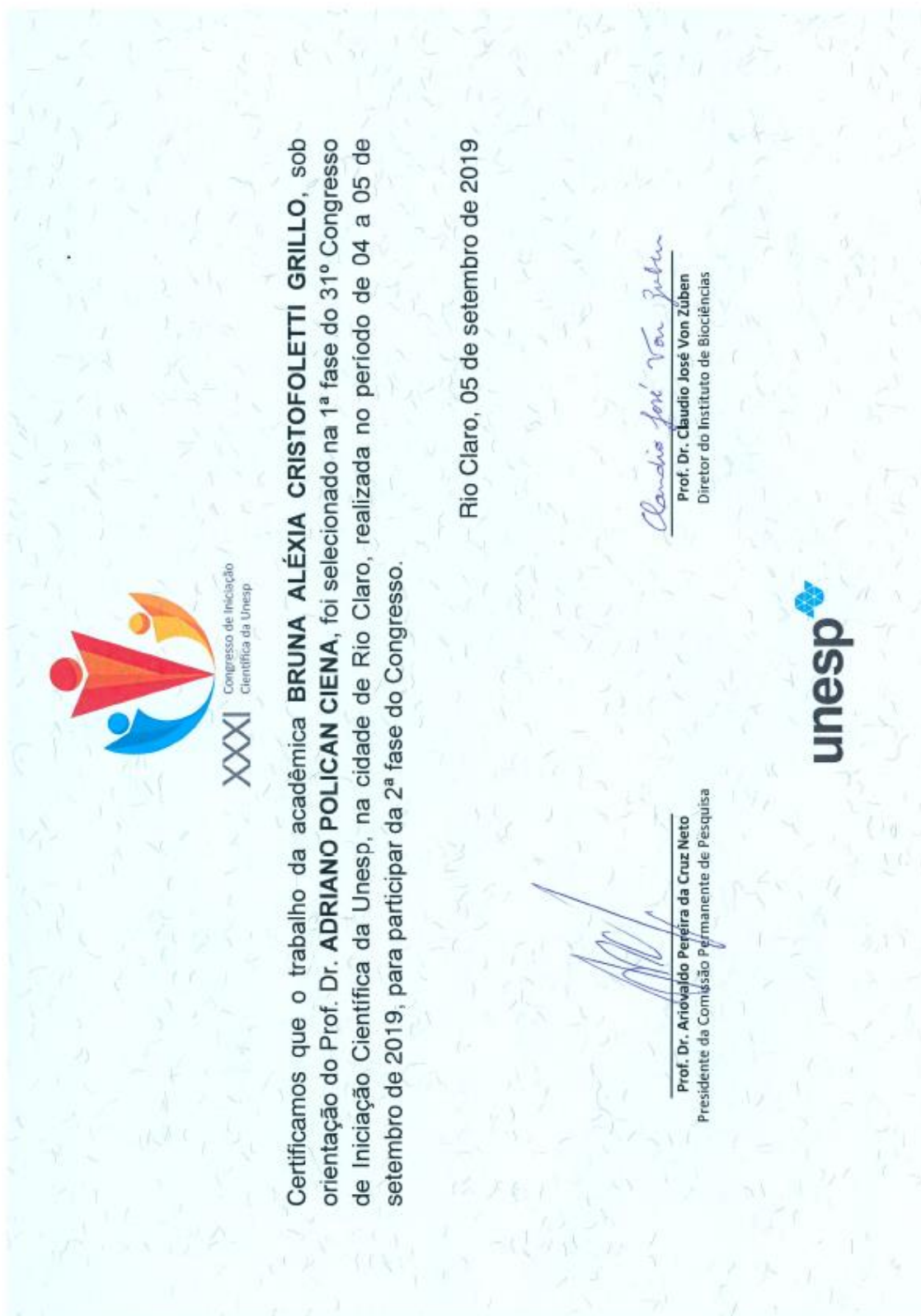
- Apresentação de trabalho na 2ª fase do 30º Congresso de Iniciação Científica (2018)



- Apresentação de trabalho na 1ª fase do 31º Congresso de Iniciação Científica (2019)



- Premiação na 1ª fase do 31º Congresso de Iniciação Científica (2019)



- Apresentação de trabalho na 2ª fase do 30º Congresso de Iniciação Científica (2019)



- Apresentação de trabalho na XXXIV Reunião Anual da FeSBE (2019)

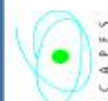


CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 11.017 - MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE MYOTENDINOUS JUNCTION AND SARCOMERES IN OBESE RATS TRAINED - Grillo BAC, Rocha LC, Neto JP, Jacob CS, Ciena AP, Educação Física - UNESP foi apresentado na forma de painel durante a XXXIV Reunião Anual da FeSBE, realizado de 09 de setembro de 2019 a 13 de setembro de 2019 no Campos do Jordão Convention Center.


 Prof. Dr. Hernandes Fajstino de Carvalho
 Presidente da FeSBE


 Prof. Dra. Ana Paula Couto Davel
 1º Secretário Geral da FeSBE



- Menção honrosa na XXXIV Reunião Anual da FeSBE (2019)

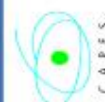


CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 11.017 - MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE MYOTENDINOUS JUNCTION AND SARCOMERES IN OBESE RATS TRAINED - Grillo BAC, Rocha LC, Neto JP, Jacob CS, Ciena AP, Educação Física - UNESP foi contemplado com MENÇÃO HONROSA durante a XXXIV Reunião Anual da FeSBE, realizado de 09 de setembro de 2019 a 13 de setembro de 2019 no Campos do Jordão Convention Center.


 Prof. Dr. Hernandes Fajstino de Carvalho
 Presidente da FeSBE


 Prof. Dra. Ana Paula Couto Davel
 1º Secretário Geral da FeSBE



- Apresentação de trabalho na 1ª fase do 32º Congresso de Iniciação Científica (2020)





Bruna Aléxia Cristofolletti Grillo



Prof. Dr. Adriano Polican Ciena