UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Biologia Celular, Molecular e Microbiologia

TELÓCITOS E CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN: REPERCUSSÃO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MUSCULAR

JURANDYR PIMENTEL NETO
ORIENTADOR: PROF. DR. ADRIANO POLICAN CIENA

RIO CLARO - SP
2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Biologia Celular, Molecular e Microbiologia

TELÓCITOS E CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN: REPERCUSSÃO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MUSCULAR

JURANDYR PIMENTEL NETO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientador: Dr. Adriano Polican Ciena.

RIO CLARO - SP
2025

P644t

Pimentel Neto, Jurandyr
Telócitos e Células Perissinápticas de Schwann: Repercussão na Junção Neuromuscular em Modelo Experimental de Lesão Muscular / Jurandyr Pimentel Neto. -- Rio Claro, 2025
109 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Adriano Polican Ciena

1. junção neuromuscular. 2. lesão muscular. 3. células perissinápticas de Schwann. 4. kranócitos. 5. telócitos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: TELÓCITOS E CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN: REPERCUSSÃO NA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO MUSCULAR

AUTOR: JURANDYR PIMENTEL NETO

ORIENTADOR: ADRIANO POLICAN CIENA

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

gov.br Documento assinado digitalmente
ADRIANO POLICAN CIENA
Data: 19/06/2025 12:16:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. ADRIANO POLICAN CIENA (Participaçao Presencial)
Departamento de Educacao Fisica / UNESP - Instituto de Biociencias de Rio Claro - SP

gov.br Documento assinado digitalmente
ELIANE FLORENCIO GAMA
Data: 18/06/2025 13:08:00-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. ELIANE FLORENCIO GAMA (Participaçao Virtual)
Departamento de Morfologia e Genética / Universidade Federal de São Paulo / SP

Profa. Dra. ANDREA APARECIDA DE ARO (Participaçao Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / UNESP - Instituto de Biociencias de Rio Claro - SP

gov.br Documento assinado digitalmente
ANDREA APARECIDA DE ARO
Data: 18/06/2025 14:50:11-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

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

gov.br Documento assinado digitalmente
ROBSON CHACON CASTOLDI
Data: 18/06/2025 13:04:59-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Rio Claro, 18 de junho de 2025

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que são minha maior inspiração, a minha namorada e futura esposa Ananda, que esteve ao meu lado, quando sofri, chorei e sorri.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2021/10471-7. Este permitiu o acesso a todos os recursos que proporcionaram a compra de materiais de consumos, viagens nacionais e internacionais, apresentações em congressos e ajuda de custo nas futuras publicações. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento parcial deste trabalho, e pela possibilidade de acesso a todos os recursos que proporcionaram a compra de materiais de consumos e viagens.

Aos animais que foram utilizados em todos os grupos experimentais e deram a vida para que este estudo fosse testado, executado e concluído. Uma prece!

A Profa. Dra. Marucia Chacur ICB III - USP São Paulo - SP, pela contribuição com o empréstimo de anticorpos e materiais de consumo que proporcionaram a conclusão das provas e contraprovas deste trabalho, além da contribuição em projetos paralelos e futuros em andamento.

A Dra. Sarah Ingrid Pinto Santos pelo auxílio no aprendizado da técnica de Cultivo Celular e Citometria de Fluxo e pela amizade acadêmica estabelecida através desta colaboração, e ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio por disponibilizar a infraestrutura do laboratório do Grupo de Terapias Inovadoras (GDTI) da FZEA-USP Pirassununga – SP e a Profa. Dra. Fabiana Bressan pela contribuição na execução da técnica de citometria de fluxo.

Ao técnico José Roberto Rodrigues da Silva “Beto”, pelo auxílio e colaboração na manutenção e infraestrutura do Laboratório de Morfologia (LAMAF), e por toda a paciência e contribuição durante a realização do preparo das soluções em diversos testes relacionados às colorações para as técnicas de microscopia de luz.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e seus orientandos do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) da UNESP de Rio Claro - SP e ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e o técnico Renato do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ USP Piracicaba - SP, por disponibilizarem os microscópios de fluorescência para aquisição das imagens que contribuíram com a grande descoberta deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Igor Luchini Baptista e a Ma. Isabella Divino LabCET UNICAMP Limeira - SP, pela introdução e acompanhamento no aprendizado da técnica de qPCR.

Ao Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto e ao Ms. Lourenço Ruivo, do Laboratório de Imunometabolismo do ICBI USP São Paulo - SP, pela assistência na padronização da técnica de qPCR e pela possibilidade de realização dos testes em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Jonas Contiero (coordenador) e ao doutorando Rafael do Laboratório de Microbiologia Industrial do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro - SP, pelo acompanhamento e liberação do laboratório, e para o uso do aparelho QuantStudio 3 que possibilitou a conclusão das análises de expressão gênica.

A Profa. Dra. Paula Oliveira Camargo pela contribuição na execução do protocolo em diversas oportunidades e padronização final da técnica de qPCR. Muito obrigado por ter a paciência e a esperança, que eu já havia perdido, em relação à técnica e a possibilidade de conclusão destes resultados.

Aos colegas do LAMAF que contribuíram de alguma forma para a execução das etapas durante os 4 anos que se passaram. Especialmente aos amigos, a Dra. Lara Caetano Rocha-Braga por todas as ideias, momentos de descontração e desabafos e por ser uma grande amiga em todas as etapas, você será uma mãe incrível e espero poder continuar trabalhando em conjunto em futuros projetos! Ao Me. Matheus Bertanha Fior, por ser um grande companheiro no dia a dia de tarefas, organização de laboratório e que me ajudou a evoluir como pessoa, espero que tenha aprendido com meus conselhos, e que continue seu caminho e jamais desista de seus sonhos.

Um agradecimento a aqueles que passaram por minha vida, que criticaram, não contribuíram como poderiam, deixaram de ser verdadeiros, em certos momentos desacreditaram da importância deste projeto e até da minha pessoa como profissional. Vocês me motivaram a evoluir, e por mais que em certos momentos eu tenha duvidado assim como vocês do meu potencial, hoje consigo entender, e espero que vocês um dia também entendam, um grande abraço e sigam em paz.

A aqueles que me permitiram o crescimento, a evolução e não deixaram de acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Adriano, a quem carinhosamente chamo de Mestre, obrigado por aceitar que eu trabalhasse em seu laboratório no ano de 2015, hoje 10 anos depois eu vou me tornar doutor, e tudo começou com a oportunidade que o senhor me proporcionou. Agradeço pelas orientações, conselhos acadêmicos, conselhos da vida, pelas risadas e principalmente pela amizade. Obrigado por continuar acreditando na possibilidade de que um dia eu serei um grande profissional, pesquisador e professor. Se eu conseguir 10% do que o senhor conquistou na vida acadêmica mesmo diante de tantas dificuldades, estarei contente e prometo progredir, sempre acreditar e jamais desistir, que continuemos nossa parceria, até que não haja mais perguntas sobre a junção miotendínea e sobre os telócitos, ou seja, até o fim de nossas carreiras.

Ao meu amor, minha pequena Ananda Leoni Ribeiro, futura doutora, que não desistiu da carreira acadêmica mesmo diante das dificuldades que passamos juntos, em nossa casinha de aluguel, com as contas apertadas, com minha falta de paciência em diversos momentos, quando sorri por ganhar a bolsa FAPESP, quando chorei por não conseguir ir pra Escócia, quando sofri em silêncio por não passar nos concursos que prestei e mesmo assim você jamais deixou de estar ao meu lado me apoiando. Obrigado por existir, me desculpe por todos os momentos em que não pude ser uma pessoa melhor. Sei que estou te devendo um pedido, ele virá em breve, eu prometo. Eu te amo, e estarei aqui com você sempre, assim como você sempre esteve comigo, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença.

Aos meus pais, eu esperei meses para iniciar este parágrafo de agradecimento, pois, por mais que eu descreva o que sinto, mencione tudo o que já fizeram por mim, sinto que nada seria o suficiente. Obrigado por me colocarem nesse mundo, por acreditarem em mim, por me apoiarem em todos os momentos da vida, principalmente nesta etapa, espero que estejam orgulhosos e felizes por esta conquista, ela não é só minha, ela também é de vocês e por vocês.

Mãe, eu amo você, me desculpe por me tornar uma pessoa mais séria e fria neste momento de tensão e estresse, só quero poder mostrar para você o quanto estou batalhando para me tornar uma pessoa bem-sucedida, não financeiramente, mas em relação a minha independência. Você sabe que lá no fundo, aquele ser humano, alegre e bem-humorado existe, vou melhorar e evoluir para voltar a ser esta pessoa. Obrigado por sempre ser minha amiga, minha conselheira, minha querida mãe.

Pai, hoje eu entendo o que você passou nesta etapa da sua vida, sei que não foi fácil, me sinto cada vez mais como o senhor, e tenho a certeza de que tudo vai ficar bem, porque vejo o que o senhor se tornou, sempre uma pessoa melhor, justo, bondoso e com sua forma única de amor, mesmo diante das dificuldades, nunca deixou de me ajudar, e de fazer de tudo para que eu conquistasse o mundo, eu te amo.

EPÍGRAFE

“A construção de um legado é feita dia após dia. Quando o guerreiro não possui mais forças para continuar, sua vontade de vencer o mantém de pé.” (Autor desconhecido).

RESUMO

A junção neuromuscular (JNM) é a região de comunicação entre o sistema nervoso periférico e o músculo estriado esquelético, composta por 3 elementos (tríade), o axônio do neurônio motor, o sarcolema da fibra muscular e as células perissinápticas de Schwann (CPS). Em 2009, um 4° elemento celular (kranócito) foi identificado nesta região caracterizado pelo encapsulamento da tríade, poucos autores consideraram este elemento e assim pouco se sabe sobre sua função. Nos últimos anos, um elemento celular de origem estromal foi identificado em diferentes tecidos, presente no interstício e caracterizado por suas projeções delgadas de comunicação, o telócito. Alterações na JNM como a lesão muscular, desencadeiam adaptações que podem influenciar negativamente sua estrutura. Diante disso, o objetivo do presente estudo consistiu em revelar as adaptações da JNM, em modelo experimental de lesão muscular em período agudo, e identificar os telócitos e inclui-lo como elemento desta região de forma inédita. Para o experimento, foram utilizados 60 ratos (75 dias) *Wistar* machos divididos em 5 Grupos: Controle (C) - não realizaram protocolo; Lesão Muscular (LM) 0h, 24h, 48h e 7d, foi realizado o protocolo de lesão muscular no músculo gastrocnêmio direito por meio de inserção de agulha. Após os períodos pós protocolo, os animais foram pesados, as amostras do músculo gastrocnêmio foram dissecadas, mensuradas, e processadas para as técnicas: de Microscopia de luz para análise dos núcleos celulares e tecido conjuntivo associado com a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius Red (PS) respectivamente, onde foram mensuradas a área e a porcentagem da área; a técnica de imunomarcação foi empregada para a identificação e mensuração das regiões pré e pós-sinápticas e dos canais de cálcio (P/Q) e para identificação das CPS (S100β) e dos telócitos (CD34); o cultivo celular foi realizado para a diferenciação de telócitos e CPS e aplicação para citometria de fluxo; por fim, foi realizada a análise de expressão gênica (qPCR) para os genes de interesse. A massa corporal apresentou redução apenas no Grupo LM24h, em relação a massa muscular, o aumento foi progressivo em todos os grupos. Na microscopia de luz observou-se o acúmulo de núcleos e de tecido conjuntivo associado na região do ventre muscular nos grupos LM24h e LM48h. Quanto às análises morfo quantitativas, as regiões pré-sinápticas e os canais de cálcio apresentaram com sutil redução estrutural em 0h e 48h e aumento em 48h, já os receptores pós-sinápticos apresentaram redução progressiva. As CPS foram identificadas em todos os grupos experimentais e associadas aos receptores pós-sinápticos, assim como os telócitos de forma inédita. O cultivo celular foi realizado e as células de interesse foram utilizadas para a citometria de fluxo, onde as CPS puderam ser diferenciadas em relação aos telócitos. Na análise de expressão gênica observamos aumento para NG2 em 48h, para NRG1 em 48h e 7d e para Agrina aumento progressivo em 0h até 48h, e 7d. Concluímos que o protocolo proposto afetou diretamente estrutura neuromuscular, principalmente a região pós-sináptica. Os telócitos foram identificados na região da JNM, o que comprova sua atuação na região de interesse, desta forma, frente as características e as descrições da literatura sobre as CPS e os kranócitos, pudemos estabelecer que os kranócitos devem ser considerados telócitos e definidos como 4° elemento desta região.

Palavras-chave: Junção neuromuscular, lesão muscular, células perissinápticas de Schwann, kranócitos, telócitos.

ABSTRACT

The neuromuscular junction (NMJ) is the region of communication between the peripheral nervous system and skeletal striated muscle, composed of three elements (triad): the motor neuron axon, the muscle fiber sarcolemma, and the perisynaptic Schwann cells (PSC). In 2009, a fourth cellular element (kranocyte) was identified in this region, characterized by the encapsulation of the triad. Few authors have considered this element, and thus little is known about its function. In recent years, a cellular element of stromal origin has been identified in various tissues, present in the interstitium and characterized by its thin communication projections: the telocyte. Alterations in the NMJ, such as muscle injury, trigger adaptations that can negatively influence its structure. Therefore, the objective of the present study was to reveal the adaptations of the NMJ in an experimental model of acute muscle injury, and to identify telocytes and include them as an element of this region for the first time. For the experiment, 60 male Wistar rats (75 days old) were divided into 5 Groups: Control (C) - did not perform the protocol; Muscle Injury (MI) 0h, 24h, 48h and 7d, the muscle injury protocol was conducted in the right gastrocnemius muscle using needle insertion. After the post-protocol periods, the animals were weighed, gastrocnemius muscle samples were dissected, measured, and processed for the following techniques: light microscopy for analysis of cell nuclei and associated connective tissue with hematoxylin and eosin (HE) and picrosirius red (PS) staining, respectively, where the area and percentage of the area were measured; the immunostaining technique was used to identify and measure the pre- and postsynaptic regions and calcium channels (P/Q), and to identify PSC (S100β) and telocytes (CD34); cell culture was performed for telocyte and PSC differentiation and application for flow cytometry; finally, gene expression analysis (qPCR) was performed for the genes of interest. Body mass showed a reduction only in the MI24h Group, whereas muscle mass, an increase that was progressive in all groups. Light microscopy revealed an accumulation of nuclei and associated connective tissue in the muscle belly region of the MI24h and MI48h groups. Quantitative morphological analyses revealed a subtle structural reduction in presynaptic regions and calcium channels at 0h and 48h, followed by an increase at 48h. Postsynaptic receptors showed a progressive reduction. PSCs were identified in all experimental groups and associated with postsynaptic receptors, as were telocytes for the first time. Cell culture was performed, and the cells of interest were used for flow cytometry, where PSCs could be differentiated from telocytes. Gene expression analysis showed an increase in NG2 at 48h, NRG1 at 48h and 7d, and a progressive increase in Agrin from 0h to 48h and 7d. We conclude that the proposed protocol directly affected the neuromuscular structure, especially the postsynaptic region. Telocytes were identified in the NMJ region, demonstrating their role in the region of interest. Therefore, given the characteristics and literature descriptions of PSCs and kranocytes, we can conclude that kranocytes should be considered telocytes and defined as the fourth element of this region.

Key words: neuromuscular junction, muscle injury, perisynaptic Schwann cells, kranocytes, telocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da junção neuromuscular, seus componentes e micrografia eletrônica de transmissão com a identificação das principais células. 20
Figura 2. Ilustração dos telócitos e suas comunicações intercelulares e micrografia de transmissão de um telócito com suas características. 23
Figura 3. Representação da divisão dos animais por grupo referentes aos períodos pós lesão. 28
Figura 4. Materiais e procedimentos referentes ao protocolo de lesão e coleta das amostras do músculo gastrocnêmio. 30
Figura 5. Diagrama das mensurações para as técnicas de Hematoxilina e Eosina e Picrosirius Red. 34
Figura 6. Metodologia utilizada para as mensurações das imagens de imunomarcação realizadas no software ImageJ®. 37
Figura 7. Metodologia utilizada para correção das marcações inespecíficas pré mensurações. 39
Figura 8. Dados das massas corporais dos grupos experimentais. 48
Figura 9. Dados da massa do músculo gastrocnêmio. 49
Figura 10. Cortes transversais corados com hematoxilina e eosina para identificação e descrição dos núcleos celulares. 50
Figura 11. Cortes transversais corados com Picrosirius para identificação do tecido conjuntivo associado. 51
Figura 12. Gráficos das variáveis de área obtidas através das colorações de HE e PS. 54
Figura 13. Imunomarcação com Bassoon dos receptores pré-sinápticos. 56
Figura 14. Gráficos das variáveis referentes aos receptores pré-sinápticos. 58
Figura 15. Imunomarcação dos canais de cálcio de todos os grupos experimentais. 59
Figura 16. Gráficos das variáveis dos canais de cálcio. 62
Figura 17. Imunomarcação com α-bungarotoxina dos receptores pós-sinápticos. 63
Figura 18. Médias e desvios padrões representados graficamente referentes aos receptores de AChR pós-sinápticos. 66
Figura 19. Identificação dos núcleos celulares na junção neuromuscular e das células perissinápticas de Schwann (S100β). 68
Figura 20. Identificação dos núcleos celulares e dos telócitos na JNM. 70
Figura 21. Organização do protocolo de cultivo celular primário e identificação das células de interesse. 72
Figura 22. Gráficos e dados gerados para o teste amostral de citometria de fluxo. 74
Figura 23. Dados de citometria de fluxo para positividade dos anticorpos. 75
Figura 24. Análise das amostras em gel de agarose. 77
Figura 25. Modelo de curva utilizado para padronização dos primers de interesse. 78
Os valores de expressão gênica de S100, aumentaram no período LM0h, se mantiveram ainda maiores que o Grupo C no período de LM24h e após LM48h apresentaram redução, já em LM7d retornaram aos valores de média próximos de LM7d. Figura 26. Dados de expressão gênica para os primers de interesse. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de amostras coletadas para cada análise proposta. 31
Tabela 2. Soluções utilizadas para imunomarcação. 43
Tabela 3. Primers utilizados para análise da expressão gênica. 46
Tabela 4. Organização das análises das variáveis quantitativas 47
Tabela 5. Valores em gramas dos músculos da região de interesse (ventre muscular). 76
Tabela 6. Valores referentes a quantificação de RNA (ng/µL) por amostra após a etapa de extração. 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

≠	Diferente
°C	Graus Celsius
±	Mais ou menos
µm	Micrômetro
µm²	Micrômetro quadrado
%	Porcentagem
Ach	Acetilcolina
AChR	Receptores de acetilcolina
BSA	*Bovine Serum Albumin* - Albumina Sérica Bovina
C	Controle
$CaCl^2$	Cloreto de Cálcio
cm	Centímetro
CPS	Células Perissinápticas de Schwann
DF	Dimensão Fractal
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
FBS	*Fetal Bovine Serum* - Soro Fetal Bovino
g	Gramas
GAPDH	*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
h	Horas
HE	Hematoxilina e Eosina
JNM	Junção Neuromuscular
kg	Quilograma
LM	Lesão Muscular
LM 0h	hora 0 após Lesão Muscular
LM 24h	24 horas após Lesão Muscular
LM 48h	48 horas após Lesão Muscular
LM 7d	7 dias após Lesão Muscular
M	Molar
mg/g^{-1}	Miligrama por grama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm^3	Milímetro cúbico
nº	Número
NGS	*Normal Goat Serum* – Soro Normal de Cabra
nM	Nanomolar
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PS	Picrosirius Red
s	Segundos
Un	Unidade
V	Volt
x	Multiplicação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16

1.1 JUNÇÃO NEUROMUSCULAR (JNM) 16
1.2 CÉLULAS DE SUPORTE DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR 17
1.2.1 CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN (CPS) 17

1.2.2 KRANÓCITOS 19

1.3 TELÓCITOS 20
1.4 LESÃO MUSCULAR 23
2. OBJETIVO GERAL 26

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26
3. MATERIAIS E MÉTODOS 27

3.1 ANIMAIS 27
3.2 LESÃO MUSCULAR 28
3.3 EUTANÁSIA 31
3.4 MASSA CORPORAL 31
3.5 MASSA MUSCULAR 31
3.6 ANÁLISES MICROSCÓPICAS 32
3.7 MICROSCOPIA DE LUZ 32
3.7.1 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS – MICROSCOPIA DE LUZ 33
3.8 RECEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS (BASSOON) E CANAIS DE CÁLCIO (P/Q) 34
3.9 RECEPTORES PÓS-SINÁPTICOS 35
3.10 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS – IMUNOFLUORESCÊNCIA 35
3.10.1 CORREÇÃO DE MARCAÇÃO INESPECÍFICA 38

3.11 CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN E TELÓCITOS 40
3.12 CULTIVO CELULAR 40
3.13 CITOMETRIA DE FLUXO 41
3.14. RELAÇÃO DE ANTICORPOS 43

3.15 PCR REAL TIME: EXTRAÇÃO DE RNA 44
3.15.1 PADRONIZAÇÃO 44

3.15.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA 45

3.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 47
4. RESULTADOS 48
4.1 MASSA CORPORAL 48
4.2 MASSA MUSCULAR 49
4.3 DISPOSIÇÃO DOS NÚCLEOS CELULARES 50
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO ASSOCIADO.....51
4.5 MORFOMETRIA – MICROSCOPIA DE LUZ 52
4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA – RECEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS (BASSOON).....55
4.5.1 MORFOMETRIA – RECEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS (BASSOON).....56
4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA – CANAIS DE CÁLCIO (P/Q) 58
4.6.1 MORFOMETRIA – CANAIS DE CÁLCIO (P/Q) 59
4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA – RECEPTORES PÓS-SINÁPTICOS.....62
4.7.1 MORFOMETRIA – RECEPTORES PÓS-SINÁPTICOS (AChR).....63
4.8 CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN 67
4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS TELÓCITOS 69
4.10 CULTIVO CELULAR.....71
4.11 CITOMETRIA DE FLUXO 73
4.12 PADRONIZAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA 76
4.13 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS DE INTERESSE.....78
4.13 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....79
5. DISCUSSÃO 82
6. CONCLUSÃO.....92
REFERÊNCIAS 94
APÊNDICE 1 107

1. INTRODUÇÃO

1.1 JUNÇÃO NEUROMUSCULAR (JNM)

A junção neuromuscular (JNM) é a região micro anatômica de comunicação entre o sistema nervoso periférico e o tecido muscular, esta faz intermédio entre a sinalização do sistema nervoso central com as ações somáticas do aparelho locomotor advindas da contração muscular. Além disso, é formada por três componentes principais que compõem uma tríade: o terminal axônico, o sarcolema das fibras musculares e as células perissinápticas de Schwann (CPS), que permitem a transmissão dos impulsos neuronais para que ocorra a contração muscular, a manutenção e suporte molecular na região (DARABID et al., 2014; LI et al., 2018; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2020).

Além dos elementos comumente conhecidos e abordados sobre a JNM, alguns autores consideram um 4° elemento, os kranócitos, células que encapsulam e dão suporte a tríade (COURT et al., 2008), e que envolve, através de seus prolongamentos como um “capacete”, todos os demais componentes desta região.

A JNM é abordada de maneiras distintas por diferentes grupos de pesquisa, seus avanços são constantemente disseminados, principalmente com análises quanto a sua plasticidade e funcionalidade, diante de aspectos como o envelhecimento, sarcopenia, estudos de doenças degenerativas como esclerose lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, distrofia muscular (Duchenne) e protocolos de atividade física ou exercícios que possam contribuir com sua manutenção, desenvolvimento, ou como forma de tratamento/terapia (MURRAY et al., 2008; SHEN et al., 2013; TU et al., 2020).

As adaptações da JNM ocorrem de maneira direta e indireta, ou seja, a repercussão das fibras musculares pode alterar as estruturas pré e pós-sináptica, assim como lesões ou acometimentos no nervoso periférico podem afetar a estrutura neuromuscular, que proporcionam alterações nos receptores destas regiões (DESCHENES et al., 2013; DESCHENES et al., 2015).

A aplicação da técnica de imunomarcação com anticorpos específicos é conhecida e utilizada para a análise morfológica da JNM, por exemplo: para as regiões pré-sinápticas através da identificação de regiões positivas para sinaptofisina (bPRATT et al., 2015), SV2 para vesículas destas regiões (TEJERO et al., 2016; KAEFER et al., 2025) e Bassoon, que pode ser associado aos canais de cálcio (P/Q), e determinam a

zona ativa local (DESCHENES et al., 2018). Em relação aos receptores pós-sinápticos, comumente é utilizado o anticorpo α-bungarotoxina para identificação dos receptores (ACh) desta região, amplamente analisada frente às adaptações e repercussões neuromusculares (HSIEH; CHEN, 2024), associadas principalmente a análises morfoquantitativas.

Em relação aos receptores da JNM, estes são ativados de acordo com neurotransmissores específicos (acetilcolina), que são essenciais para as sinapses na JNM, e por meio do processo da exocitose são liberados na fenda sináptica da JNM, se ligam aos receptores específicos (AChR), geram um potencial de ação através da superfície da célula muscular, que se difunde pelo tecido muscular através dos túbulos T (retículo sarcoplasmático). Desta forma, o potencial de ação ativa a abertura e o influxo de cálcio (Ca2+) no citoplasma através de seus canais específicos. O Ca2+, desencadeia a ação das proteínas contráteis e consequentemente o processo de contração muscular (GONZALEZ-FREIRE et al., 2016; DESCHENES, 2019; DESCHENES et al., 2021).

A funcionalidade da JNM depende de diversas vias metabólicas de sinalização, particularmente a via Agrina-LRp4-MuSK é uma das principais associadas à formação e manutenção da JNM, que está envolvida no funcionamento das sinapses e no processo de reinervação. Agrina é uma proteína expressa nas JNM por terminais nervosos, fibras musculares e pelas CPS, além disso, é essencial para o aumento de AChR nas fibras musculares (ZELADA et al., 2020).

A isoforma de agrina produzida por axônios terminais é mais potente na promoção de grupamentos de AChR, e as fibras musculares também expressam agrina nas JNM, além disso, a neurorregulina 1 (NRG1) desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção em caso de lesão nervosa, NRG1 é essencial para o processo de reparo e regeneração da JNM, e promove o crescimento de novos terminais nervosos e a formação de novas junções (FUERTES-ALVAREZ, IZETA, 2021).

1.2 CÉLULAS DE SUPORTE DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR

1.2.1 CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN (CPS)

A comprovação da presença de células adicionais na junção neuromuscular, a princípio gerou controvérsias no meio científico (ARAQUE et al., 1999). Somente vinte e oito anos atrás as células perissinápticas de Schwann foram reconhecidas como um

componente integral da JNM e assim descritas de forma inédita (KO et al., 2007). As células de Schwann não mielinizadas, associadas à sinapse, são também denominadas de telóglias (WÖRL et al., 1996), células perissinápticas de Schwann (AULD; ROBITAILLE, 2003) ou células de Schwann terminais (KANG et al., 2003).

As CPS são células da glia especializadas não mielinizadas, se assemelham aos astrócitos devido a sua função diante das sinapses, são distintas das células mielinizadas de Schwann, derivam das cristas neurais e contribuem com o processo de formação da sinapse, maturação, regeneração e diante do processo de envelhecimento, além de contribuir durante o processo de reinervação com o rearranjo da junção neuromuscular (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2020, TSANG et al., 2025), por acompanharem o terminal nervoso e as células semelhantes a fibroblastos perissinápticos que habitam esta região, os kranócitos (CONNOR, 1997, CONNOR; MCMAHAN, 1987, COURT et al., 2009).

As CPS detectam e decodificam o padrão de neurotransmissão e contribuem com o potencial de ação do terminal nervoso, devido a presença de canais de cálcio em sua estrutura que permitem o influxo e ação deste elemento, além disso podem ser consideradas “células guardiãs” devido a sua morfologia e funções envolvidas com o suporte da JNM (DARABID et al., 2013, GOULD et al., 2025).

Pesquisas baseadas na ablação genética de células satélites têm apoiado a ideia de que as CPS são indispensáveis para a formação e desenvolvimento de brotos terminais (LUBISCHER, THOMPSON, 1999). Diante da funcionalidade da JNM, as CPS têm a capacidade de detectar e regular a transmissão sináptica. Além disso, expressam receptores de neurotransmissores em sua superfície e produzem moléculas neuro moduladoras chamadas gliotransmissores (AULD; ROBITAILLE, 2003).

As CPS atuam principalmente no aumento dos brotamentos, na regeneração e adaptação das JNMs, porém sua relação com a lesão muscular ainda não foi totalmente investigada. Desta forma, o presente estudo buscou determinar, através de análises morfológicas e moleculares, qual o comportamento das CPS quanto ao rearranjo da junção neuromuscular e quanto ao seu próprio remodelamento, além de sua possível relação com células adjacentes frente a essa repercussão.

1.2.2 KRANÓCITOS

Os kranócitos foram identificados, descritos e denominados em 2008 por Court et al., (2008), sua nomenclatura foi proposta e inspirada na palavra grega “κρανος” que significa capacete, devido a sua característica morfológica de encapsulamento e suporte das células perissinápticas de Schwann (CPS) e da estrutura da JNM nas fibras musculares (Figura 1).

Após sua identificação, os kranócitos foram considerados como o 4° elemento/componente da JNM por alguns autores (COURT et al., 2008; NISHIMUNE; SHIGEMOTO, 2018, VERMA et al., 2022), além disso, sua funcionalidade pode ser superficialmente explorada frente a regeneração e brotamento da JNM em conjunto com as CPS (COURT et al., 2008; SUGIURA; LIN, 2011).

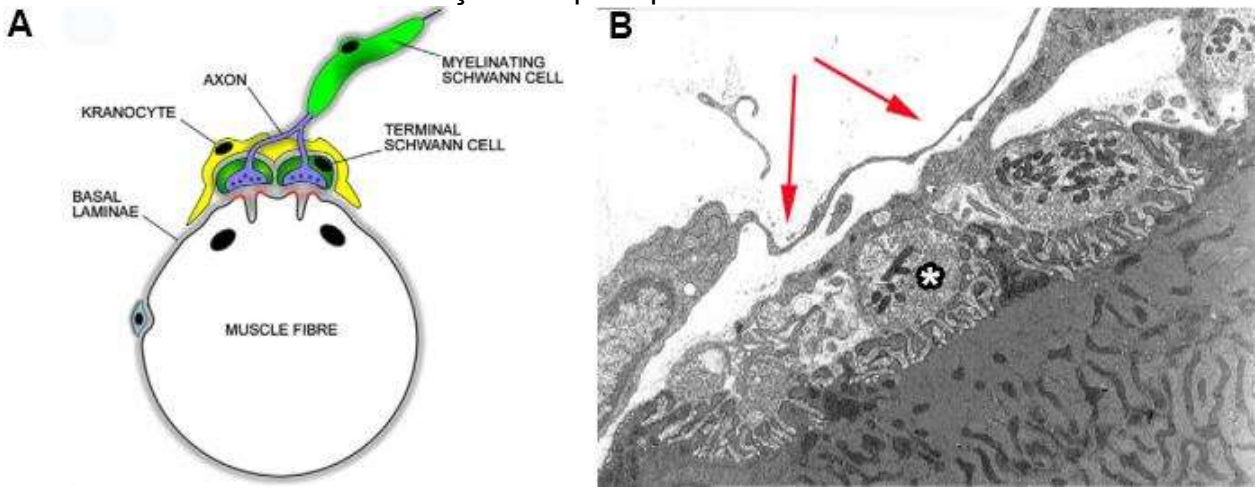
Os kranócitos situam-se fora da lâmina basal sináptica, encapsulam a JNM e podem ser identificados acima das CPS, onde seus processos citoplasmáticos se estendem sobre a área da placa terminal. Particularmente, no músculo de ratos recém-nascidos, são igualmente distribuídos, enquanto no desenvolvimento pós-natal se tornam restritos a zona da placa terminal. Na idade adulta, os kranócitos permanecem confinados na região da JNM, estes desempenham um papel ainda inexplorado na reparação e regeneração após desnervação ou paralisia devido ao seu acúmulo regional (COURT et al., 2008; SUGIURA; LIN, 2011).

Dentro de 24 horas após a desnervação, os kranócitos podem se proliferar e se espalhar por toda a área da JNM, o que sugere um tempo diferente de reação para desencadear o desenvolvimento e ativação das CPS frente ao processo regenerativo (COURT et al., 2008; LEPORE et al., 2019). Assim, os kranócitos podem ser considerados parte integrante da funcionalidade neuromuscular. Além disso, sugere-se que essas células sejam de origem fibroblástica devido a sua localização e funcionalidade (CONNOR; MCMAHAN, 1987; CONNOR, 1997, SUGIURA; LIN, 2011).

Em experimentos de imuno marcação foi possível apresentar sua população e comprovar que são elementos distintos das CPS, pois expressam um perfil específico, que inclui uma enzima sintetizadora de colágeno e neuregulina (anti-NRG) (COURT et al., 2008), o que pode determinar que este elemento celular pode interagir com as CPS através da sinalização de neuregulina (SUGIURA; LIN, 2011).

A identificação e descrição quanto a morfologia dos kranócitos contribuiu com uma nova vertente ainda inexplorada em relação à estrutura e funcionalidade da JNM. Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível evidenciar suas características com prolongamentos que envolvem a JNM e acoplam seus elementos entre a matriz extracelular e o sarcoplasma do tecido muscular (CONNOR; MCMAHAN, 1987; COURT et al., 2008). Tais características devem ser destacadas, pois se assemelham a células de origem estromal, nos primórdios denominadas de células intersticiais de Cajal, e atualmente renomeadas de telócitos, amplamente exploradas nos últimos 15 anos.

Figura 1. Estrutura da junção neuromuscular, seus componentes e micrografia eletrônica de transmissão com a identificação das principais células.



Fonte: Modificado de Court et al. (2008). Ilustração e identificação através da observação ultraestrutural dos kranócitos (seta vermelha) e das células perissinápticas/terminais de Schwann na junção neuromuscular (*).

1.3 TELÓCITOS

Os telócitos, foram assim denominados em 2010, antes deste período possuíam a nomenclatura de “células intersticiais de Cajal”, por apresentarem imuno fenótipo e funcionalidade distinta das células previamente identificadas, além de possuírem diferenças quando comparados com outras células de origem estromal como os fibroblastos, mioblastos e células mesenquimais. Portanto, foram destacadas e evidenciadas de maneira individual no meio científico, e assim puderam ser analisadas de forma isolada quanto a sua morfologia e função nos tecidos onde foram identificadas

(POPESCU, FAUSSONE-PELEGRINI, 2010; POPESCU, 2011; CRETOIU; POPESCU, 2014).

Alguns autores ainda utilizam sua antiga nomenclatura, outros se mantêm céticos quanto à possibilidade de sua existência, devido ao fato de que este elemento celular foi identificado a apenas 15 anos (POPESCU, FAUSSONE-PELEGRINI, 2010) e está presente em diversos tecidos já explorados desde os primórdios da pesquisa científica.

Mesmo diante de tal contradição no meio científico e acadêmico 759 artigos já foram publicados em periódicos internacionais até o ano de 2025, que mencionam sua existência e presença em diferentes espécies, principalmente quanto a descrição de suas particularidades e sua relação e distinção com os fibroblastos e com as células epiteliais que normalmente são encontradas próximas aos telócitos e assim podem promover a confusão e o ceticismo de certos autores quanto a sua identificação (ALEKSANDROVYCH et al., 2017; VARGA et al., 2019; VANNUCHI, 2020).

Morfologicamente, os telócitos possuem formato ovalado, com núcleo heterocromático revelado principalmente através de micrografias adquiridas por meio de microscópio eletrônico de transmissão, considerado padrão ouro para sua identificação (FAUSSONE PELEGRINI; POPESCU, 2011). Estes, possuem de 1-5 telópodos que são longas e delgadas projeções citoplasmáticas, e em suas extremidades possuem segmentos dilatados denominados “podos”, local onde acomodam mitocôndrias e o retículo endoplasmático (POPESCU, 2010; CRETOIU et al., 2016; MANETTI et al., 2019).

Este elemento celular já foi identificado no interstício de diferentes tecidos, como pulmões, testículos, trato gastrointestinal, tecido muscular cardíaco, liso, e estriado esquelético (ROSA et al., 2019) na região da junção miotendínea (PIMENTEL NETO et al., 2020). Além disso, foi encontrado próximo a terminações nervosas, vasos sanguíneos (BOSCO et al., 2013; MARINI et al., 2018; LIANG et al., 2019; LIU et al., 2019), e em comunicação com as células satélites na junção miotendínea (PIMENTEL NETO et al., 2024).

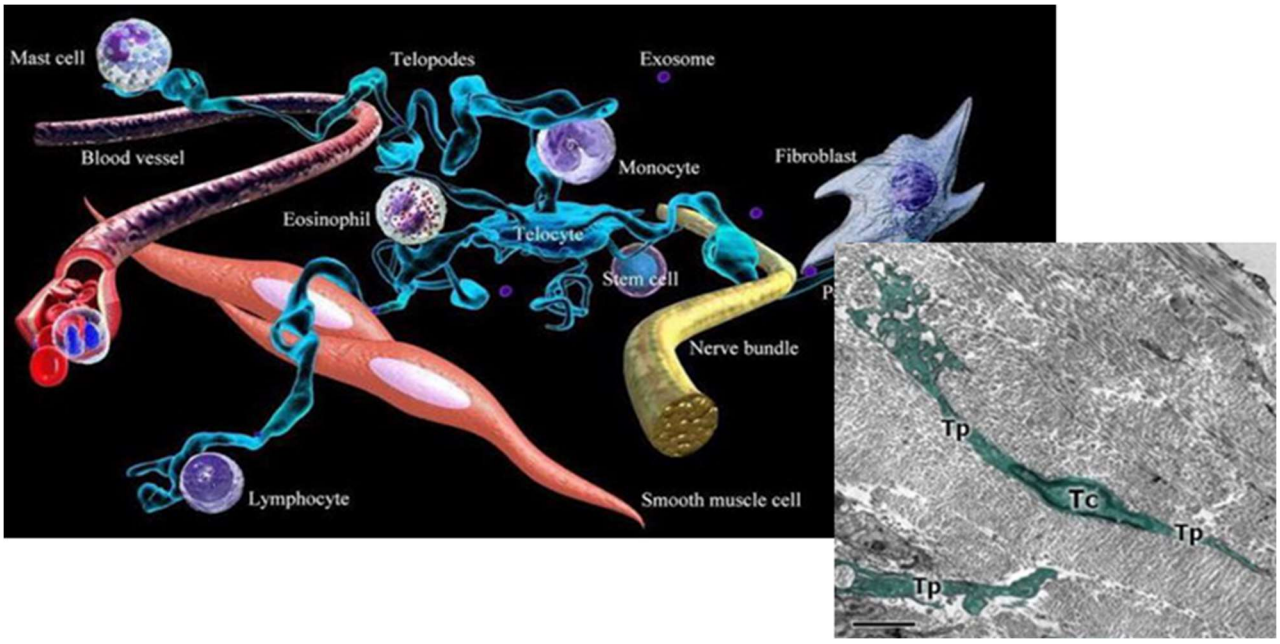
Os telópodos são encontrados adjacentes a outros elementos celulares ou a outros telócitos, assim formam uma rede intersticial, estabelecem comunicação e atividade parácrina por meio de vesículas extracelulares, entre si e com as células vizinhas, além de associar a atividade de diferentes tipos de tecidos como, vasos

sanguíneos, nervos periféricos, células imunes (mastócitos, eosinófilos e monócitos), fibrócitos, células-tronco, linfócitos, (Figura 2) durante condições distintas (EDELSTEIN et al., 2016; MARINI et al., 2018b).

Durante o processo regenerativo os telócitos são observados em nichos, e fornecem suporte para a proliferação e maturação via comunicação intercelular (DÍAZ-FLORES et al., 2014). Estas células expressam as proteínas c-kit, caveolina-1, vimetina, PDGFR-α e CD34 e assim podem ser identificadas e distintas das demais células estromais (MARINI et al., 2018a; KONDO, KAESTNER, 2019).

Na matriz extracelular adjacente ao tecido muscular estriado esquelético, os telócitos foram identificados e seus telópodos com maiores comprimentos pelo endomísio e perimísio, nas proximidades de capilares, terminações nervosas e células satélites. Além do indício de que podem desempenhar papel essencial na integração da sinalização, regulação e regeneração das fibras musculares (POPESCU et al., 2011; MARINI et al., 2018b; PIMENTEL NETO et al., 2024), e visto que foram encontradas em estruturas associadas ao aparelho locomotor, podem também ser associadas a adaptação das junções neuromusculares.

Figura 2. Ilustração dos telócitos e suas comunicações intercelulares e micrografia de transmissão de um telócito com suas características.



Fonte: Ilustração adaptada de Wang et al. (2016) que apresenta a diversidade de comunicação dos telócitos com diferentes elementos celulares em diferentes tecidos. Micrografias dos telócitos adaptada de Pimentel Neto et al. (2020) onde é possível observar um telócito (TC) e seus prolongamentos que estruturalmente promovem a comunicação celular com as células adjacentes, os telópodos (TP).

1.4 LESÃO MUSCULAR

As lesões no músculo estriado esquelético são comuns nas diversas práticas desportivas e em atividades cotidianas, podem ser caracterizadas como alterações resultantes de impactos teciduais que comprometem a funcionalidade muscular abrangendo aspectos morfológicos e histoquímicos, tais como a desorganização das miofibrilas, autodigestão e necrose celular, além da disfunção microvascular progressiva e inflamação local (FENG, CHEN; BIAN, 2024; PIZZA; BUCKLEY, 2023).

Existem particularidades quanto ao nível de agravamento tecidual nas lesões musculoesqueléticas, que podem ser classificadas em relação ao seu comprometimento da seguinte forma: distensão (acometimento tecidual muscular com extensão exacerbada da região, sem extravasamento de líquido intersticial), laceração (acometimento tecidual muscular com extensão exacerbada da região e rompimento parcial das fibras, com extravasamento de líquido intersticial) e contusão (acometimento tecidual muscular com extensão exacerbada da região e rompimento completo das fibras

de um ou mais compartimentos musculares, com extravasamento de líquido intersticial) (JÄRVINEN et al., 2007, SOUSA; GOTFRIED, 2013).

As complicações geradas pela lesão muscular podem repercutir em contratura muscular, atrofia muscular e fibrose, o que afeta diretamente a biomecânica e a funcionalidade do membro ou região afetada, além de comprometer o volume tecidual e as respostas sensorial e motora da região (SOUSA; GOTFRIED, 2013, POLLOT; CORONA, 2016). Além disso, os processos de dano muscular e reparo são semelhantes na maioria dos casos, assim como o tempo de início do seu processo regenerativo, e desta forma, pode afetar diretamente ou indiretamente as demais estruturas do aparelho locomotor por meio da resposta sensorial e motora (BORNEMANN, SCHMALBRUCH, 1992; STILHANO et al., 2017).

O tecido muscular possui a capacidade regenerativa, característica que ocorre em três fases: a primeira fase indica a ruptura ou laceração tecidual que pode promover a necrose miofibrilar, com a formação de hematoma e consequentemente a formação do infiltrado celular como resultado da ação inflamatória. Na fase reparatória, ocorre a fagocitose tecidual, com a conjunta regeneração das miofibrilas e a produção e formação de fibrose local, bem como o crescimento de capilares na área lesionada que contribuem para o processo regenerativo. Por fim, a fase de remodelação, caracterizada pela maturação das miofibrilas e reorganização tecidual, além da recuperação parcial da capacidade funcional (CARLSON; FAULKNER, 1983; BONDINE-FOWLER, 1994).

O músculo estriado esquelético pode ser considerado um órgão endócrino, devido a produção de uma série de proteínas conhecidas por sua atuação frente ao processo inflamatório, como as interleucinas e os fatores de crescimento, por exemplo, IGF-1 (fator de crescimento de insulina) e o TGF-β (fator de transformação de crescimento beta), que são produzidas por células imunes presentes na formação do infiltrado celular durante o processo de regeneração tecidual muscular (MACKEY; KJAER, 2017; DING; GE, 2022).

O IGF-1 por exemplo é um potente fator para o crescimento, desenvolvimento e regeneração muscular, além disso é relatado como responsável pela preservação da massa muscular, sua regulação positiva em conjunto com a regulação negativa da sinalização do TGF demonstram a competição pela dominância da recuperação do tecido muscular e conjuntivo durante o processo de remodelamento (PELOSI et al., 2007; DOESSING et al., 2010; SHAVLAKADZE et al., 2010).

O TGF-β é uma proteína multifuncional que desempenha papel no crescimento, na diferenciação e no reparo do tecido muscular, associado principalmente a fibrose, o aumento da atividade do TGF-β inibe a ativação das células satélites, prejudica a diferenciação dos miócitos e leva à formação de tecido fibrótico em resposta à lesão do músculo esquelético (ALLEN; BOXHORN, 1989; LI et al., 2004, BURKS et al., 2011)

O processo de recuperação muscular após uma lesão exige a necessidade em muitos casos de tratamentos específicos para seu retorno efetivo (SMITH et al., 2008, SHIN et al., 2014). Desportistas que necessitam de uma musculatura altamente eficiente podem ter seu desempenho comprometido mesmo com pequenas fibroses (BROOKS et al., 2006; GREFTE et al., 2009), nestes casos é exigido um longo período de tratamento e recuperação (SHIN et al., 2014), desta forma é de suma importância a avaliação quanto ao grau de lesão ainda em estágio agudo, não só do tecido muscular afetado, mas da funcionalidade motora.

Diante das características apresentadas frente a lesão muscular, as análises morfológicas e moleculares referentes a junção neuromuscular, que é direta e indiretamente afetada quanto a este acometimento, tornam-se viáveis e essenciais, assim como a abrangência das análises estruturais e principalmente quanto as células que a habitam e permeiam esta região, como as CPS e possivelmente os telócitos, para aplicação em futuras pesquisas que abordem ou envolvam as especificidades da estrutura da JNM.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo consistiu em apresentar o remodelamento morfológico das regiões da junção neuromuscular após modelo experimental de lesão muscular em período agudo e, diante disso, revelar a possível associação entre os telócitos e as CPS nesta região, além da identificação deste elemento celular na JNM.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os comprometimentos tecidual muscular e conjuntivo associado, respectivamente através das técnicas de Hematoxilina e Eosina e Picrosirius e da análise morfo quantitativa de volume dessas regiões.
- Apresentar as adaptações morfológicas da JNM - regiões pré-sináptica (Bassoon), canais de cálcio (P/Q) e pós-sináptica (α-bungarotoxina), através da morfometria com uso de anticorpos para identificação das regiões de interesse.
- Identificar as CPS (S100β) e os telócitos (CD34+) na JNM através da imunomarcação das células de interesse.
- Realizar o cultivo de telócitos e das CPS para identificar a relação ou diferença destas, e assim executar o posterior isolamento das células, além da padronização da técnica de imunofluorescência utilizada nas análises de citometria de fluxo.
- Quantificar os telócitos e as CPS através da técnica de citometria de fluxo com os marcadores específicos previamente testados e padronizados.
- Determinar o nível de expressão gênica dos oligos (primers) referentes a S100, NG2, AChR-α, Agrina, NrG1, TGF-β e IGF, fatores referentes à estrutura e funcionalidade das células de interesse e da região de estudo através da técnica de qPCR.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para o experimento foram utilizados 60 ratos *Wistar* (rattus norvegicus) machos com 75 dias de idade (jovens/adultos), divididos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais (Figura 3):

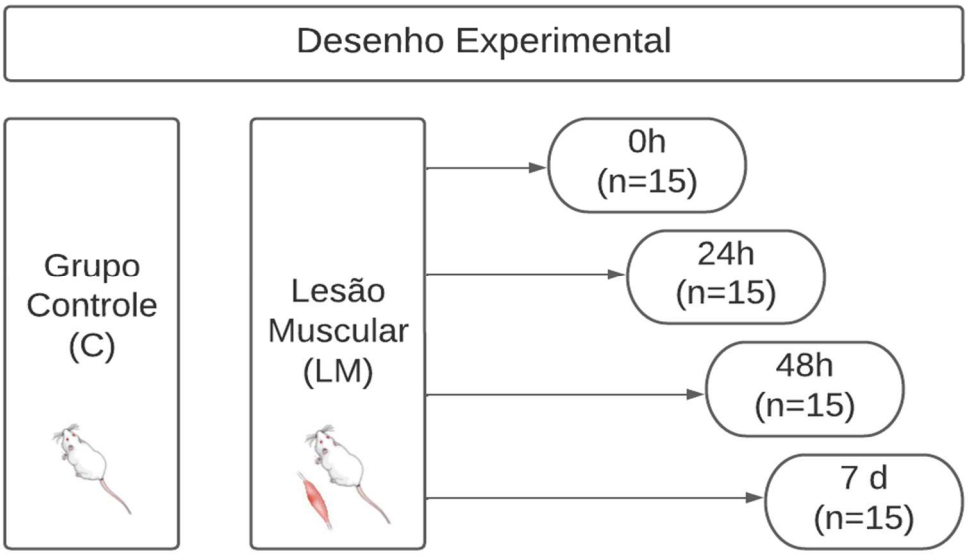
● **Controle (C):** os animais não foram submetidos a nenhum protocolo experimental.

● **Lesão Muscular (LM):** os animais foram submetidos a lesão muscular no músculo gastrocnêmio direito e separados em períodos pós lesão: 0h, 24h, 48h e 7 dias.

Todos os animais foram oriundos do Biotério Central da UNESP - Campus de Botucatu, SP, estes foram alocados no Biotério Setorial do Laboratório de Anatomia do Departamento de Educação Física, do Instituto de Biociências da UNESP - Campus Rio Claro - SP. Estes foram alojados em gaiolas coletivas e receberam ração balanceada (Purina®), água ad libitum, com temperatura ambiente controlada à 23ºC±2ºC, com fotoperíodo claro/escuro de 12h.

Todos os procedimentos aplicados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - n°07/2022) (APÊNDICE 1) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Campus de Rio Claro - SP e supervisionadas pela responsável técnica médica veterinária Patrícia Gomes Wehmuth Cassab CRMV-SP 26257.

Figura 3. Representação da divisão dos animais por grupo referentes aos períodos pós lesão.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os animais foram divididos em Grupo Controle onde foi utilizado o músculo gastrocnêmio contralateral do Grupo 0h, e grupos referentes aos períodos pós lesão muscular 0h, 24h, 48h e 7 dias e estabelecido um “n” amostral de 15 animais por grupo para uso nas análises.

3.2 LESÃO MUSCULAR

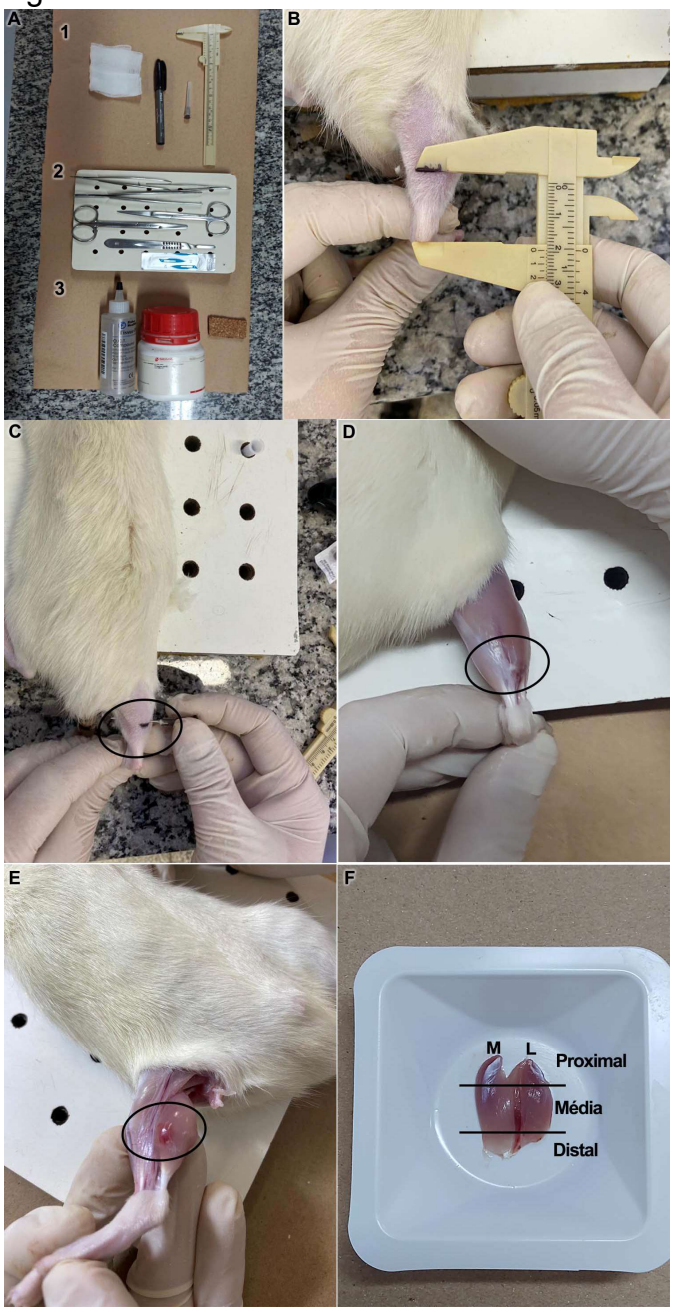
Os animais do grupo lesão muscular foram anestesiados previamente com injeção intraperitoneal com as doses padronizadas de acordo com o peso dos mesmos com ketamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), colocados na posição pronada, expondo a face posterior do membro pélvico direito, além disso, foi realizada a tricotomia local na região referente ao tríceps sural do animal, onde foi posteriormente realizado o protocolo de lesão muscular.

Para o processo de lesão muscular foi utilizada uma agulha hipodérmica estéril de 22G x 1’’ e 0,70mm x 25mm para cada animal. Para dar andamento ao protocolo foi realizada a assepsia da região, a mensuração e demarcação do local 2 cm acima do calcâneo do animal com um paquímetro plástico ABS, a região determinada faz referência ao terço médio do músculo gastrocnêmio, nesta foi realizada a inserção

transversal da agulha hipodérmica no músculo gastrocnêmio o que promoveu a lesão local (Figura 4) (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2015).

Após os referentes períodos pós lesão, o músculo gastrocnêmio direito foi dissecado e coletado para os grupos 0h,24h, 48h e 7d, já para o Grupo C, foi utilizado o membro contralateral do Grupo 0h. O terço médio (região média) do músculo foi separado das demais regiões (proximal e distal) e armazenado de acordo com as respectivas análises morfológicas e moleculares.

Figura 4. Materiais e procedimentos referentes ao protocolo de lesão e coleta das amostras do músculo gastrocnêmio.



Fonte: Elaborado pelo autor. Materiais utilizados para o protocolo de lesão (A1), para a dissecação das amostras de interesse (A2) e para fixação das amostras referentes às análises de microscopia (A3), a lesão muscular realizada através da inserção de agulha hipodérmica (B) no membro posterior direito do animal para provocar a distensão muscular (C) e o processo inflamatório no ventre do músculo gastrocnêmio no protocolo de lesão muscular no ventre lateral (D) e no ventre medial (E), posteriormente a região do ventre muscular (média) foi padronizada e separada para o ventre lateral (L), o ventre medial foi armazenado para futuras análises (F) e coletados em todos os grupos experimentais.

Tabela 1. Número de amostras coletadas para cada análise proposta.

Análises	N° de amostras por grupo
Microscopia Óptica e Imunofluorescência	5
Cultivo Celular Primário e Citometria de Fluxo	5
qPCR	5

Fonte: Elaborado pelo autor. Para as análises de microscopia óptica e de imunofluorescência foram utilizadas 5 amostras por grupo estas foram coletadas e posicionadas em cortiça, fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-80°C). Para as análises de cultivo celular primário e citometria, foram utilizadas 5 amostras coletadas e utilizadas a fresco de acordo com a metodologia descrita. Para as análises de expressão gênica 5 amostras foram utilizadas por grupo, estas foram coletadas, fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas em eppendorfs de 2 mL em freezer (-80°C).

3.3 EUTANÁSIA

Para obtenção das amostras dos grupos experimentais e para o uso nos procedimentos e técnicas utilizados no presente estudo, os animais foram eutanasiados após o período de lesão estipulado, por meio de overdose de anestésico ketamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg) aplicado via intraperitoneal, seguindo as normas e regulamentos do CEUA (CONCEA, 2024).

3.4 MASSA CORPORAL

A massa corporal dos animais de todos os grupos experimentais foi mensurada previamente a eutanásia para posterior comparação e análise dos grupos experimentais após os períodos de lesão estabelecidos. Para a mensuração foi utilizada uma balança digital (TOMATE SF400®). Os dados dos grupos LM0h, LM24h, LM48h e LM7d foram então comparados entre si, sendo que o Grupo Controle não foi incluído devido ao fato de sua coleta amostral ter sido realizada nos mesmos animais do Grupo 0h.

3.5 MASSA MUSCULAR

A massa muscular do músculo gastrocnêmio do membro posterior direito foi mensurada após a sua dissecação nos grupos submetidos a lesão muscular e o

gastrocnêmio esquerdo do Grupo LM0h foi coletado para o Grupo Controle. Para a mensuração foi utilizada uma balança semi-analítica (Marte Científica® AD330), e os dados obtidos foram utilizados para comparação entre os grupos experimentais.

3.6 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

Para as análises microscópicas foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, destes foram dissecadas as amostras dos ventres musculares do músculo gastrocnêmio posteriormente untadas em talco neutro (Tragacanth, G1128, Sigma-Aldrich®), alocadas sobre cortiça demarcada com a identificação dos respectivos grupos e animais, estabilizadas com cola biológica (O.C.T Compound, Tissue Plus®, Fisher Healthcare, Houston, TX, EUA) crio fixadas em nitrogênio líquido (-196ºC), e em seguida armazenadas em freezer a -80ºC para posteriormente serem analisadas nas técnicas pré-estabelecidas.

3.7 MICROSCOPIA DE LUZ

As amostras do ventre do músculo gastrocnêmio foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C), e posteriormente realizados cortes transversais (12 µm) corados com hematoxilina e eosina (HE) para destaque dos componentes celulares e Picro Sirius (PS) para identificação do tecido conjuntivo associado (BHUTDA et al., 2017; CARDIFF et al., 2014).

Para cada amostra foram confeccionadas 3 lâminas histológicas de cada animal para cada respectiva coloração, e em cada lâmina foram realizados 3 cortes das regiões de interesse.

As imagens das secções foram obtidas por meio do microscópio de luz Olympus BX51 do Laboratório de Citogenética Animal da UNESP Campus Rio Claro – SP em objetiva de 20x (ampliação de 200x), onde foi possível avaliar qualitativamente e quantitativamente o processo inflamatório e fibrótico por meio da diferenciação e aumento dos núcleos celulares e do tecido conjuntivo associado nos grupos experimentais.

3.7.1 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS – MICROSCOPIA DE LUZ

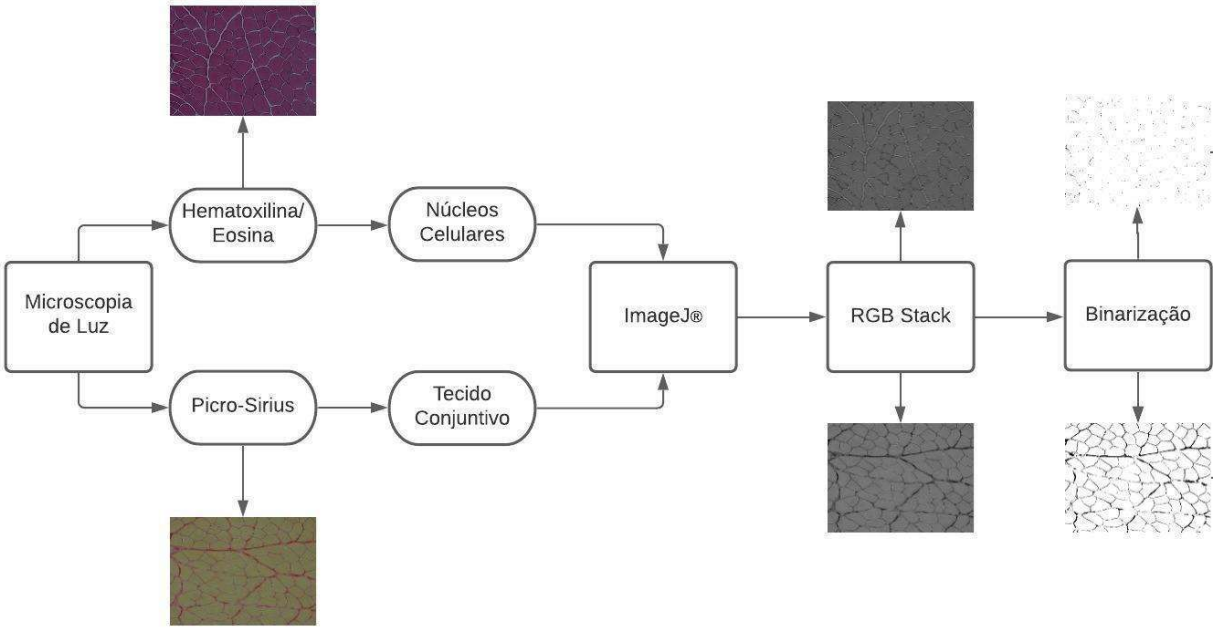
As imagens das lâminas fotografadas em microscópio de luz foram selecionadas e mensuradas por meio do software ImageJ®, desta forma este foi previamente calibrado de acordo com a barra de escala (50 µm) das imagens com ampliação de 200x.

Para dar início a mensuração é necessário selecionar a aba *Set Scale/Analyze* e utilizando da ferramenta “Straight” para mensurar a barra de escala de cada imagem, e alterar em *Known Distance* o valor referente a barra e a unidade de medida para µm. Além disso na barra de tarefas foi necessário selecionar a opção *Analyze/Set Measurements* e ticar as opções de variáveis a serem analisadas (*Area/ Area Fraction*).

Nesta etapa basta acessar a aba *Image* pelas opções *Type/RGB Stack* e selecionar a demarcação evidente do tecido analisado. A partir da demarcação selecionada, é preciso buscar na barra de tarefas por *Process/Binary/Make Binary* e desmarcar todas as opções da janela que foi aberta, a auto seleção do tecido analisado foi apresentada pelo software, finalmente a tecla M foi pressionada para obtenção dos resultados na tela.

As variáveis obtidas foram a área e a porcentagem da área dos núcleos celulares e do tecido conjuntivo associado por imagem, onde foram padronizadas um n° de 10 imagens por animal, com total de 50 imagens por grupo, por variável. A metodologia foi baseada nas variáveis obtidas por Pimentel Neto et al. (2022) e atualizada de acordo com o protocolo proposto.

Figura 5. Diagrama das mensurações para as técnicas de Hematoxilina e Eosina e Picrosirius Red.



Fonte: Elaborado pelo autor por meio do Lucidchart®. Diagrama das etapas prévias de seleção das imagens e binarização para realização das mensurações a partir das técnicas de Hematoxilina e Eosina e Picrosirius Red e obtenção das variáveis do volume de núcleos e tecidos de interesse e porcentagem por imagem.

3.8 RECEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS (BASSOON) E CANAIS DE CÁLCIO (P/Q)

Foram realizadas cortes longitudinais (20 µm) (Criostato HM 505 E, MICROM®) superficiais coletados em lâminas histológicas silanizadas, lavados 2x por 5 min com PBS, permeabilizados com Triton 0,1% diluído em PBS por 10 min e bloqueados com solução de 1% albumina de soro bovino (BSA) diluído também em PBS por 20 min, posteriormente bloqueados com 5% de soro de cabra (NGS) diluído em PBS por 20 min e incubadas com anti-Bassoon (anti-BSN [rabbit], SAB5200101, Sigma-Aldrich®, 1:500) para identificação da região pré-sináptica e canais de cálcio (anti-calcium P/Q channel [rabbit], C1353, Sigma-Aldrich®, 1:500) em overnight (16h) à 4°C (DESCHENES et al., 2021).

Posteriormente, as lâminas foram lavadas 2x 5 min com PBS e incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (anti-rabbit, A11008, Invitrogen) e Alexa Fluor 647 (anti-mouse, A21244, Invitrogen) (1:1000) diluídos em PBS contendo

1% de BSA respectivamente, logo após foram montadas com Prolong™ Gold Antifade (P36934, Molecular Probes®, 1 gota por lâmina), e armazenadas em freezer a -20°C. As imagens foram obtidas através do Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro, SP, Brasil (KRAUSE NETO et al., 2017; ROCHA et al., 2020a), em objetiva de 100x (ampliação de 1000x).

3.9 RECEPTORES PÓS-SINÁPTICOS

Foram realizados cortes longitudinais (20 µm) (Criostato HM 505 E, MICROM®) superficiais coletados em lâminas histológicas silanizadas, lavados 2x por 5 min com PBS, permeabilizados com Triton 0,1% diluído em PBS por 10 min e bloqueados com solução de 1% Albumina de soro bovino (BSA) diluído também em PBS por 20 min, posteriormente foi realizado novo bloqueio com 5% de soro de cabra (NGS) diluído em PBS por 20 min, posteriormente foram incubadas com anticorpo α-bungarotoxina (tetrametilrodamina alfa bungarotoxina [conjugada], T1175, Molecular Probes®,1:600), diluído em PBS para marcação e identificação da região pós-sináptica.

Em etapa posterior, as lâminas foram lavadas 2x 5 min com PBS contendo 1% BSA, montadas com Prolong™ Gold Antifade (P36934, Invitrogen®,1 gota por lâmina), e armazenadas a -20°C. As imagens foram obtidas através do Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro, SP, Brasil (ROCHA et al., 2020a), em objetiva de 100x (ampliação de 1000x).

3.10 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS – IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a etapa das análises morfométricas, foram realizadas as mensurações do perímetro total; perímetro corado; área total; área corada e dispersão dos receptores pré-sinápticos (Bassoon), canais de cálcio (P/Q) e pós-sinápticos (α-bungarotoxina) (DESCHENES et al., 2016). Para que as mensurações fossem realizadas, foram fotografadas de 10-12 imagens por animal de cada região de interesse/marcador, com total final de 50-60 imagens para cada grupo experimental.

As mensurações foram realizadas através do software ImageJ® e a análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism® 8.4.3 (JONES et al., 2016, PIMENTEL NETO et al., 2021).

Para dar início ao processo de mensuração as imagens foram selecionadas individualmente e os seguintes passos foram aplicados:

(A) Antes de dar início a mensuração a opção “Straight” foi selecionada, uma linha foi traçada na barra de escala (5 µm) padronizada em um único microscópio com as imagens ampliadas em 1000x, na aba *Analyze/Set Scale* em *Known Distance* o valor da barra foi alterado neste caso para 5, assim como a unidade de medida para µm.

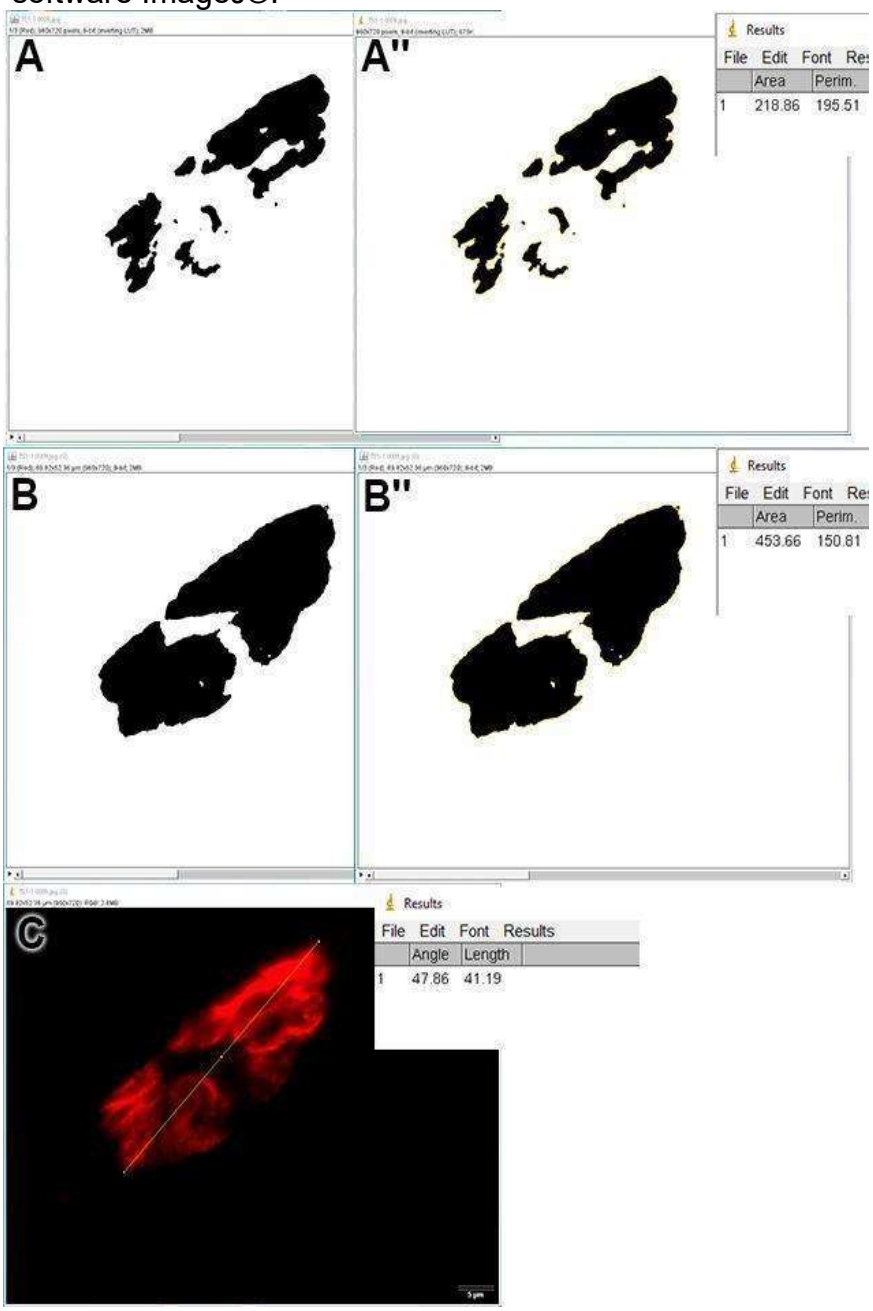
(B) Para mensuração da área corada e perímetro corado foi necessário, acessar a aba *Analyze/Set Measurements* onde foram selecionadas as opções “Area” e Perimeter, o passo seguinte consistiu em acessar a aba *Process/Binary/Make Binary*, na sequência uma impressão desta área foi apresentada pelo software. Desta forma, ao clicar na aba *Edit/Create Selection* e ao pressionar a tecla M, os valores de área e perímetro foram informados em uma nova janela *Results* de acordo com o que foi pré-calculado pelo software, estes valores foram registrados em uma planilha para posterior análise estatística.

(C) O procedimento para o cálculo da área total e perímetro total foi semelhante ao da área corada e perímetro corado, porém, antes de dar início a binarização *Binary* foi necessário acessar a aba *Image/Type/RGB Stack*, em seguida na aba *Image/Adjust/Threshold* padronizar a área de acordo com a imagem, de forma a destacar toda a região demarcada da junção, os próximos passos foram semelhantes aos do tópico B.

(D) A mensuração do diâmetro máximo precisa ser ajustada previamente em *Analyze/Set Measurements*, todas as opções foram desmarcadas, em seguida a opção de linha foi selecionada e os extremos da região em destaque percorridos diagonalmente com uso da ferramenta Straight, até que uma linha fosse traçada de um extremo ao outro, em seguida ao pressionar a tecla M, uma janela com o resultado do comprimento do diâmetro foi apresentada e o valor registrado na planilha para análise (JONES et al., 2017).

Além disso, foi estabelecido o valor de dispersão por meio dos valores pré calculados da área corada e da área total, onde foi utilizada a fórmula da área corada dividida pela área total, multiplicada por 100 (DESCHENES et al., 2013). Esta fórmula foi pré-ajustada na planilha de registro de dados para ser calculada automaticamente assim que os valores fossem adicionados, e o resultado foi registrado em porcentagem.

Figura 6. Metodologia utilizada para as mensurações das imagens de imunomarcação realizadas no software ImageJ®.



Fonte: Elaborado pelo autor. Para as mensurações foi utilizado o software ImageJ®, no exemplo observamos (A) a imagem binarizada utilizada para mensuração da área corada e perímetro corado, em A" a seleção automática realizada pelo software, na imagem abaixo é possível visualizar (B) a binarização e (B") a padronização utilizada para mensuração da área total e perímetro total, por fim (C) o exemplo de delimitação para mensuração do diâmetro máximo dos receptores pós-sinápticos.

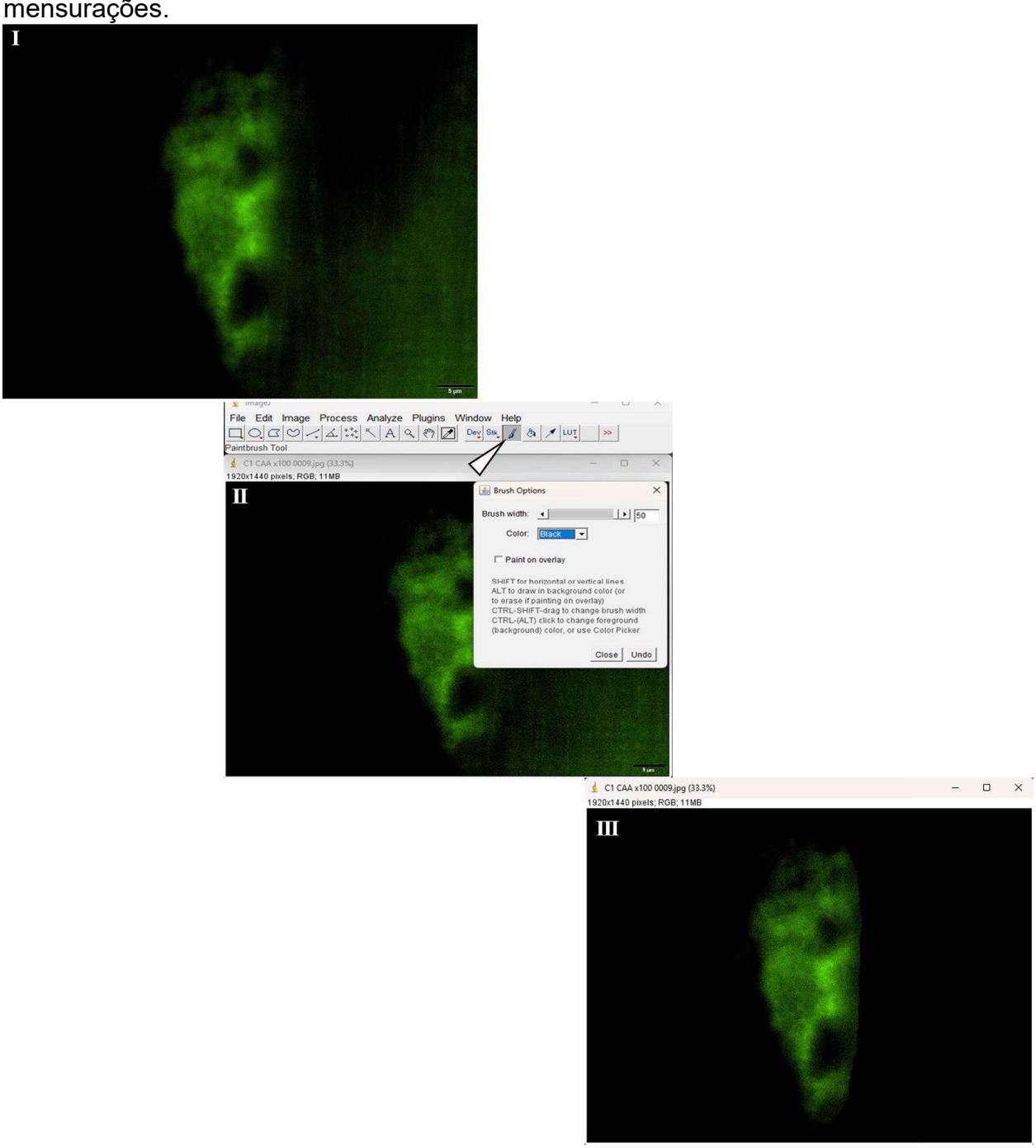
3.10.1 CORREÇÃO DE MARCAÇÃO INESPECÍFICA

Após a obtenção das imagens com os imunomarcadores específicos foram identificados locais de marcação inespecífica, ou seja, regiões que apresentaram fluorescência diante do marcador e por fatores limitantes frente ao microscópio utilizado, principalmente com uso do filtro verde. Diante desta problemática foram estabelecidos padrões para a correção das imagens, de forma a isolar a região de interesse como o realizado e detalhado nos materiais complementares apresentados por Jones et al. (2016) e modificado para nosso protocolo.

Para a metodologia de correção foi utilizado o software ImageJ®, onde após a padronização das barras de escala como descrito no tópico anterior, a ferramenta Paintbrush Tool foi selecionada, com duplo clique foi selecionado o tamanho do pincel (máximo 50), e a cor de fundo estabelecida para recobrir e assim corrigir as regiões com coloração e marcação inespecíficas, assim como a barra de escala que não mais seria necessária para a análise morfológica (Figura 7).

Todos os grupos experimentais apresentaram este problema, e com uso desta metodologia, todas as imagens capturadas puderam ser aproveitadas e mensuradas com uso dos marcadores propostos.

Figura 7. Metodologia utilizada para correção das marcações inespecíficas pré mensurações.



Fonte: Elaborado pelo autor. Após a padronização da escala no software ImageJ®, as imagens que continham (I) marcações inespecíficas (principalmente na fibra muscular), ou artefatos que pudessem comprometer as mensurações, eram previamente aprimoradas com a (II) ferramenta *Paintbrush tool* (cabeça de seta), para que apenas a (III) região de interesse fosse avaliada.

3.11 CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN E TELÓCITOS

Foram realizadas cortes longitudinais (20 µm) (Criostato HM505E, MICROM®) do músculo gastrocnêmio coletados em lâminas histológicas silanizadas, lavados 2x por 5 min com solução salina tamponada com fosfato (PBS), permeabilizados com Triton 0,1% diluído em PBS por 10 min e bloqueados com solução de 1% Albumina de soro bovino (BSA) diluído também em PBS por 20 min, posteriormente foram incubados separadamente em conjunto com o marcador de receptores pós-sinápticos (anti-α-bungarotoxina) em solução com anticorpo primário anti-S100β (MA5-12969, Invitrogen®, 1:200) e anti-CD34 (PA5-85917, Invitrogen®, 1:500) diluída em PBS, para identificação das CPS e dos telócitos respectivamente.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas 2x 5 min com PBS contendo BSA 1%, e imunomarcadas com os anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (anti-rabbit) para os telócitos e Alexa Fluor 488 (anti-mouse) para as CPS por 1 hora (1:1000) diluídos em PBS com 1% de BSA, montadas com Prolong® Antifade com DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), e armazenadas em -20°C.

As imagens foram obtidas através do Microscópio de fluorescência Olympus BX61 do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. As CPS e os telócitos foram identificados positivamente de acordo com sua localização no elo citoplasmático da JNM (JONES et al., 2016; MINTY et al., 2020; ALHINDI et al., 2021) em objetiva de 100x (ampliação de 1000x).

3.12 CULTIVO CELULAR

Para o cultivo celular primário das células de interesse foram obtidos os explantes para os telócitos e para as células de Schwann a partir das amostras dos músculos gastrocnêmios dissecados a fresco. Desta forma, foram utilizados 5 animais, eutanasiados com overdose de anestésico (Ketamina – 200 mg/kg e Xilazina - 50 mg/kg) via intraperitoneal. As amostras foram coletadas, em condição esterilizada (fluxo laminar), lavadas com PBS por 2x, transferidas para placa de cultura esterilizada onde foram realizadas secções nas amostras individuais até a obtenção de micro fragmentos de tecido.

Os microfragmentos foram alocados em tubos Falcon (20ml), lavados com PBS e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos, posteriormente foram adicionados aos tubos 2mg/ml de colagenase I (0,2%) (Sigma-Aldrich®) em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM - meio de cultivo) e colocados em banho maria para realizar o processo de digestão enzimática por 40 minutos, após a digestão as amostras foram filtradas com peneira própria em um novo tubo Falcon (20 ml) onde foi adicionado DMEM, novamente foi realizada a centrifugação na velocidade de 1500 rpm por 8 min.

Após o processo de centrifugação o conteúdo sobrenadante foi espalhado em placas de cultivo esterilizadas, cada placa contendo DMEM e mix de nutrientes Ham F12 suplementada com soro fetal bovino (FBS) 10%, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina para telócitos e DMEM, mix de nutrientes Ham F12, 10% FBS, 10 nM neuregulina, 2 uM forskolin e 20 mg/ml FGF2 para o cultivo de células de Schwann.

As placas de cultivo foram mantidas em estufas controladas com atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 72h (SANCHES et al., 2020), após este período foram feitas as primeiras aquisições de imagens ao microscópio de luz, após 7 dias as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% em placas de 6 poços e posteriormente (10° dia), as células foram incluídas ao protocolo de imunomarcação.

A técnica de cultivo celular foi realizada no Laboratório/Grupo de Terapias Inovadoras (GDTI) do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP) sob supervisão do professor Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

3.13 CITOMETRIA DE FLUXO

Para a identificação e avaliação da associação dos telócitos e das CPS quantitativamente foi realizada a técnica de citometria de fluxo. Desta forma, foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental, eutanasiados com overdose de anestésico (Ketamina – 200 mg/kg e Xilazina - 50 mg/kg) via intraperitoneal e as amostras do músculo gastrocnêmio foram dissecadas e coletadas em condição esterilizada (fluxo laminar).

O cultivo das células de interesse foi padronizado, para isso as células foram isoladas e a citometria de fluxo foi realizada em metodologia semelhante à descrita no

tópico 3.12. Os músculos foram reduzidos em pequenos segmentos (~1 mm^3) e lavados três vezes com PBS a 4°C, e colocados em tubos Falcon (20 mL). As amostras foram digeridas usando 10 mg/ml de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich®) e 0,1% de hialuronidase (Sigma-Aldrich®) diluídas em PBS e colocadas em banho maria (40 min), posteriormente, foram lavadas em PBS por 5 min e filtradas em filtros de células de 40 µm de diâmetro para novos tubos falcon.

Em novos tubos, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação a 453×g por 5 min a 37°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso em solução de bloqueio (BSA 1%) por 30 min a 37°C, onde foi adicionado Triton-X 0,5% para o processo de permeabilização nesta etapa o precipitado celular foi dividido em eppendorfs de 2 mL.

Após a permeabilização as células foram lavadas, centrifugadas (453×g por 5 min), foi adicionada a solução de bloqueio (BSA 1%), esta foi posteriormente (30 min) descartada e os anticorpos primários adicionados (CD34 com a diluição em 1:500; CD31 com a diluição em 1:500; S100 com a diluição em 1:300) e incubados por 45 min a 37°C. Após a centrifugação, os anticorpos foram descartados e a solução de lavagem foi adicionada às células por 5 min à temperatura ambiente. As células foram então centrifugadas e os anticorpos secundários (Alexa Fluor™ 488 com a diluição de 1:1000) foram adicionados e incubados durante 30 min a 37°C. Após a centrifugação, os anticorpos foram descartados e a solução de lavagem foi adicionada às células por 5 min à temperatura ambiente.

Após as etapas citadas as amostras foram mantidas em geladeira até as análises no citômetro, estas foram realizadas no mesmo dia e período do protocolo de incubação para evitar a perda dos marcadores. Para as leituras foram realizados testes em solução padrão do aparelho, no anticorpo secundário isolado e nas amostras com cada marcador específico tanto para o Grupo Controle como para o Grupo LM.

As células positivas foram detectadas por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6) (LI et al., 2014; LIU et al., 2016). A técnica de citometria de fluxo ocorreu no Laboratório/Grupo de Terapias Inovadoras (GDTI) do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP) sob supervisão dos professores Dr. Carlos Eduardo Ambrósio e em colaboração com a Profa. Dra. Fabiana Bressan.

3.14. RELAÇÃO DE ANTICORPOS

Para as técnicas de imunofluorescência da junção neuromuscular e para identificação das células de interesse tanto nas análises histológicas, como nas técnicas de cultivo celular e citometria de fluxo, os anticorpos primários e secundários foram adquiridos, previamente testados quanto a suas respectivas diluições e aplicados durante o processo de execução das técnicas e assim estabelecidos seus padrões (Tabela 2).

Tabela 2. Soluções utilizadas para imunomarcação.

Nome	Região/Estrutura	Código	Empresa	Diluição
anti - BSN (rabbit)	Receptores pré-sinápticos	SAB5200101	Sigma-Aldrich®	1:500
anti - Canais de Cálcio (P/Q) (rabbit)	Canais de Cálcio P/Q	C1353	Sigma-Aldrich®	1:500
anti α-bungarotoxina (conjugado)	Receptores pós-sinápticos	T1175	Molecular Probes®	1:600
S100 (mouse)	Células Perissinápticas de Schwann	MA5-12969	Santa Cruz®	1:200
CD34 (rabbit)	Telócitos	PA5-85917	Invitrogen®	1:500
anti-rabbit Alexa Fluor™ 488	Secundário	A11008	Invitrogen®	1:1000
anti-mouse Alexa Fluor™ 488	Secundário	A11001	Invitrogen®	1:1000
anti-mouse Alexa Fluor™ 647	Secundário	A21244	Invitrogen®	1:1000
Prolong™ Gold Antifade	Núcleos celulares	P36934	Invitrogen®	1 gota por lâmina

3.15 PCR REAL TIME: EXTRAÇÃO DE RNA

Foram utilizados 5 animais de cada grupo experimental. As amostras do músculo gastrocnêmio foram maceradas e homogeneizadas com auxílio de um gral com pistilo (macerador manual) para coleta do tecido homogeneizado e para prevenção quanto a erros e possíveis contaminações as amostras foram duplicadas, ou seja, o material homogeneizado foi dividido em 2 eppendorfs referentes a cada a amostra contida no “n” de 5 animais.

Posteriormente, as amostras foram diluídas em 500 µL do reagente Trizol (15596026, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen®) até completa solubilização. Em seguida, a mistura foi incubada por 5 min à temperatura ambiente, acrescida de 150 µL de clorofórmio (LABSYNTH, São Paulo, Brasil) para a desproteinização.

O sobrenadante foi então separado por centrifugação, 12000g, 15 min, à 4ºC e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com uso de isopropanol (LABSYNTH, São Paulo, Brasil), centrifugado novamente (12000g, 10 min a 4ºC), lavado com etanol 75% (LABSYNTH, São Paulo, Brasil), dissolvido em 60 µL de H2O 58 deionizada (Life Technologies, USA) e armazenadas em freezer -80ºC.

A concentração do RNA foi determinada pelo comprimento de onda (260nm) e a pureza do RNA pela razão 260/280 (~1.9) através do espectrofotômetro BioTek Synergy H1 Multimode Reader (Biotek®, EUA) 0,2 mL por amostra (LIMA, 2013). A etapa de extração foi realizada no Departamento de Biodiversidade, UNESP, Campus Rio Claro, SP e a etapa de avaliação da concentração das amostras foi conduzida no Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

3.15.1 PADRONIZAÇÃO

Todas as soluções foram previamente testadas para padronização de diluição de RNA e oligos, tempo das etapas referentes a transcriptase reversa e anelamento. Para esta etapa foram seguidos os padrões do kit GoTaq®1-Step RT-qPCR System (A6020 - Promega®) em conjunto com as métricas estabelecidas pela Exxtend quanto aos oligos de interesse e seus respectivos desenhos.

3.15.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA

A análise quantitativa de expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real obtidas no termociclador (QuantStudio 3 Real Time PCR, Thermo Scientific, EUA) e com o uso dos oligos selecionados e desenhados com uso das informações e referências do National Center for Biotechnology Information (NCBI - https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Tabela 3).

Os ensaios foram realizados com as soluções contidas no kit GoTaq®1-Step RT-qPCR System (A6020 - Promega®), organizados em duplicatas nas placas (96 poços) onde foram pipetados por poço, 4 µL de RNA sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 10 µL de GoTaq® qPCR Master Mix 2x, 2µL de água ultrapura (Nuclease free water) e 2 µL (100nM) de cada primer (*forward* e *reverse*). Os parâmetros de amplificação foram configurados de acordo com o manual do kit One-Step seguindo os seguintes parâmetros para obtenção das curvas:

1) Transcriptase Reversa (TR) - 1 ciclo 37°C por 60 min.
2) Inativação da TR e Ativação do aquecimento - 1 ciclo 95°C por 15 min.
3) 40 ciclos
3.1) Desnaturação - 95°C por 30s.
3.2) Anelamento - 58°C por 45s.
3.3) Extensão - 72°C por 1 min
4) Dissociação - 1 ciclo 60-95°C.

Ao fim das etapas, o limiar de quantificação (Ct) de cada amostra foi comparado entre as duplicatas e determinado automaticamente pelo software. Os valores de *fold-change* foram obtidos e computados em planilha para obtenção das médias e desvios padrões de cada primer por grupos (SILVA et al., 2016). A etapa de análise quantitativa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Industrial do Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro-SP, sob supervisão do Prof. Dr. Jonas Contiero.

A análise estatística realizada após a obtenção das médias e desvios padrões foi *One Way* ANOVA com pós teste de Tukey para análise entre grupos para cada primer

de interesse com nível de significância estabelecido de $p<0.05$, por meio do software GraphPad Prism® 8.4.3.

Tabela 3. Primers utilizados para análise da expressão gênica.

Primers		Sequência 5'-3'	Código NCBI
GAPDH	*Forward*	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	NM_017008.4
	Reverse	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG	
β-Actina	*Forward*	CCCAGGCATTGCTGACAGG	NM_031144.3
	Reverse	ATAGAGCCACCAATCCACACAG	
NG2	*Forward*	AGCCCATGGCCTTCACTATC	NM_031022.2
	Reverse	GAGGGATGGGCACAATAGCC	
S100	*Forward*	CCCTCCTAGTCCTCGGACAC	NM_013191.2
	Reverse	AACCATGGCCTTCTCCAGC	
AChR-α	*Forward*	GATGACCACCAATGTCTGGCT	NM_133420.1
	Reverse	AGGGAGGTGACATTGCCAAA	
Agrina	*Forward*	GAGATCCTCAACGTGGACCC	NM_001429555.1
	Reverse	TTGCCTTTCAAGTACCGCCA	
NrG1	*Forward*	AGTCAGGAACTCAGCCACAA	NM_001271118.3
	Reverse	CCAGTCGTGGATGTCGATGT	
TGF - β	*Forward*	TAATGGTGGACCGCAACAAC	NM_021578.2
	Reverse	GCTTCCCGAATGTCTGACGTA	
IGF	*Forward*	ATACTGGCAGTGGTCTTGCT	NM_012589.2
	Reverse	CAGCTCCTCCAGAACTTCCA	

3.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism® 8.4.3, para a determinação do tratamento estatístico adequado para as variáveis quantitativas (Tabela 4) foram consideradas a distribuição dos dados (distribuição gaussiana), a homogeneidade das variâncias e a dependência temporal, além da prévia remoção dos outliers para cada variável de interesse.

A normalidade de distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk (alfa=0.05), e as variáveis com distribuição não-normal foram analisadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ($p<0.05$).

As amostras foram analisadas e estabelecidas como não paramétricas, desta forma as variáveis foram registradas e submetidas à análise de variância *One Way* ANOVA com pós teste de Tukey ($p<0.05$) de acordo com o recomendado pelo software para o cálculo de interesse, onde foram obtidos os valores de "p" e registrados com valor de proximidade na descrição dos gráficos de cada tópico.

Tabela 4. Organização das análises das variáveis quantitativas.

Análise de Variáveis Quantitativas							
Microscopia de Luz	Núcleos Celulares	Volume dos núcleos celulares (μm^2)		Porcentagem dos núcleos celulares (%)			
	Picrosirius Red	Volume do tecido conjuntivo (μm^2)		Porcentagem do Tecido conjuntivo (%)			
Imunofluorescência	Receptores pré-sinápticos	Área Corada (μm^2)	Área Total (μm^2)	Perímetro Corado (µm)	Perímetro Total (µm)	Diâmetro Máximo (µm)	Dispersão (Área Corada/ Área total x 100) (%)
	Canais de Cálcio	Área Corada (μm^2)	Área Total (μm^2)	Perímetro Corado (µm)	Perímetro Total (µm)	Diâmetro Máximo (µm)	Dispersão (Área Corada/ Área total x 100) (%)
	Receptores pós-sinápticos	Área Corada (μm^2)	Área Total (μm^2)	Perímetro Corado (µm)	Perímetro Total (µm)	Diâmetro Máximo (µm)	Dispersão (Área Corada/ Área total x 100) (%)
qPCR	Análise de Expressão Gênica	(2^ (-Delta Delta Ct))					

Fonte: Elaborado pelo autor. Organização das variáveis quantitativas que foram mensuradas, divididas por técnica e com as fórmulas e unidades de medida.

4. RESULTADOS

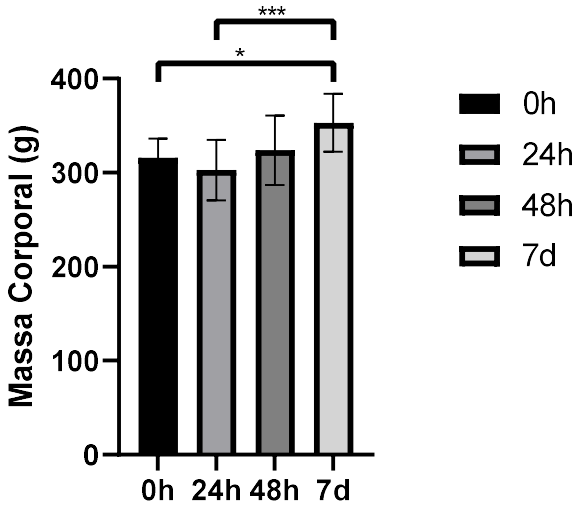
4.1 MASSA CORPORAL

A massa corporal dos animais dos grupos pós lesão foi mensurada previamente a eutanásia e dissecação das amostras de interesse. A comparação foi realizada apenas entre os Grupos lesionados, pois as amostras do Grupo C foram os membros contralaterais do Grupo LM0h, desta forma a avaliação da massa corporal pode ser estabelecida e comparada de acordo com a evolução dos dias após injúria (Figura 8).

O Grupo LM0h apresentou uma média de 315,9g, 4,1% maior do que o Grupo LM24h que apresentou média de 302,6g, já a comparação com o Grupo LM48h que demonstrou média de 323,9g observou-se um aumento de 2,5%, em comparação com o Grupo LM7d com média de 352,9g houve aumento de 11,7% ($p<0.1$).

O Grupo LM24h apresentou a menor média de massa corporal, com valores 7% menores do que o Grupo LM48h, e 16,5% ($p<0.001$) menores do que o Grupo LM7d. Por fim, o Grupo LM48h apresentou média 8,9% menor do que o Grupo LM7d com maiores valores de média entre os grupos experimentais.

Figura 8. Dados das massas corporais dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias e desvios padrões das massas corporais dos grupos experimentais referentes aos períodos pós protocolo. LM0h≠LM7d ($p<0.01$)*, LM24h≠LM7d ($p<0.001$) **. O grupo C não foi adicionado, pois foi representado pela massa do Grupo LM0h, devido ao fato de que as amostras do Controle foram coletadas do membro contralateral do 0h. Para esta variável a análise estatística realizada foi a ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey com nível de significância de $p<0.05$.

4.2 MASSA MUSCULAR

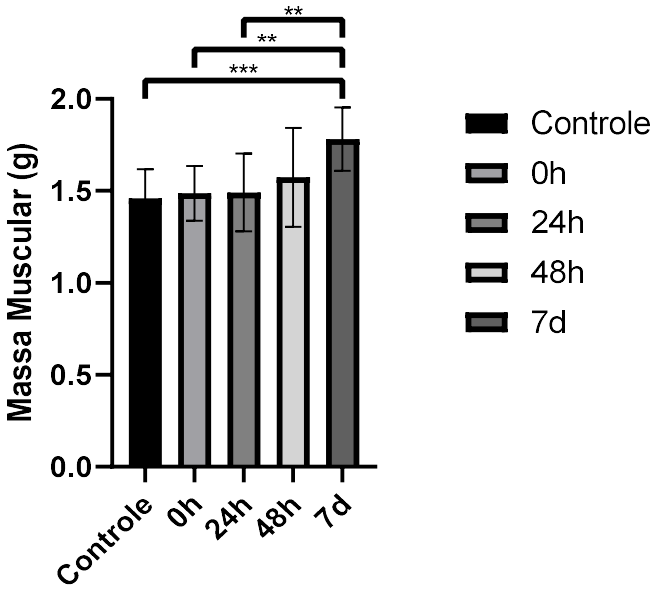
A massa muscular de todos os grupos experimentais foi mensurada logo após a dissecação para as respectivas análises e incluiu o Grupo C (membro contralateral do Grupo LM0h) para comparação (Figura 9).

O grupo C apresentou uma média de massa muscular de 1,459g, já o Grupo LM0h apresentou uma média de 1,486g 1,8% maior do que o Grupo C, o Grupo LM24h 1,491g 2,1% maior, o Grupo LM48h 1,573g com aumento de 7,8%. E por fim o Grupo LM7d apresentou 1,781g de média com aumento de 22% ($p<0.0001$) em relação ao C.

Em comparação com os grupos referentes aos períodos de lesão, o Grupo LM0h apresentou massa 0,3% menor do que o Grupo LM24h, 5,8% menor do que o Grupo LM48h e 19,8% menor ($p<0.001$) do que o Grupo LM7d.

O Grupo LM24h em relação ao LM48h demonstrou valores 5,4% menores e em relação ao LM7d 19,4% menor ($p<0.001$), já o Grupo LM48h em relação ao LM7d apresentou valores de massa muscular 13,2% menores do que o Grupo LM7d.

Figura 9. Dados da massa do músculo gastrocnêmio.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias e desvios padrões da massa dos músculos gastrocnêmios coletados e mensurados inteiros em todos os grupos experimentais. C ≠LM7d ($p<0.0001$) *, LM0h≠LM7d; LM24h≠LM7d ($p<0.001$) ***. Para a massa muscular a análise estatística estabelecida foi ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey e nível de significância estabelecido em $p<0.05$.

4.3 DISPOSIÇÃO DOS NÚCLEOS CELULARES

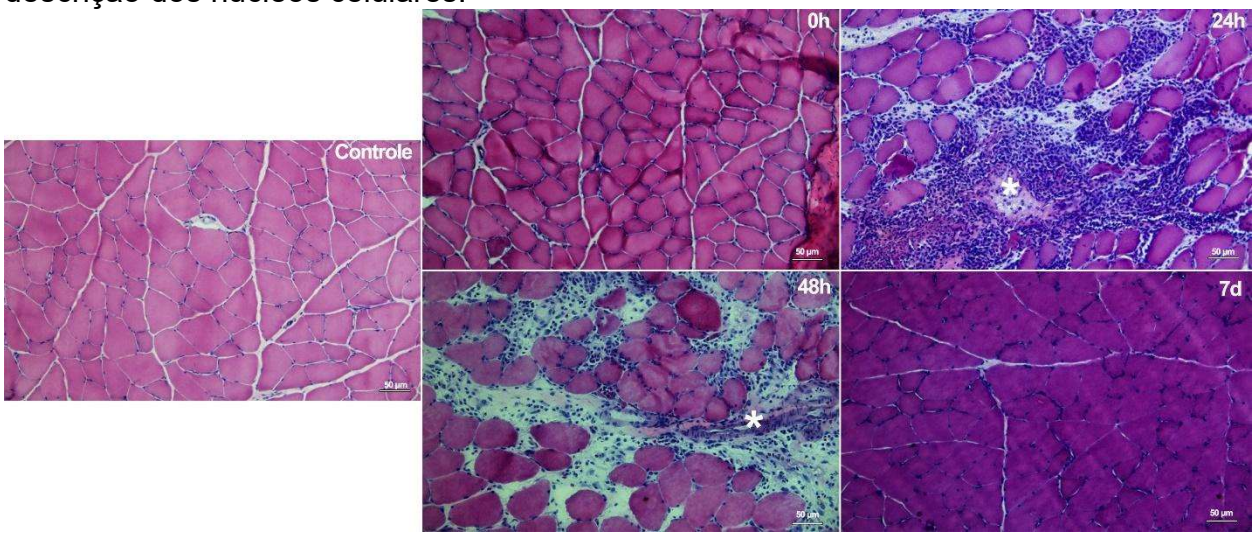
Os cortes transversais foram corados com hematoxilina e eosina e analisados através de microscópio de luz para avaliação qualitativa do comprometimento tecidual e revelar as adaptações nos diferentes períodos (Figura 10).

No Grupo C foi possível observar os núcleos periféricos às fibras musculares em aspecto padrão a morfologia tecidual do músculo estriado esquelético dos animais. No Grupo LM0h foi observado o aumento dos núcleos periféricos e o rearranjo das fibras musculares com redução dos limites intersticiais entre estas.

No Grupo LM24h foi possível identificar a região lesionada com acúmulo massivo de núcleos celulares e com algumas fibras com núcleos centralizados como tentativa de recuperar tais fibras musculares em resposta à lesão.

No Grupo LM48h as fibras musculares já aparentam sinais de regeneração com aspectos circulares e os núcleos da região apresentam dissipação em relação ao Grupo LM24h. Por fim o Grupo LM7d apresenta o aspecto padronizado das fibras circulares, ainda com alguns núcleos adicionais no interstício.

Figura 10. Cortes transversais corados com hematoxilina e eosina para identificação e descrição dos núcleos celulares.



Fonte: Elaborado pelo autor. Microscopia de luz com as colorações de hematoxilina e eosina para demonstrar qualitativamente a alteração na disposição nuclear em todos os grupos musculares que apresentaram alta concentração nuclear regionalizada, principalmente nos períodos de 24h e 48h (*) diante do processo regenerativo das fibras musculares, já renovadas no período 7d. Barras: 50 µm.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO ASSOCIADO

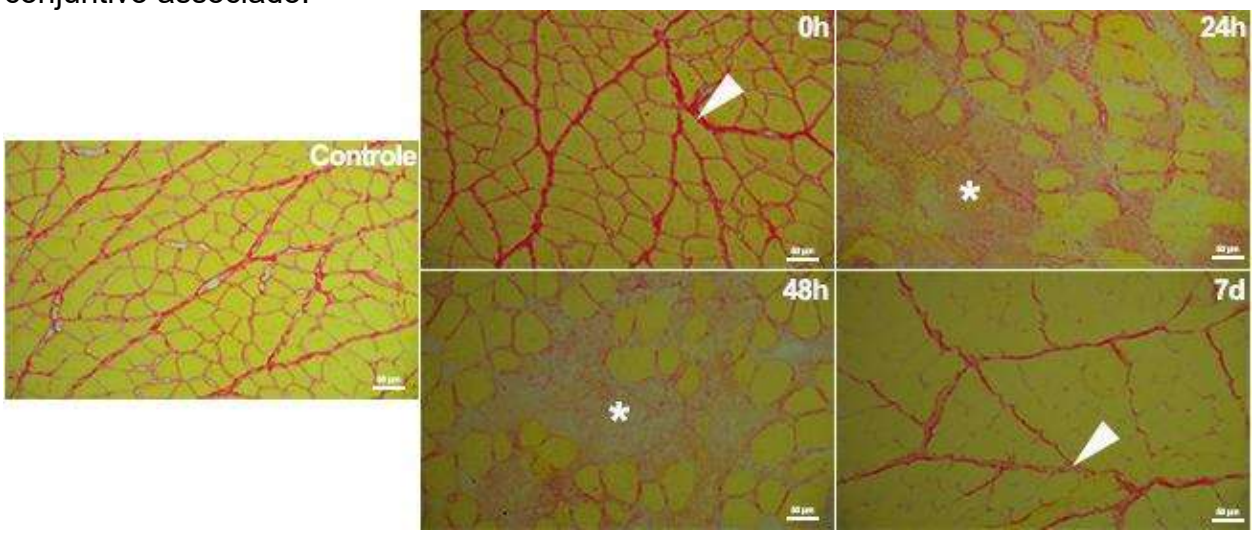
Os cortes transversais da região foram utilizados para avaliação qualitativa da morfologia do tecido conjuntivo entre as fibras e para a identificação das regiões com fibrose tecidual, para isso foram corados com Picrosirius Red (Figura 11).

Foi possível observar no Grupo C o aspecto padrão do tecido conjuntivo associado entre as fibras musculares e a disposição destas fibras e congruência. No Grupo LM0h foi possível identificar o aumento do colágeno intersticial entre as fibras musculares, porém sem alteração na arquitetura tecidual muscular.

O Grupo LM24h apresentou os primeiros sinais de acúmulo de tecido conjuntivo e aspecto fibrótico com a descaracterização das fibras musculares na região afetada, em comparação no Grupo LM48h foi possível observar alguns pontos de fibrose e o rearranjo de algumas pequenas fibras musculares já em estado de regeneração muscular apresentado pelo efeito pós inflamatório.

Por fim foi observado no Grupo LM7d a reconstrução das fibras musculares já em arranjo padrão, porém com redução do tecido conjuntivo entre elas em comparação com o Grupo C.

Figura 11. Cortes transversais corados com Picrosirius para identificação do tecido conjuntivo associado.



Fonte: Elaborado pelo autor. Microscopia de luz com a coloração de Picrosirius onde foi possível demonstrar qualitativamente os aspectos do tecido conjuntivo em todos os grupos experimentais por períodos, que apresentaram regiões de acúmulo de tecido conjuntivo associado entre as fibras (seta) e regiões de fibrose como efeito inflamatório diante do protocolo de lesão muscular (*). Barras: 50 µm.

4.5 MORFOMETRIA – MICROSCOPIA DE LUZ

Após a obtenção das imagens de microscopia de luz do ventre muscular e com uso das colorações de hematoxilina e eosina (média do n° de imagens = 45 por grupo) para destaque dos núcleos celulares e Picrosirius (média do n° de imagens = 45) por grupo) para destaque do tecido conjuntivo associado foram realizadas as mensurações das respectivas regiões e obtidas as médias e desvios padrões das variáveis de volume e porcentagem dos elementos avaliados (Figura 12).

Para a variável do volume dos núcleos a comparação entre o Grupo Controle apresentou valores de média 10,6% maior do que o Grupo LM0h, 186,9% ($p<0.05$) menor do que o Grupo LM24h, 148,8% menor do que o Grupo LM48h e 168,1% menor do que o Grupo LM7d, em relação aos períodos pós lesão o Grupo LM0h apresentou média 221,9% menor do que o Grupo LM24h ($p<0.05$), 178,6% menor do que o Grupo LM48h e 200,2% menor do que o Grupo LM7d, entre os Grupos LM24h e LM48h a média foi 13,2% maior, entre LM24h e LM7d foi 6,5% menor e por fim entre os Grupos LM48h e 7d os valores de média foram 7,7% maiores (Figura 12A).

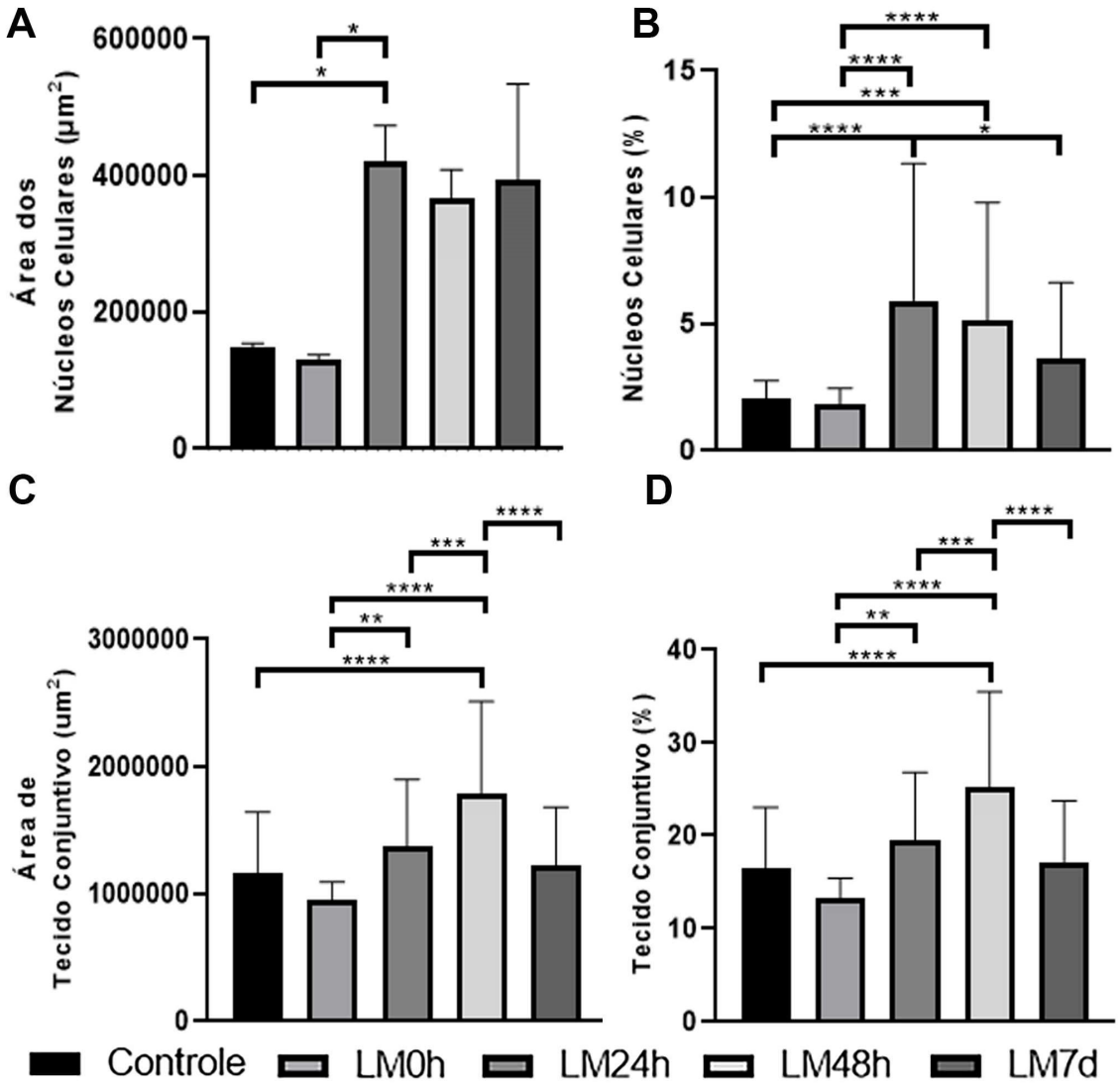
Para a porcentagem dos núcleos o Grupo Controle apresentou média 12,1% maior do que o Grupo LM0h, 187,3% menor do que o Grupo LM24h ($p<0.0001$), 149,1% menor do que o Grupo LM 48h ($p<0.001$) e 75,7% menor do que o Grupo LM7d. Entre os grupos pós-lesão o Grupo LM0h apresentou valores 221,7% menor do que o Grupo LM24h ($p<0.0001$), 178,8% menor do que o Grupo LM48h ($p<0.001$) e 96,7% menor do que o Grupo LM7d, o Grupo LM24h em relação aos demais apresentou média 13,3% maior do que o LM48h e 38,8% maior do que o Grupo LM7d ($p<0.01$), por fim o Grupo LM48h apresentou média 29,4% maior do que o Grupo LM7d (Figura 12B).

Para a variável do volume de tecido conjuntivo associado o Grupo Controle apresentou média 18,3% maior do que o Grupo LM0h, 17,7% menor do que o Grupo LM24h, 53,7% menor do que o Grupo LM48h ($p<0.0001$) e 4,3% menor do que o Grupo LM7d, em relação aos demais grupos, LM0h apresentou média 45,2% ($p<0.01$) menor do que o Grupo LM24h, 89,5% menor do que o Grupo LM48h ($p<0.0001$) e 28,6% menor do que o Grupo LM7d, já o Grupo LM24h apresentou média 30,5% menor que o Grupo LM48h ($p<0.001$) e 11,4% maior em comparação ao Grupo LM7d, o Grupo LM48h com

maior valor de média entre todos por fim apresentou a média volume de tecido conjuntivo 32,1% maior ($p<0.0001$) que o Grupo LM7d (Figura 12C).

Por fim, a variável da porcentagem de tecido conjuntivo associado demonstrou em comparação das médias no Grupo Controle 18,6% maior em relação ao Grupo LM0h, 18,1% menor em relação ao Grupo LM24h, 54,1% menor do que o Grupo LM48h ($p<0.0001$) e 4,6% menor que o Grupo LM7d. Dentre os grupos pós-lesão, o Grupo LM0h apresentou média 45,2% menor ($p<0.01$) que o Grupo LM24h, 89,5% menor que o Grupo LM48h ($p<0.0001$) e 28,6% menor que o Grupo LM7d, o Grupo LM24h apresentou média 30,4% menor que o Grupo LM48h ($p<0.001$), 11,4% menor que o Grupo LM7d e na última comparação o Grupo LM7d apresentou média 32,1% maior ($p<0.0001$) que o Grupo LM7d (Figura 12D).

Figura 12. Gráficos das variáveis de área obtidas através das colorações de HE e PS.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias e desvios padrões das mensurações da (A) área dos núcleos celulares, (B) porcentagem da área dos núcleos, (C) área do tecido conjuntivo e (D) porcentagem da área de tecido conjuntivo. (A) C≠LM24h, LM0h≠LM24h ($p<0.01$) *; (B) C≠LM24h, LM0h≠LM24h, LM0h≠LM48h ($p<0.0001$) ****, C≠LM48h ($p<0.001$) ***, LM24h≠LM7d ($p<0.01$) *, (C) C≠LM48h, LM0h≠LM48h, LM48h≠LM7d ($p<0.0001$) ****, LM24h≠LM48h ($p<0.001$)***, LM0h≠LM24h ($p<0.01$) **; (D) C≠LM48h, LM0h≠LM48h, LM48h≠LM7d ($p<0.0001$) ****, LM24h≠LM48h ($p<0.001$)***, LM0h≠LM24h ($p<0.01$) **. Para as variáveis de área foi estabelecida a análise ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey com nível de significância estabelecido em $p<0.05$.

4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA – RECEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS (BASSOON)

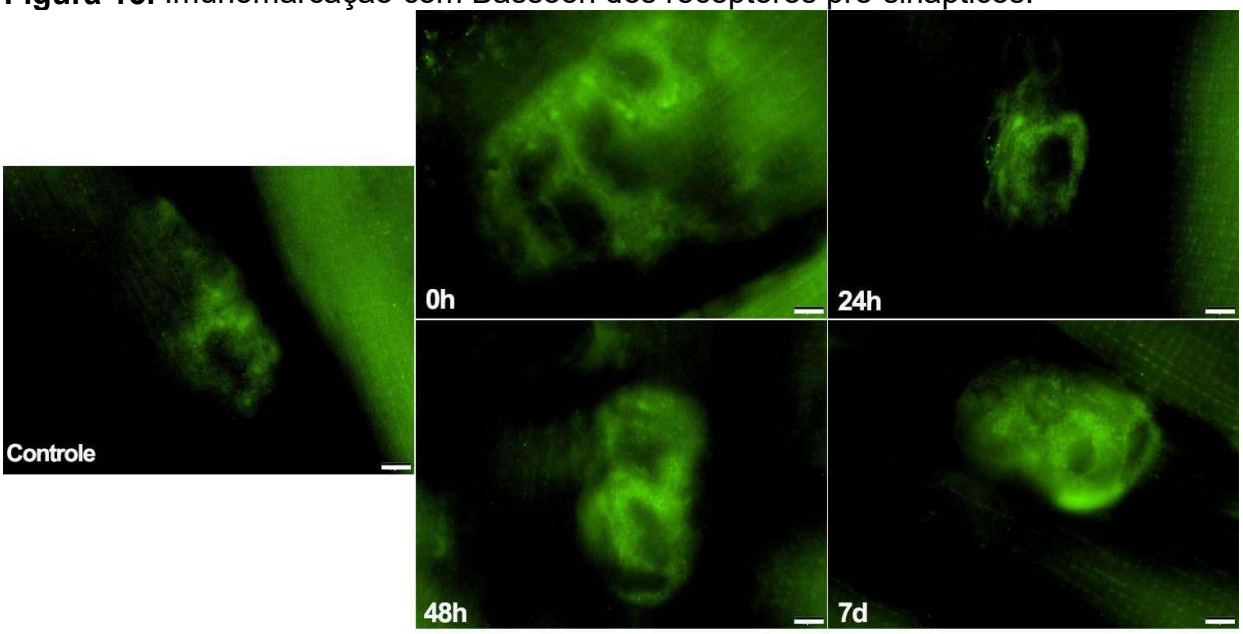
Para as análises de imunofluorescência da região pré-sináptica foram realizados cortes longitudinais da região lesionada onde foram evidenciados os receptores nas junções neuromusculares dos grupos experimentais (Figura 13).

O Grupo LM0h apresentou aumento em sua estrutura composta pelos receptores pré-sinápticos, decorrente do espaçamento entre os mesmos o que demonstra sua desorganização e dispersão.

No grupo LM24h foi possível observar a compactação da estrutura dos receptores, assim como a redução da área ocupada por estes e a redução dos espaços onde se encontrariam os núcleos desta região.

Nos grupos LM48h e LM7d a conformação dos receptores pré-sinápticos apresentam um padrão semelhante ao Grupo Controle, com maior dispersão no Grupo 48h, e o destaque para o rearranjo estrutural apresentado no grupo LM7d, assim como uma delimitação mais acentuada de sua área ocupada o que demonstra sua reorganização.

Figura 13. Imunomarcação com Bassoon dos receptores pré-sinápticos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Imunomarcação para análise qualitativa dos aspectos da região pré-sináptica em todos os grupos experimentais, que foram utilizados para a mensuração das variáveis de área, perímetro, diâmetro e dispersão. Barras: 5 µm.

4.5.1 MORFOMETRIA – RECEPTORES PRÉ-SINÁPTICOS (BASSOON)

Para a identificação da região pré-sináptica foram realizados cortes longitudinais do músculo gastrocnêmio onde foram realizadas as incubações (anti-Bassoon), e posteriormente obtidas as imagens e realizadas as respectivas mensurações das variáveis de interesse (Figura 14).

Em relação a área total do Grupo LM0h em comparação com o Grupo Controle, apresentou valores de média 40,3% maiores ($p<0.01$), por sua vez, o Grupo LM24h 23,9% menor, o Grupo LM48h 6,7% menor e o Grupo LM7d 29,7% maior. Entre os períodos pós lesão em comparação ao Grupo LM0h, LM24h apresentou valor 45,7% menor, LM48h 33,5% menor e LM7d 14,6% menor, em comparação ao Grupo LM24h, o Grupo LM48h obteve média 22,4% maior e LM7d 57,3% maior, por fim entre LM48h e LM7d houve aumento de 28,4% (Figura 14A).

Para os valores da área corada o Grupo LM0h apresentou média 34,8% maior ($p<0.05$), LM24h 2,4% menor, LM48h 7,3% menor e LM7d 16,6% maior que o Grupo

Controle. Em comparação com LM0h, LM24h apresentou média 43,6% menor e LM48h 31,3% menor, o Grupo LM7d apresentou valor de média 13,4% menor. Em relação ao LM24h, o grupo LM48h apresentou valor 21,9% maior e LM7d 53,6% maior, na última comparação LM48h apresentou 25,9% maior do que LM7d (Figura 14B)

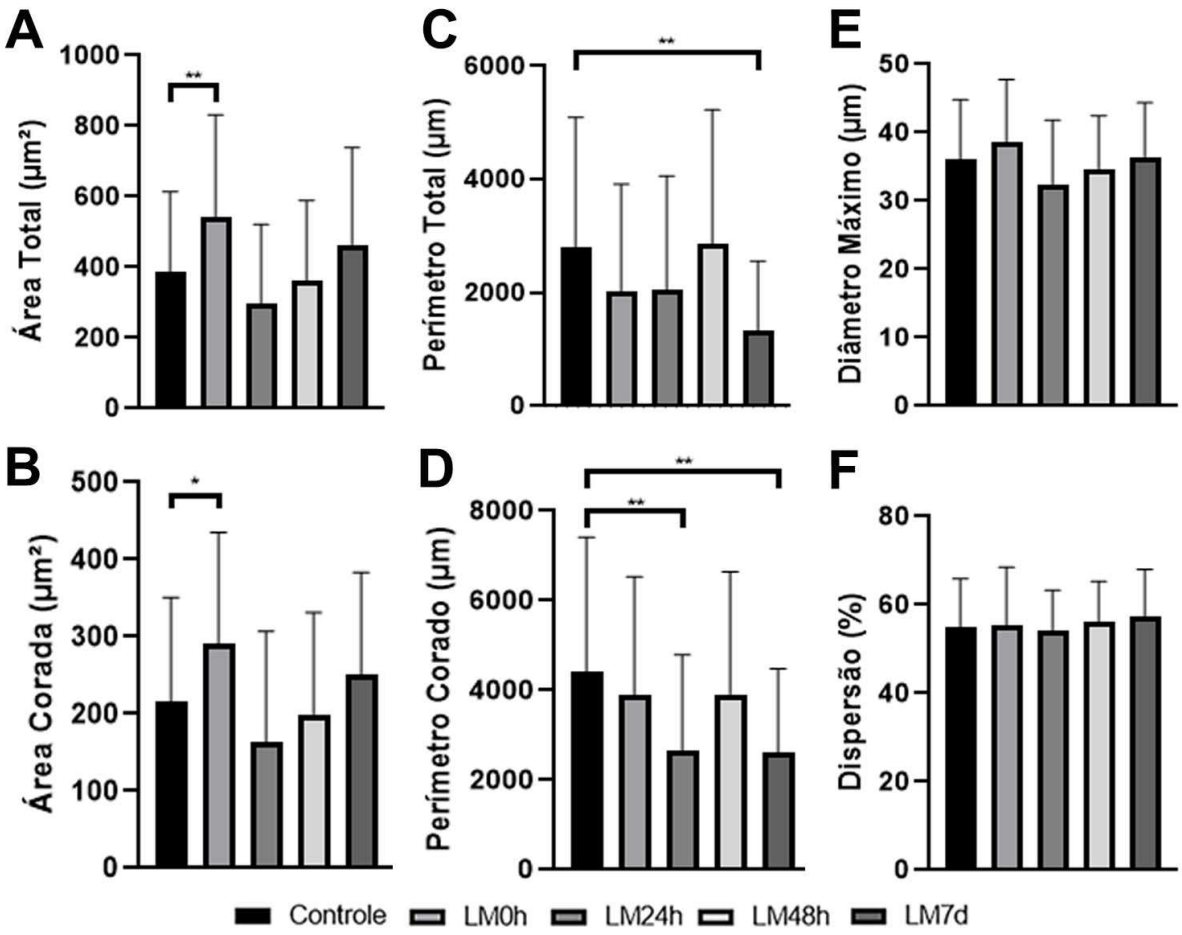
Em relação ao perímetro total o Grupo LM0h apresentou média 27,7% menor ($p<0.05$), LM24h 26,9% menor, LM48h 2,3% maior e LM7d 52,8% menor do que o Grupo Controle, entre os períodos, LM24h apresentou média 1,1% maior, LM48h 41,7% maior e LM7d 34,6% menor em comparação ao Grupo LM0h, comparados ao Grupo LM24h, LM48h apresentou valor 40,1% maior e LM7d 64,4% maior, entre LM48h e LM7d a média foi 116,9% menor para a respectiva variável (Figura 14C).

Para a variável de perímetro corado em comparação com o Grupo Controle, o Grupo LM0h apresentou valores de média 11,5% menor, o Grupo LM24h 39,4% menor ($p<0.01$), LM48h 11,3% menor e o Grupo LM7d 40,2% menor ($p<0.01$). Entre os períodos pós lesão em comparação ao Grupo LM0h, LM24h apresentou valor 31,5% menor, LM48h 0,4% maior, e LM7d 32,4% menor. Em comparação ao Grupo LM24h, o Grupo LM48h obteve média 46,7% maior e LM7d 1,3% menor, por fim entre LM48h e LM7d houve redução no valor de média de 32,7% (Figura 14D).

Em relação ao diâmetro máximo o Grupo LM0h apresentou média 6,9% maior, LM24h 9,8% menor, LM48h 3,6% menor e LM7d 1,24% maior quando comparados ao Grupo Controle. LM24h apresentou média 15,6% menor, LM48h 9,9% menor e LM7d 5,3% menor em comparação ao Grupo LM0h, comparados ao Grupo LM24h, LM48h apresentou valor 6,8% maior e LM7d 12,2% maior, entre LM48h e LM7d a média foi 5% maior para a variável de interesse (Figura 14E).

Para a última variável, dispersão, o Grupo LM0h apresentou valor de média 1,07% maior, LM24h 1,5% menor, LM48h 2% maior e LM7d 4,6% maior que o Grupo Controle. Em comparação com LM0h, LM24h apresentou média 2,6% menor e LM48h 0,9% maior, o Grupo LM7d apresentou valor de média 3,4% maior. Em relação ao LM24h, o grupo LM48h apresentou valor 3,6% e LM7d 6,2% maiores, por fim, na última comparação entre LM48h e LM7d, o Grupo LM7d apresentou valor de média 2,5% maior (Figura 14F).

Figura 14. Gráficos das variáveis referentes aos receptores pré-sinápticos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias e desvios padrões das mensurações da (A) área total, (B) área corada, (C) perímetro total, (D) perímetro corado, (E) diâmetro máximo e (F) dispersão dos receptores pré-sinápticos de todos os grupos experimentais. (A) C≠LM0h ($p<0.01$) **; (B) C≠LM0h ($p<0.05$) *; (C) C≠LM7d ($p<0.01$) **, (D) C≠LM24h ($p<0.01$) **, (D) C≠LM7d ($p<0.01$) **. Para as variáveis de interesse foi realizado o teste ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey e nível de significância estabelecido em $p<0.05$.

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA – CANAIS DE CÁLCIO (P/Q)

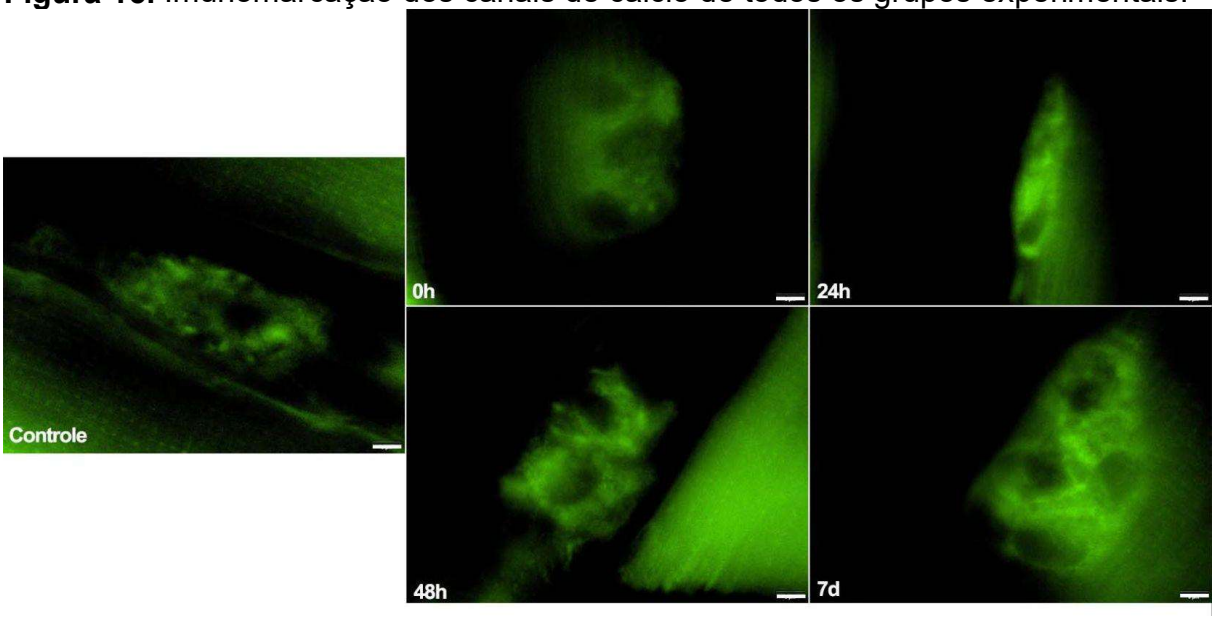
Para identificação dos canais de cálcio da junção neuromuscular pré e pós-sinápticos foram realizados cortes longitudinais da região lesionada de forma a identificar sua morfologia por fluorescência e posteriormente sua mensuração (Figura 15).

O Grupo LM0h e LM24h apresentam alterações em sua conformação estrutural visto que os canais de cálcio imunomarcados se referem as zonas ativas das junções

identificadas, o Grupo LM0h demonstra manter sua conformidade, mas baixa atividade, já o 24h apresenta desorganização estrutural do formato comum de pretzel, porém maior atividade das zonas ativas.

No Grupo LM48h a conformação demonstra a recuperação da atividade dos canais e alteração próxima da morfologia comum das junções neuromusculares e após 7 dias tanto a morfologia da atividade dos canais de cálcio quanto a estrutura em formato de pretzel e a apresentação dos locais onde estariam os núcleos das junções se apresenta intacta e interconectada.

Figura 15. Imunomarcação dos canais de cálcio de todos os grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor. Imunomarcação das JNMs onde foram observados os canais de cálcio presentes na junção neuromuscular. Representação qualitativa dos aspectos da região em todos os grupos experimentais onde posteriormente foram mensuradas as variáveis de área, perímetro, diâmetro e dispersão. Barras: 5 µm.

4.6.1 MORFOMETRIA – CANAIS DE CÁLCIO (P/Q)

Para a identificação dos canais de cálcio foram realizados cortes longitudinais do músculo gastrocnêmio onde foram realizadas as incubações (*P/Q calcium channel antibody*) e posteriormente capturadas as imagens e realizadas as respectivas mensurações das variáveis propostas em todos os grupos experimentais (Figura 16).

Diante dos cálculos da variável de área total em comparação com o Grupo Controle, o Grupo LM0h apresentou valores de média 2,11% maiores, o Grupo LM24h 33,7% menor ($p<0.01$), LM48h 5,2% maior e o Grupo LM7d 17,3% menor. Entre os períodos pós lesão em comparação ao Grupo LM0h, LM24h apresentou valor 35% menor, LM48h 0,88% maior e LM7d 19% menor, em comparação ao Grupo LM24h, o Grupo LM48h obteve média 58,3% maior e 7d 24,6% maior, por fim entre LM48h e LM7d houve redução de 19,7% (Figura 16A).

Para os valores da área corada o Grupo LM0h apresentou média 1,9% maior, LM24h 33,8% menor ($p<0.05$), LM48h 8,6% maior e LM7d 14,6% menor que o Grupo Controle. Em comparação com LM0h, LM24h apresentou média 35,1% menor e LM48h 6,5% maior, o Grupo LM7d apresentou valor de média 16,3% menor. Em relação ao LM24h, o grupo LM48h apresentou valor 64,3% maior e LM7d 29% maior, na última comparação LM48h apresentou 14,6% menor do que LM7d (Figura 16B)

Em relação ao perímetro total o Grupo LM0h apresentou média 9,2% maior, LM24h 16% menor, LM48h 7,5% menor e LM7d 26,7% menor do que o Grupo Controle, entre os períodos, LM24h apresentou média 23,1% menor, LM48h 15,3% menor e LM7d 32,9% menor em comparação ao Grupo LM0h, comparados ao Grupo LM24h, LM48h apresentou valor 10,1% maior e LM7d 12,7% menor, entre LM48h e LM7d a média foi 20,8% menor para a respectiva variável (Figura 16C).

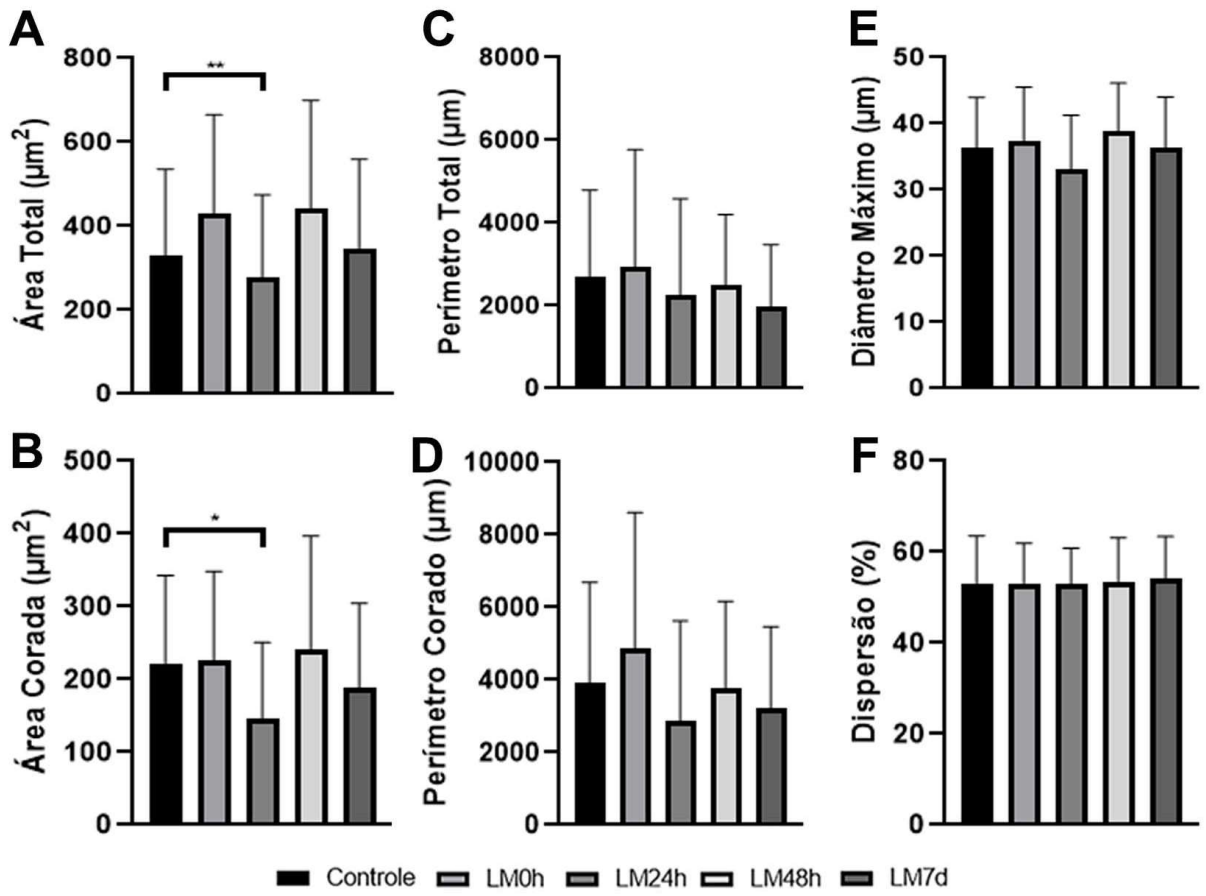
Para a variável de perímetro corado em comparação com o Grupo Controle, o Grupo LM0h apresentou valores de média 24,7% maiores, o Grupo LM24h 26,5% menor, LM48h 3,5% menor e o Grupo LM7d 17,3% menor. Entre os períodos pós lesão em comparação ao Grupo LM0h, LM24h apresentou valor 41,4% menor, LM48h 22,6% menor e LM7d 33,7% menor, em comparação ao Grupo LM24h, o Grupo LM48h obteve média 31,4% maior e LM7d 12,5% maior, por fim entre LM48h e LM7d houve redução no valor de média de 14,3% (Figura 16D).

Em relação ao diâmetro máximo o Grupo LM0h apresentou média 2,8% maior, LM24h 9,3% menor, LM48h 6,4% maior e LM7d 0,05% menor quando comparados ao Grupo Controle. LM24h apresentou média 11,8% menor, LM48h 3,4% maior e LM7d

2,8% menor em comparação ao Grupo LM0h, comparados ao Grupo LM24h, LM48h apresentou valor 17,4% maior e LM7d 10,2% maior, entre LM48h e LM7d a média foi 6,1% menor para a variável de interesse (Figura 16E).

Para a última variável, dispersão, o Grupo LM0h não apresentou valor de média distinto em relação ao Grupo Controle, já em relação aos demais grupos LM24h 0,3% menor, LM48h 0,7% maior e LM7d 2% maior que o Grupo Controle. Em comparação com LM0h, LM24h apresentou média 0,3% menor e LM48h 0,7% maior, o Grupo LM7d apresentou valor de média 2% maior. Em relação ao LM24h, o grupo LM48h apresentou valor 1% e LM7d 2,3% maiores, na última comparação LM48h apresentou valor de média 1,3% maior do que o Grupo LM7d (Figura 16F).

Figura 16. Gráficos das variáveis dos canais de cálcio.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias e desvios padrões das mensurações da (A) área total, (B) área corada, (C) perímetro total, (D) perímetro corado, (E) diâmetro máximo e (F) dispersão dos canais de cálcio (P/Q) nos grupos experimentais. (A) C≠LM24h ($p<0.01$) **; (B) C≠LM24h ($p<0.05$) *. Para estas variáveis foi estabelecida a análise estatística realizada ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey, e nível de significância estabelecido $p<0.05$.

4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA – RECEPTORES PÓS-SINÁPTICOS

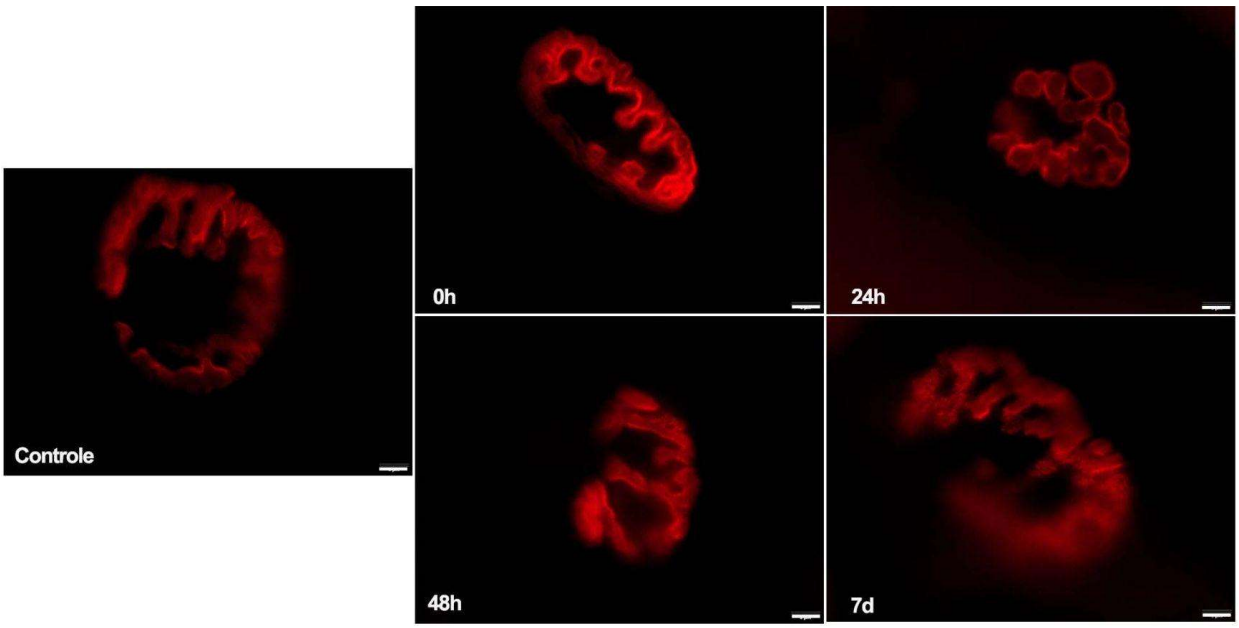
Para as análises de imunofluorescência foram realizados cortes longitudinais da região lesionada onde foram imunomarcados os receptores pós-sinápticos das junções neuromusculares em todos os grupos experimentais (Figura 17).

Dentre os grupos experimentais foi possível observar a redução morfológica da área de contato dos receptores pós-sinápticos nos grupos LM0h, LM24h e LM48, períodos mais agudos quanto ao procedimento realizado no protocolo de lesão muscular.

Com destaque para o amplo remodelamento dos receptores e da placa motora no Grupo LM 24h, o aparente rearranjo no Grupo LM48h, onde a estrutura aparenta o retorno a morfologia semelhante a dispersão evidenciada no do Grupo LM0h e no Grupo LM7d foi possível observar a conformação padrão semelhante ao do Grupo Controle.

Desta forma, podemos dizer que o efeito pós-lesão apresentou o comprometimento estrutural da região, que foi apresentado posteriormente em formato morfo quantitativo com as mensurações das variáveis de interesse.

Figura 17. Imunomarcação com α-bungarotoxina dos receptores pós-sinápticos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Imunomarcação com α-bungarotoxina dos receptores pós-sinápticos. Representação qualitativa dos aspectos dos receptores pós-sinápticos em todos os grupos experimentais analisados. Barras: 5 µm.

4.7.1 MORFOMETRIA – RECEPTORES PÓS-SINÁPTICOS (AChR)

Para a identificação dos receptores de acetilcolina na região pós-sináptica foram realizados cortes longitudinais do músculo gastrocnêmio seguido das incubações e fotomicrografias para as mensurações das variáveis propostas em todos os grupos experimentais (Figura 18).

Diante dos cálculos da variável de área total em comparação com o Grupo Controle, o Grupo LM0h apresentou valores de média 22,1% menores ($p<0.01$), o Grupo

LM24h 35,3% menor ($p<0.0001$), LM48h 37,7% menor ($p<0.0001$) e o Grupo LM7d 18,7% menor ($p<0.01$). Entre os períodos pós lesão em comparação ao Grupo LM0h, LM24h apresentou valor 16,9% menor, LM48h 19,9% menor e LM7d 2,8% maior, em comparação ao Grupo LM24h, o Grupo LM48h obteve média 3,5% menor e 7d 25,7% maior, por fim entre LM48h e LM7d houve aumento de 30,4% (Figura 18A).

Em relação a área corada o Grupo LM0h apresentou média 3,6%, LM24h 13,1%, LM48h 19,2% menor e LM7d 3,2% maior do que o Grupo Controle, entre os períodos, LM24h apresentou média 9,7% menor, LM48h 16,2% menor e LM7d 7,1% maior em comparação ao Grupo LM0h, comparados ao Grupo LM24h, LM48h apresentou valor 7,1% menor e LM7d 18,7% maior, entre LM48h e LM7d a média foi 27,9% maior para a respectiva variável (Figura 18B).

Para os valores do perímetro total o Grupo LM0h apresentou média 6,8% maior, LM24h 11,2% menor, LM48h 5,3% menor e LM7d 5,9% menor que o Grupo Controle. Em comparação com LM0h, LM24h apresentou média 16,88% menor e LM48h 11,33% menor, o Grupo LM7d apresentou valor de média 11,5% menor. Em relação ao LM24h, o grupo LM48h apresentou valor 6,6% maior e LM7d 6,4% maior, na última comparação LM48h apresentou 0,1% menor do que LM7d (Figura 18C).

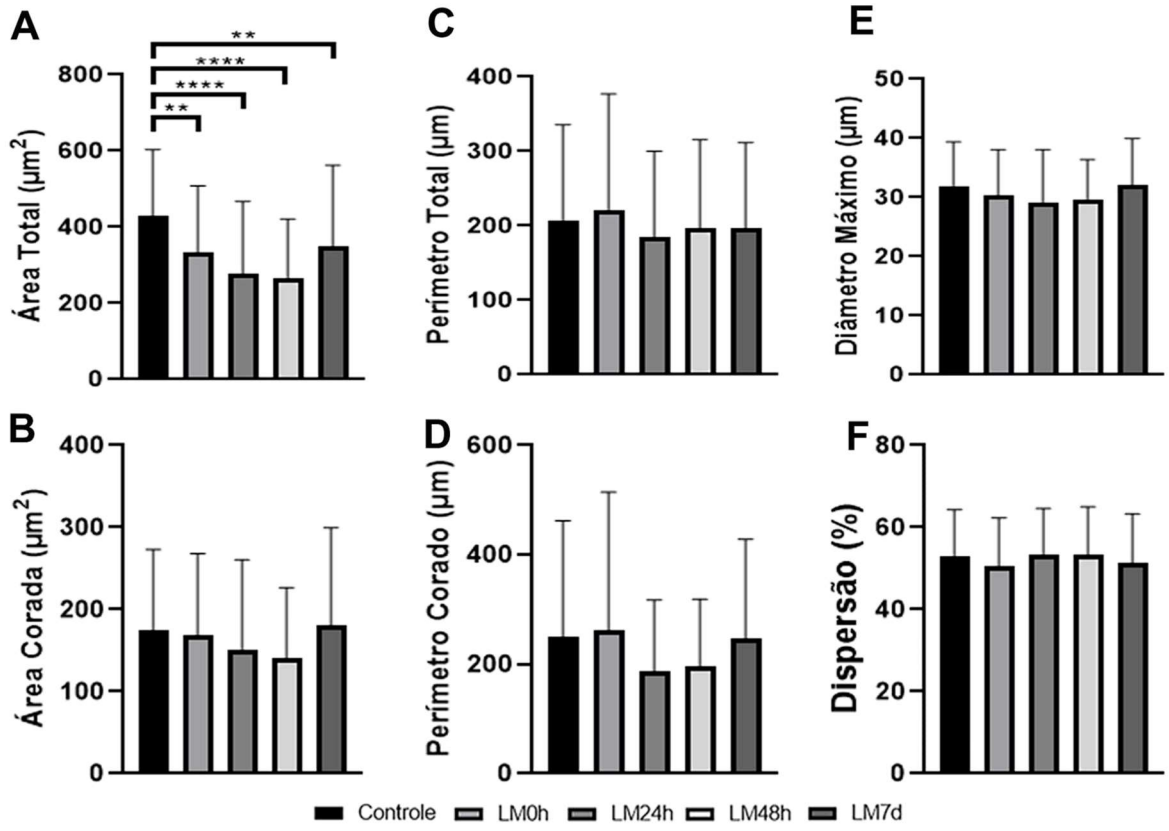
Para a variável de perímetro corado em comparação com o Grupo Controle, o Grupo LM0h apresentou valores de média 4,9% maior, o Grupo LM24h 25,5% menor, LM48h 21,1% menor e o Grupo LM7d 1,1% menor. Entre os períodos pós lesão em comparação ao Grupo LM0h, LM24h apresentou valor 29,1% menor, LM48h 24,7% menor e LM7d 5,7% menor, em comparação ao Grupo LM24h, o Grupo LM48h obteve média 6,1% maior e LM7d 32,7% maior, por fim entre LM48h e LM7d houve aumento no valor da média de 25,1% (Figura 18D).

Em relação ao diâmetro máximo o Grupo LM0h apresentou média 4,9%, LM24h 8,4%, LM48h 6,9% menor e LM7d 0,3% maior do que o Grupo Controle, entre os períodos, LM24h apresentou média 3,7% menor, LM48h 2,1% menor e LM7d 5,5% menor em comparação ao Grupo LM0h, comparados ao Grupo LM24h, LM48h

apresentou valor 1,7% maior e LM7d 9,7% maior, entre LM48h e LM7d a média foi 7,8% maior para a respectiva variável (Figura 18E).

Para a última variável, dispersão, o Grupo LM0h apresentou média 5,4% menor, LM24h 0,7% menor, LM48h 0,6% maior e LM7d 3,2% menor que o Grupo Controle. Em comparação com LM0h, LM24h apresentou média 5,9% maior e LM48h 5,7% menor, o Grupo LM7d apresentou valor de média 1,6% maior. Em relação ao LM24h, o grupo LM48h apresentou valor 0,1% menor e LM7d 4,2% menor, na última comparação LM48h apresentou valor de média 3,8% menor do que o Grupo LM7d (Figura 18F).

Figura 18. Médias e desvios padrões representados graficamente referentes aos receptores de AChR pós-sinápticos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Médias e desvios padrões das mensurações da (A) área total, (B) área corada, (C) perímetro total, (D) perímetro corado, (E) diâmetro máximo e (F) dispersão dos receptores pós-sinápticos de todos os grupos experimentais. (A)C≠LM0h; C≠LM7d ($p<0.01$) **, C≠LM24h; C≠LM48h ($p<0.0001$) ****. Para as variáveis realizado o teste ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey e nível de significância estabelecido $p<0.05$.

4.8 CÉLULAS PERISSINÁPTICAS DE SCHWANN

Para a identificação das CPS foram realizados cortes longitudinais do músculo lesionado onde foram imunomarcados os receptores pós-sinápticos das junções neuromusculares, os núcleos celulares e identificadas em sobreposição as células que compõem a interface neuromuscular (Figura 19).

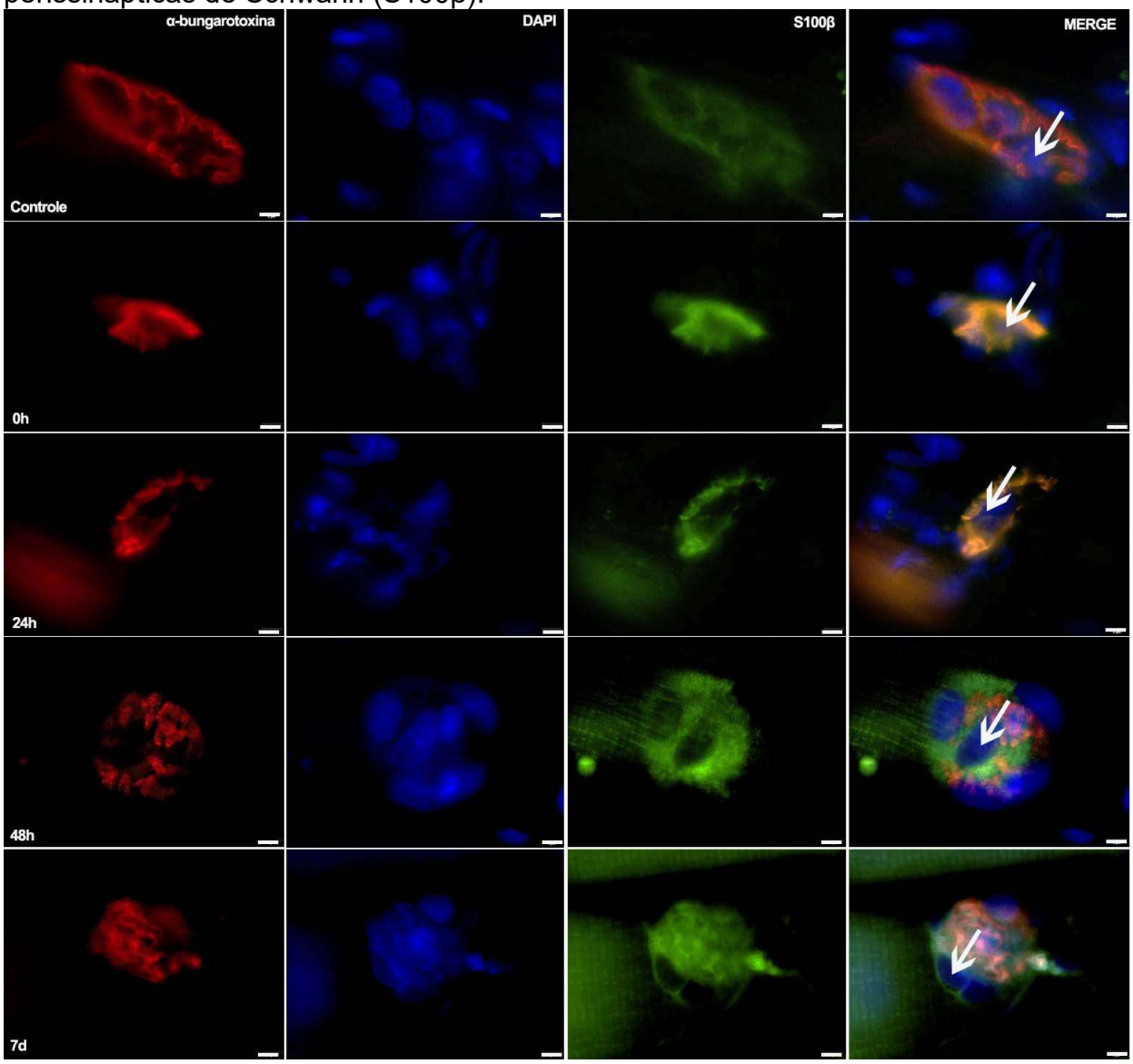
Foram identificadas em todos os grupos experimentais as CPS, em sobreposição a região da JNM e em conjunto com os demais núcleos presentes na região.

Na imagem representativa do Grupo C foram identificados 3 núcleos das CPS, número padrão considerado pela literatura, distinto do Grupo LM0h e LM24h onde foi possível observar apenas 2 núcleos correspondentes às células de interesse, além disso, a redução da sinalização de imunomarcação por S100 que determina o acometimento do protocolo agudo nesta região e especificamente nestes elementos celulares. Tendo em vista que as células estão em uma disposição bidimensional, a concentração destas com a redução qualitativa de S100 demonstra a aproximação e concentração destas na região.

Nos Grupos LM48h e LM7d, foram observadas 4 e 3 núcleos das CPS, e a disposição destas, assim como a sinalização de S100 semelhante à do Grupo Controle, o que determina o retorno ao estágio padrão destas células após este período.

Importante ressaltar que nos grupos LM0h e LM24h a sinalização de S100 se delimita igualmente a marcação dos receptores pós-sinápticos, diferente dos grupos LM48h e LM7d onde a sinalização de S100 ultrapassa a dos receptores pós-sinápticos.

Figura 19. Identificação dos núcleos celulares na junção neuromuscular e das células perissinápticas de Schwann (S100β).



Fonte: Elaborado pelo autor. Imagens de imunomarcação com a identificação e disposição dos núcleos celulares (DAPI - azul) da JNM (α-bungarotoxina - vermelho) e das CPS (S100β - verde) identificadas (seta) em todos os grupos experimentais. Barras: 5 µm.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS TELÓCITOS

Para as análises de imunofluorescência foram realizados cortes longitudinais do músculo lesionado onde foram evidenciados os receptores pós-sinápticos das junções neuromusculares, os núcleos desta região e identificação pela primeira vez dos telócitos adjacentes as células da interface neuromuscular (Figura 20).

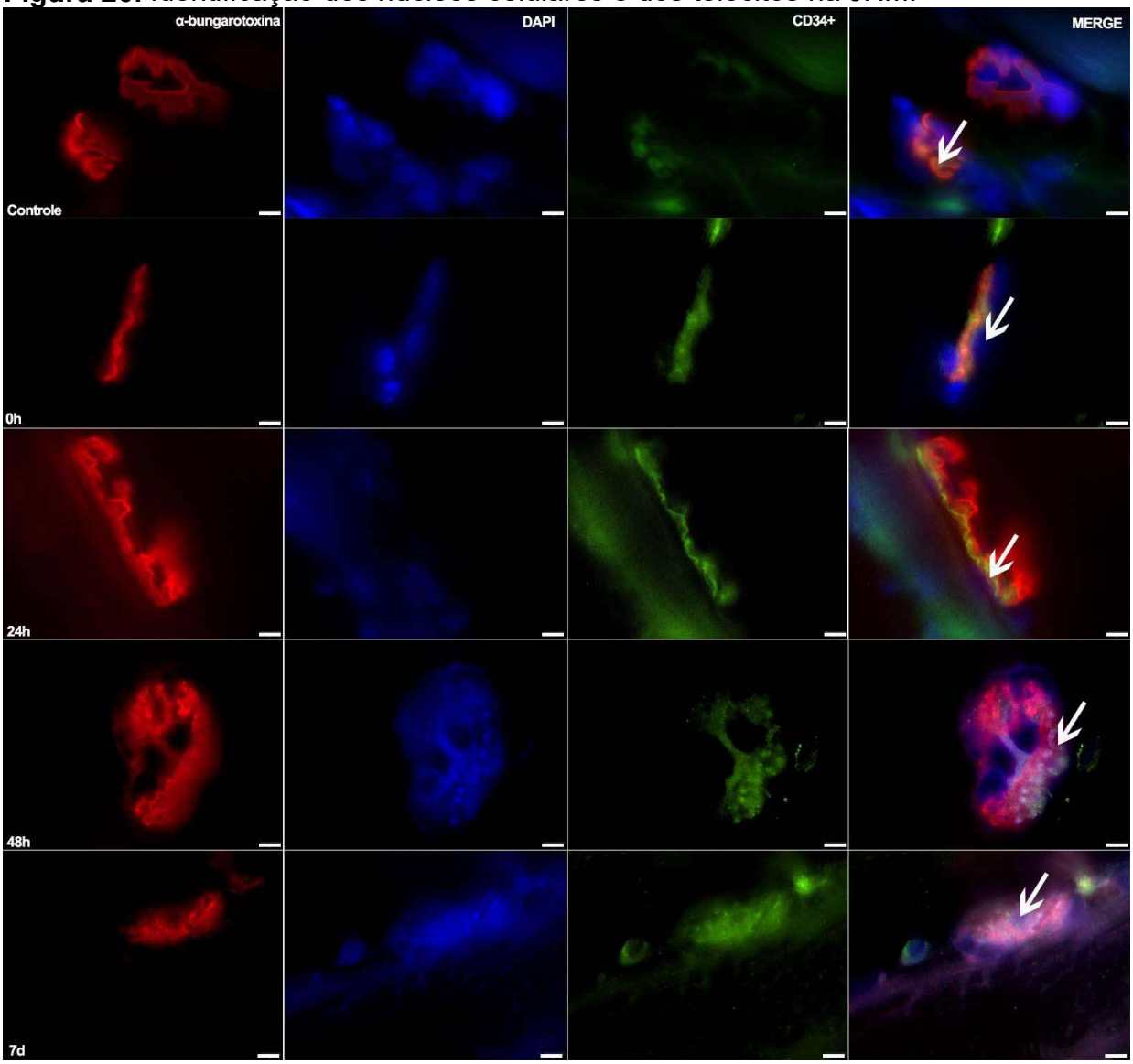
No Grupo C foi possível identificar os telócitos na periferia da JNM imunomarcados e identificados com 2 núcleos, assim como no Grupo LM0h, porém neste os telócitos estão em sobreposição aos receptores pós-sinápticos.

No Grupo LM24h foram identificados 2 núcleos de telócitos, porém estes estão presentes adjacentes ao sarcolema da fibra muscular e a região da placa motora em possível interação com as células desta região.

No Grupo LM48h e no Grupo LM7d os telócitos se apresentam assim como no Grupo LM0h em sobreposição a placa motora e associados aos núcleos celulares que coabitam esta interface em possível interação.

Em geral, os telócitos foram identificados perifericamente as células sinápticas centrais (CPS) em todos os grupos experimentais, o que comprova a descoberta de sua presença, localização específica e atuação na JNM.

Figura 20. Identificação dos núcleos celulares e dos telócitos na JNM.



Fonte: Elaborado pelo autor. Identificação dos núcleos celulares e dos telócitos na junção neuromuscular. Imunomarcação de todos os grupos experimentais e apresentação da disposição dos núcleos celulares (DAPI - azul) da junção neuromuscular (α-BTX - vermelho) e a identificação (seta) dos telócitos (CD34 - verde) em todos os grupos experimentais apresentados por período. Barras: 5 µm.

4.10 CULTIVO CELULAR

Para o cultivo celular, os animais foram dissecados e o músculo gastrocnêmio foi preparado de acordo com a metodologia descrita, posteriormente foram imunomarcados positivamente com anticorpo primário positivo para os telócitos (CD34/vermelho), de forma a identificar sua relação e semelhança morfológica (Figura 21).

Os 2 animais do Grupo C foram eutanasiados e o músculo gastrocnêmio foi dissecado e colocados diretamente para lavagem em PBS em placas (Figura 21A), posteriormente os músculos foram fragmentados (3 mm3) com lâminas de bisturi em pequenos pedaços para dar seguimento ao protocolo de cultura (Figura 21B).

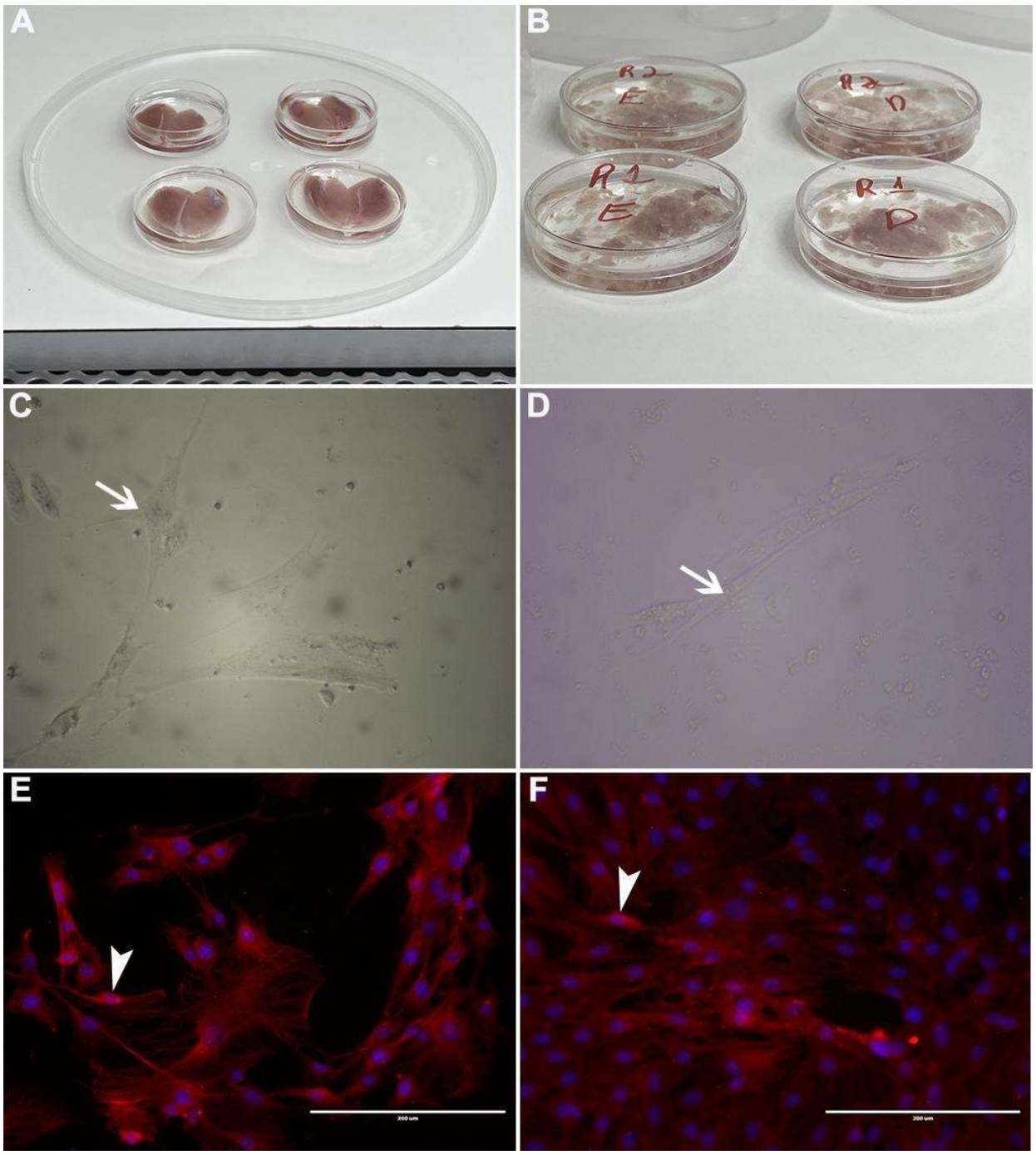
Após o protocolo de cultivo as placas foram analisadas após 7 dias em estufa para avaliação da aderência de células e para registro no microscópio óptico, tanto de CPS (Figura 21C) como de telócitos (Figura 21D), posteriormente as células retornaram para a estufa.

Após 10 dias foram realizados os testes de imunomarcação das células de Schwann e dos telócitos com o anticorpo CD34 (marcador padrão de telócitos) e foram registradas as imagens das placas com os anticorpos.

Os resultados apresentaram uma única marcação quanto as CPS (Figura 21E) e o anticorpo padronizado para telócitos, enquanto a placa de telócitos apresentou uma maior quantia de marcações positivas (Figura 21F). Além disso, nas placas sem marcações pode-se observar a diferente morfologia das células produzidas, com a formação de nichos no caso dos telócitos e maiores prolongamentos, e no caso da CPS, poucos nichos e células com projeções distintas dos caracterizados pelos telócitos.

As células restantes foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido e foram posteriormente utilizadas para o processamento e execução do protocolo de citometria de fluxo, onde foram utilizados os mesmos anticorpos testados para a imunofluorescência das placas de cultivo.

Figura 21. Organização do protocolo de cultivo celular primário e identificação das células de interesse.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Imagens dos músculos coletados para o cultivo celular (B) separados por animal, e (C; D) identificação das células de interesse (seta) aderidas às placas de cultivo após 1 semana; (C; E) células de Schwann (cabeça de seta) e (D; F) telócitos (cabeça de seta) e imunomarcação com CD34+ das respectivas células proliferadas após 10 dias de cultivo. Barras: 200 µm.

4.11 CITOMETRIA DE FLUXO

A análise de citometria de fluxo foi realizada para quantificação das células de interesse referente aos anticorpos positivos e negativos de telócitos e células perissinápticas de Schwann. Para padronização dos anticorpos e melhor condensação das células de interesse foi utilizada a técnica de cultivo celular previamente a citometria.

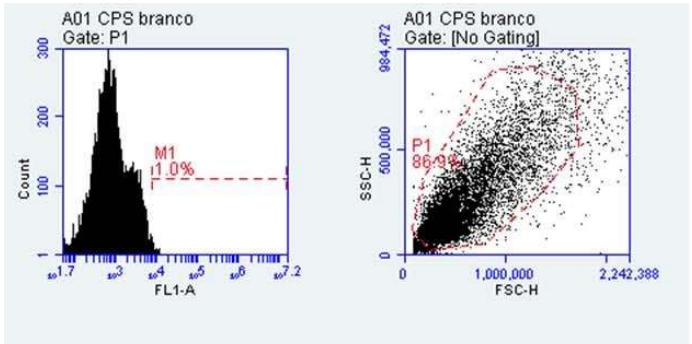
Foram realizados os testes dos anticorpos (S100, CD34 e CD31) para validação de sua positividade com as células de interesse isoladas (CPS) e do anticorpo secundário (Alexa Fluor™ 488) de forma isolada, para validação de sua marcação de acordo com o filtro disponível no equipamento utilizado (Figura 22).

Posteriormente, foram realizadas as quantificações das células de interesse, onde foram contadas por eppendorf, e estabelecidos os valores em microlitros. Todos os anticorpos apresentaram positividade (Figura 23).

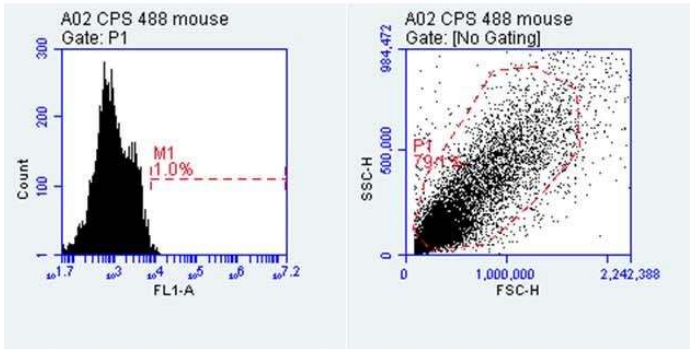
Além disso, 1 piloto, e 3 experimentos foram realizados com os grupos experimentais Controle e Lesão, para que fosse possível avaliar suas adaptações a partir da técnica, porém apenas o último experimento apresentou resultados positivos apenas no Grupo Controle, desta forma não foi possível correlacionar os grupos, porém foi possível estabelecer que as CPS cultivadas, apresentaram positividade para os anticorpos CD31 e CD34 mesmo que em baixas concentrações por amostra.

O presente resultado, contribui com o fato de que os telócitos diferente do idealizado para o presente estudo na verdade não são CPS, mas possivelmente coabitam e interagem com estes elementos celulares no músculo estriado esquelético.

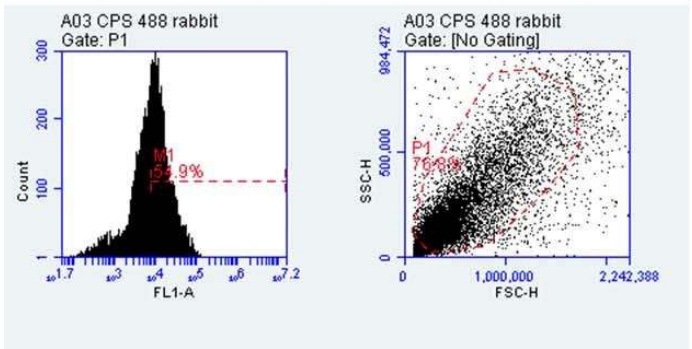
Figura 22. Gráficos e dados gerados para o teste amostral de citometria de fluxo.



Plot 2: A01 CPS branco: Gated on P1	Count	Events / µL	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	CV FL1-A	Median FL1-A
This Plot	8,691	724	100.00%	86.91%	1,277.28	518.14%	
M1 (7,410.0 / 16,777,215.0)	85	7	0.98%	0.85%	16,744.36	380.47%	



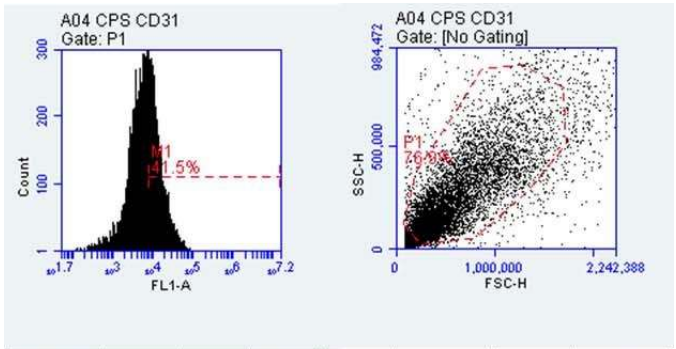
Plot 2: A02 CPS 488 mouse: Gated on P1	Count	Events / µL	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	CV FL1-A	Median FL1-A
This Plot	7,907	139	100.00%	79.07%	1,634.87	1,208.99%	
M1 (7,410.0 / 16,777,215.0)	82	1	1.04%	0.82%	31,722.70	602.85%	



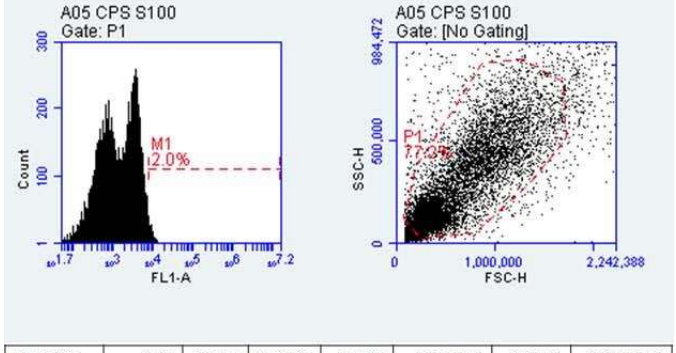
Plot 2: A03 CPS 488 rabbit: Gated on P1	Count	Events / µL	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	CV FL1-A	Median FL1-A
This Plot	7,677	256	100.00%	76.77%	17,840.30	1,342.42%	
M1 (7,410.0 / 16,777,215.0)	4,214	140	54.89%	42.14%	29,545.10	1,092.48%	

Fonte: Elaborado pelo autor. Organização dos dados de testes da amostra sem adição dos anticorpos e com os anticorpos secundários *anti-mouse* e *anti–rabbit* para avaliação da quantificação quanto a possível coloração inespecífica.

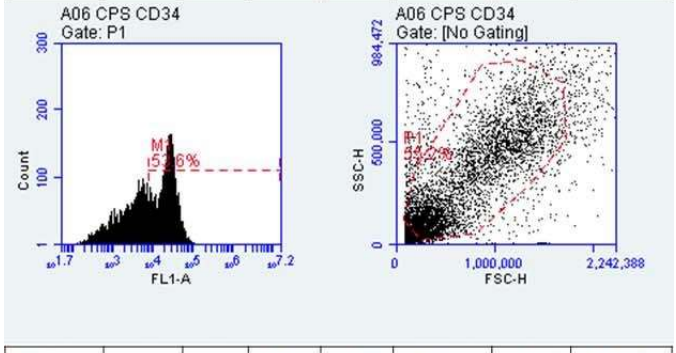
Figura 23. Dados de citometria de fluxo para positividade dos anticorpos.



Plot 2: A04 CPS CD31: Gated on P1	Count	Events / µL	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	CV FL1-A	Median FL1-A
This Plot	7,689	151	100.00%	76.89%	16,834.52	1,839.68%	
M1 (7,410.0 / 16,777,215.0)	3,190	63	41.49%	31.90%	35,134.00	1,366.82%	



Plot 2: A05 CPS S100: Gated on P1	Count	Events / µL	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	CV FL1-A	Median FL1-A
This Plot	7,724	266	100.00%	77.24%	2,006.95	103.48%	
M1 (7,410.0 / 16,777,215.0)	154	5	1.99%	1.54%	9,742.80	33.86%	



Plot 2: A06 CPS CD34: Gated on P1	Count	Events / µL	% of This Plot	% of All	Mean FL1-A	CV FL1-A	Median FL1-A
This Plot	4,691	21	100.00%	55.16%	40,188.41	1,408.49%	
M1 (7,410.0 / 16,777,215.0)	2,514	11	53.59%	29.56%	72,561.58	1,063.59%	

Fonte: Elaborado pelo autor. Organização dos dados para análise dos anticorpos específicos para contraprova (CD31), CPS (S100B) para quantificação das células de Schwann e dos telócitos (CD34).

4.12 PADRONIZAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

As amostras para a técnica de qPCR de todos os grupos experimentais foram devidamente coletadas, a região de interesse foi seccionada e o peso das amostras foi mensurado (Tabela 5), posteriormente foram armazenadas em eppendorfs de 2 mL e guardadas em freezer (-80°C), utilizados na etapa de extração de RNA.

Tabela 5. Valores em gramas dos músculos da região de interesse (ventre muscular).

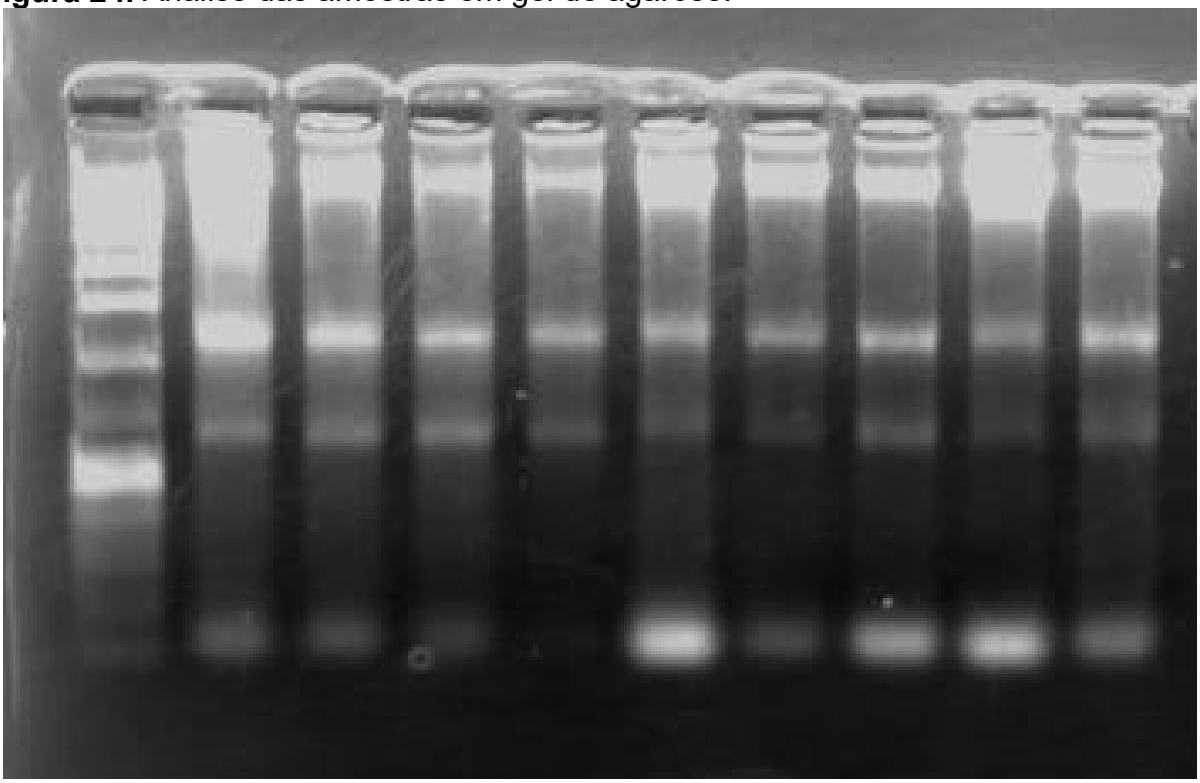
	Peso dos Músculos Seccionados					
Amostra	Controle	0h	24h	48h	4d	7d
1	0,184	0,241	0,342	0,360	0,22	0,237
2	0,238	0,239	0,343	0,476	0,278	0,183
3	0,320	0,283	0,349	0,422	0,332	0,483
4	0,287	0,189	0,463	0,425	0,239	0,399
5	0,193	0,245	0,382	0,359	0,350	0,29

Após a etapa de coleta, as amostras foram extraídas e processadas de acordo com o protocolo proposto, quantificadas (quantidade de RNA em ng/µL) individualmente (Tabela 6). A etapa de plaqueamento e obtenção da expressão gênica dos oligos de interesse foi finalizada no Laboratório de Imunometabolismo ICB I - USP.

Tabela 6. Valores referentes a quantificação de RNA (ng/µL) por amostra após a etapa de extração.

Controle				Lesão Muscular 0h				Lesão Muscular 24h				Lesão Muscular 48h				Lesão Muscular 7d				
	2	3			2	3			2	3			2	3			2	3		
C1 0h	0,01	0,019		LM1 0h	0,02	0,022		LM1 24h	0,039	0,039		LM1 48h	0,012	0,016		LM1.1 7d	0,027	0,03		260
	0,006	0,011			0,011	0,012			0,021	0,022			0,007	0,009			0,015	0,018		280
	1,737	1,757			1,796	1,817			1,822	1,786			1,839	1,736			1,793	1,673		260/280
	8,361	**15,052**	**16,5**		**16,385**	**17,38**	**14,5**		**31,081**	**31,185**	**8**		**9,628**	**12,557**	**20**		**21,959**	**23,784**	**10,5**	ng/µL
C2 0h	0,008	0,008		LM2 0h	0,016	0,017		LM2 24h	0,01	0,011		LM2 48h	0,014	0,016		LM2.1 7d	0,071	0,073		260
	0,004	0,003			0,009	0,009			0,005	0,007			0,008	0,009			0,041	0,041		280
	1,919	2,355			1,739	1,905			1,896	1,645			1,873	1,817			1,75	1,784		260/280
	6,075	**6,164**	**40,5**		**13,091**	**13,511**	**18,5**		**7,786**	**8,613**	**29**		**11,38**	**12,582**	**20**		**56,898**	**58,602**	**4,2**	ng/µL
C3 0h	0,013	0,015		LM3 0h	0,021	0,021		LM3 24h	0,028	0,027		LM3 48h	0,012	0,013		LM 7d 3.1	0,024	0,038		260
	0,007	0,008			0,011	0,011			0,016	0,015			0,006	0,007			0,012	0,02		280
	1,851	1,903			1,929	1,813			1,806	1,82			1,9	1,905			1,949	1,941		260/280
	10,715	**11,707**	**21,5**		**16,505**	**16,578**	**15**		**22,467**	**21,619**	**11,2**		**9,851**	**10,254**	**24,5**		**19,441**	**30,327**	**8,25**	ng/µL
C4 0h	0,021	0,023		LM4 0h	0,016	0,018		LM4 24h	0,045	0,064		LM4 48h	0,01	0,012		LM 7d 4.1	0,059	0,062		260
	0,012	0,014			0,008	0,01			0,025	0,036			0,005	0,007			0,033	0,032		280
	1,789	1,724			1,895	1,758			1,845	1,796			1,978	1,81			1,807	1,923		260/280
	16,934	**18,75**	**13,5**		**12,505**	**14,298**	**17,5**		**36,214**	**51,199**	**4,89**		**7,903**	**9,76**	**25,6**		**47,191**	**49,24**	**5**	ng/µL
C5 0h	0,018	0,017		LM 0h 5.1	0,039	0,034		LM5 24h	0,007	0,008		LM5. 1 48h	0,067	0,062		LM5.1 7d	0,015	0,016		260
	0,01	0,008			0,021	0,018			0,004	0,005			0,035	0,033			0,008	0,009		280
	1,763	2,013			1,877	1,86			1,829	1,733			1,916	1,905			1,844	1,747		260/280
	14,248	**13,448**	**17,5**		**31,316**	**27,021**	**7,9**		**5,56**	**6,681**	**37,4**		**53,606**	**49,764**	**4,66**		**12,337**	**12,42**	**20,2**	ng/µL

Figura 24. Análise das amostras em gel de agarose.



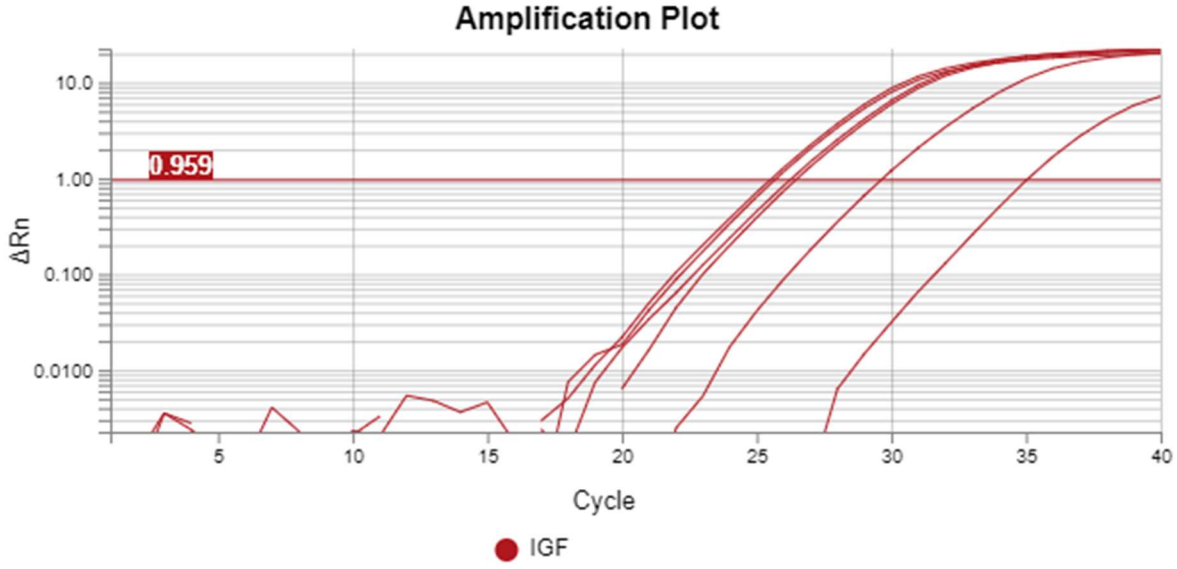
Fonte: Elaborado pelo autor. Demonstração da análise das amostras preliminares em gel de agarose previamente realizada, para posterior etapa de padronização dos primers de interesse e plaqueamento e análise da expressão gênica dos grupos experimentais.

4.13 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS DE INTERESSE

Os oligos foram padronizados de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo manual do kit GoTaq®1-Step RT-qPCR System (A6020 - Promega®), em conjunto com os parâmetros de temperatura de anelamento e condições individuais de cada primer, estabelecidos previamente a aquisição dos mesmos.

Para esta etapa os principais testes foram de diferentes diluições de oligos e de RNA, onde finalmente foi estabelecida a quantia de 10 uL da solução GoTaq® qPCR Master Mix 2x, 4 uL dos primers *Forward* e *Reverse* referente a cada oligo de interesse, 4 uL de RNA (com os valores de concentração das amostras entre 100 e 200 ng/uL) e 2 uL de água ultrapura presente no kit, desta forma, para cada poço foi utilizado um total de 20 uL de solução. Além disso, para os controles negativos foi adicionado 4 uL de água ultrapura no lugar do RNA.

Figura 25. Modelo de curva utilizado para padronização dos primers de interesse.



Fonte: Elaborado pelo autor. Foram organizadas duplicatas com diferentes volumes de RNA, no exemplo para o IGF foi selecionada a curva com 4 uL (representadas pelas duas curvas centrais). A curva de *melt* também foi analisada para dar continuidade ao processo de padronização.

4.13 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Foram realizadas as análises dos oligos referentes a GAPDH, β-actina, IGF, TGF-β, S100, NG2, NRG1, Agrin e AChR-α (Figura 26). Para os demais oligos propostos (CD34, PDGFR-α, MUSK, LrP4, GPr126), foram realizados os desenhos dos mesmos, a tentativa de padronização com as adaptações possíveis, inclusive na temperatura de anelamento (62 C° a 55 C°) e análise destes dados, porém após 3 tentativas, os mesmos não apresentaram curvas que puderam ser consideradas e analisadas.

Os oligos GAPDH e β-actina apresentaram valores de amplificação e foram utilizados como normalizadores para a obtenção e análise estatística dos dados de expressão gênica.

A expressão gênica do primer AChR-α, associado aos receptores de acetilcolina, apresentaram redução nos períodos de LM0h e LM24h, e retorno em LM48h, já no Grupo 7d os valores de média se apresentaram próximos aos do Grupo C.

Para a análise de NG2 foi constatado o aumento da expressão gênica em todos os períodos pós lesão, com aumento significativo no Grupo LM48h ($p<0.05$), este pode ser correlacionado com S100, por serem fatores expressados pelas CPS.

Para os valores de média da expressão gênica de IGF, o Grupo LM0h apresentou breve redução, já em LM24h houve aumento dos valores de média, porém não significativo, uma redução acentuada em LM48h e breve aumento, mas ainda menor que os valores do C no Grupo LM7d.

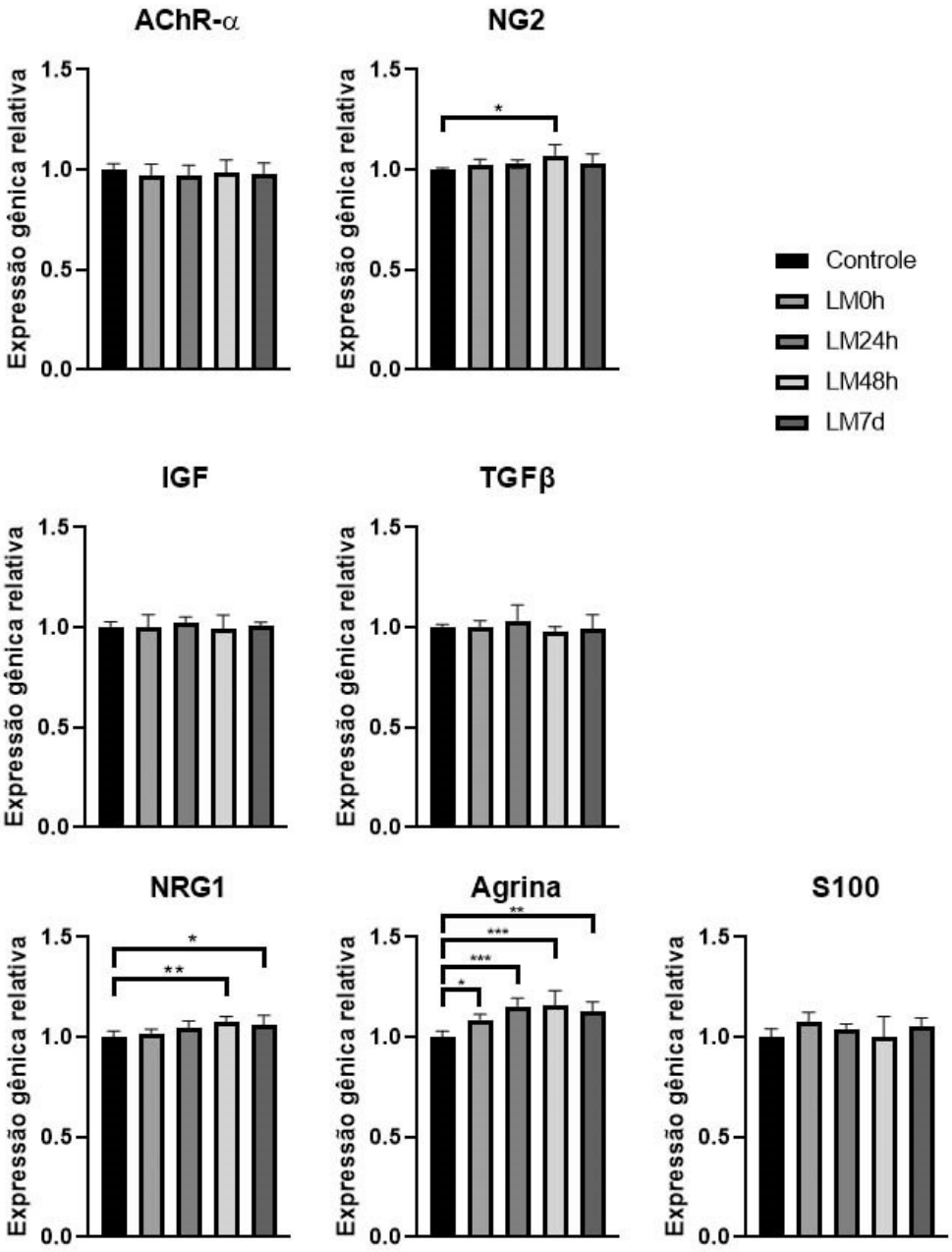
Para o primer de TGF-β, os grupos LM0h, LM48h e LM7d apresentaram redução da expressão gênica sem diferenças significativas, com destaque para a redução no grupo LM48h, já o Grupo LM24h foi o único dos períodos agudos que apresentou aumento.

Os valores de expressão gênica de NRG1, apresentaram valores com aumento progressivo entre os períodos pós lesão de LM0h a LM48h, e uma breve redução no Grupo LM7d, porém ainda superior ao Grupo C, com destaque para o aumento significativo em LM48h ($p<0.05$) e LM7d ($p<0.01$).

Os valores de média de expressão gênica de Agrina apresentaram aumento significativo e progressivo entre os períodos LM0h ($p<0.05$), LM24h ($p<0.001$) e LM48h ($p<0.001$), sendo estes dois últimos períodos os de maiores médias significativas, em LM7d ($p<0.01$) houve uma breve redução das médias, porém ainda superiores ao Grupo C.

Os valores de expressão gênica de S100, aumentaram no período LM0h, se mantiveram ainda maiores que o Grupo C no período de LM24h e após LM48h apresentaram redução, já em LM7d retornaram aos valores de média próximos de LM7d.

Figura 26. Dados de expressão gênica para os primers de interesse.



Fonte: Elaborado pelo autor. Gráfico dos valores obtidos para expressão gênica dos oligos de interesse (AChR-α, NG2, IGF, TGF-β, NRG1, Agrina e S100), dos grupos de lesão muscular. NG2 - C≠LM48h ($p<0.05$)*; NRG1 - C≠LM48h ($p<0.01$)* C≠LM48h ($p<0.05$)*; Agrina - C≠LM0h ($p<0.05$)*, C≠LM24h e C≠LM48h ($p<0.001$) ***, C≠LM7d ($p<0.01$)**. Para as variáveis de expressão gênica foi realizada a análise estatística ANOVA *One-way* com pós-teste de Tukey e nível de significância estabelecido em $p<0.05$.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelaram os efeitos agudos da lesão muscular em modelo experimental, ao apresentar sua repercussão qualitativa em relação a disposição dos núcleos celulares, formação de regiões fibróticas e consequentemente concentração nuclear regionalizada comprovada quantitativamente com análise da área destas variáveis. Além disso, foi possível observar a manutenção dos receptores pós-sinápticos e dos canais de cálcio com a rápida recuperação estrutural e a repercussão degenerativa dos receptores pós-sinápticos (AChR) que mesmo após 7 dias, não retornaram ao aspecto padrão. Quanto aos elementos celulares da junção neuromuscular, as CPS foram identificadas em todos os grupos experimentais em adaptação conforme observado nos receptores pós-sinápticos. De forma inédita foram identificados os telócitos, que conforme as análises de imunofluorescência, cultivo celular e citometria de fluxo foi possível verificar seus diferentes aspectos de distinção quanto às CPS, o que pode determinar sua relação com os kranócitos, e assim sua redefinição como 4° elemento da JNM. Por fim quanto à análise de expressão gênica, os resultados significativos demonstraram o aumento de NG2 (em 48h) e S100 (0h) relacionados as CPS e a redução da subunidade alfa dos receptores pós-sinápticos (AChR-α) em todos os períodos.

A massa corporal dos animais apresentou redução significativa no Grupo LM24h, este fato demonstra por consequência uma possível alteração de mobilidade diante da lesão em estágio agudo, em conjunto com os fatores inflamatórios e atróficos promovidos pelo processo como já determinado na literatura (GROGAN; HSU; SKELETAL TRAUMA RESEARCH CONSORTIUM, 2011). Os demais grupos mantiveram os valores de massa corporal progressivos frente, mesmo durante o processo regenerativo e devido a rápida atividade metabólica de desenvolvimento dos animais (BEHM, et al., 2016).

Em relação a massa do músculo gastrocnêmio, todos os grupos apresentaram aumento progressivo, possivelmente promovido pelo ganho de massa corporal padrão nos animais em conjunto com os efeitos resultantes do processo inflamatório apresentado também pelo aumento em 48h, mesmo não significativo, da expressão gênica de IGF e de TGF, provenientes do processo regenerativo decorrente durante os períodos pós lesão (ROMAN e MUÑOZ-CÁNOVES, 2022, MOISEEVA et al., 2023).

Nas análises de microscopia de luz foi possível evidenciar os efeitos pré e pós inflamatórios que acarretaram adaptações teciduais (tecido muscular e conjuntivo associado) e nucleares com aumento de regiões fibróticas e acúmulos nucleares regionalizados, tais alterações corroboram com as adaptações apresentadas em estudos com distrofia muscular (CURY et al., 2018), crio lesão semelhante ao protocolo realizado com maior grau de invasividade e analisado em diferentes períodos (HARDY et al., 2016), e tratamento com laser (GARCIA et al., 2017), que promoveram o processo lesivo e evidenciaram acúmulo de tecido conjuntivo associado em conjunto com a alta atividade celular promovida pelo processo degenerativo e regenerativo muscular através da formação do infiltrado celular.

Além da identificação das regiões de infiltrado celular e de fibrose tecidual, foi possível observar a relação entre IGF e TGF-β na análise de expressão gênica, estes fatores não apresentaram diferença estatística, entretanto podemos destacar o aumento de TGF-β no período de 24h, onde foram identificadas as primeiras regiões de formação de fibrose tecidual, associada a redução no período de 48h e 7d onde ocorreu a redução da expressão gênica e o desaparecimento destas regiões, o que corrobora com o papel deste fator de crescimento no processo inflamatório e na formação de fibrose tecidual com seu aumento e a redução associada ao início do processo regenerativo (BRZOSKA et al., 2011; MACDONALD;COHN, 2012) e redução das regiões de infiltrados celulares compostos por células imunes e células satélites que se diferenciaram no período de 24h e 48h para formação de novas fibras apresentada em 7d (CIEMERYCH et al., 2011; DELANEY et al., 2017).

Além das adaptações quanto ao processo inflamatório, foi possível observar o processo regenerativo das fibras musculares com núcleos centralizados nas fibras principalmente nos grupos 24h e 48h, e o aumento dos núcleos na região do ventre muscular, processo recorrente observado neste tipo de lesão decorrente da homeostasia músculo esquelética que promove sua adaptação e determina sua plasticidade com a migração das células satélites para formação de miotubos (COSTAMAGNA et al., 2015; YUNG e HU, 2018), apresentados por meio da quantificação da área em micrômetros e porcentagem destes elementos em modelo experimental de treinamento em escada vertical sem carga, com carga e com a associação destes treinamentos (PIMENTEL NETO et al., 2022).

Quanto à disposição do tecido conjuntivo associado, após 7 dias, este apresentou organização semelhante ao Grupo Controle, assim como seus valores mensurados de área e porcentagem tecidual, porém, é importante ressaltar que houve o aumento quantitativo principalmente 48h após lesão o que demonstra a rápida resposta tecidual local em conjunto com a ação e adaptação das células do tecido muscular para o processo regenerativo orquestrado (MANN et al., 2011) que em conjunto com as células satélites e demais células como macrófagos e fagócitos (TEDESCO et al., 2017, LORETI; SACCO, 2022), contribuíram para a rápida regeneração neste tipo de lesão em período agudo, semelhante ao processo evidenciado por contração excêntrica, um exemplo comum de lesão desportiva registrada e analisada na literatura (MACKEY; KJAER, 2017).

Deschenes et al. (2023) demonstraram nos músculos plantar, sóleo e extensor longo dos dedos em grupo Controle as mensurações isoladas das variáveis pré-sinápticas (Basson) e canais de cálcio (P/Q) e sua relação com uso de dupla marcação através da técnica de imunofluorescência, para apresentar sua relação e possibilidade de análise individual e conjunta, e determinar sua relevância quanto a adaptação pré-sináptica. Diante disso nosso estudo foi adaptado para demonstrar individualmente a repercussão destas estruturas frente ao processo de lesão muscular.

Em relação aos aspectos morfológicos e às variáveis dos receptores pré-sinápticos analisadas por meio das mensurações das imagens obtidas com a imunomarcação do anticorpo anti-Bassoon, pudemos observar o aumento no Grupo 0h da área dos receptores com redução nos períodos posteriores, até o retorno a conformação próxima ao Controle no grupo 7d o que pode determinar a rápida adaptação ao estímulo deletério, assim como a rápida manutenção desta região que contribui com o auxílio para abertura dos canais desta região como descrito por Block-Gallego et al. (2014), e associado aos canais de cálcio (P/Q) analisados e que também apresentaram rápida adaptação e alterações semelhantes, tais adaptações são relatadas por Deschenes et al. (2023) como necessárias devido a dependência destas consideradas zonas ativas para a liberação das vesículas (ACh) o que consequentemente promove o retorno da transmissão de impulsos nervosos padrão que caso não ocorra pode comprometer a funcionalidade tecidual.

Em relação ao perímetro encontramos uma distinção dentre estas estruturas que apresentaram redução em 0h e 24h, o rearranjo em 48h e a compactação em 7d, ou seja, a área destes receptores foi comprometida em período agudo, porém sua estrutura foi mantida frente ao acometimento, relacionado também aos dados obtidos em relação ao diâmetro e a dispersão da região analisada que se mantiveram sem diferenças significativas quanto às variáveis analisadas estatisticamente, distinto do encontrado em modelo experimental de treinamento em esteira motorizada, considerado treinamento de *endurance* (realizado em 10 semanas) em ratos idosos e jovens que apresentam aumento considerável desta variável (DESCHENES et al., 2016), e frente ao desuso em modelo de suspensão dos membros posteriores utilizado para conferir esta condição frente a atrofia muscular, onde esta variável praticamente se mantém mesmo frente às condições do protocolo nos músculos sóleo, plantar e extensor longo dos dedos (DESCHENES et al., 2018).

A redução desta zona ativa onde se localizam os receptores pré-sinápticos ocorre principalmente frente ao envelhecimento tal alteração no número de zonas ativas é precipitada pela degeneração seletiva das proteínas que compõem a zona ativa (NISHIMUNE et al., 2016; CHEN et al., 2012), como consequência do transporte axonal em degeneração (MILDE et al., 2015), desta forma a faixa etária do modelo experimental pode ter contribuído com a rápida regeneração assim como o fato da lesão ser diretamente aplicada ao tecido muscular.

Os canais de cálcio, apresentaram a redução tanto de sua área, perímetro e diâmetro mesmo que de forma sutil no período de 24h, porém, 48h após a lesão sua estrutura assim como sua área composta pelos receptores praticamente retorna a conformação padrão, o que demonstra sua alta capacidade de reorganização para manter não só a estrutura mas a funcionalidade destes canais que são de suma importância para as respostas frente aos estímulos que constantemente influenciam o sistema neuromuscular como descrito por Day et al. (1997) frente ao influxo e efluxo de cálcio para a transmissão de impulsos nervosos do terminal axonal para o sarcolema da fibra muscular.

Os canais de cálcio (P/Q), analisados neste estudo, atuam como canais de cálcio dependentes de alta voltagem e contribuem para a exocitose das vesículas de ACh nos terminais sinápticos (NIMMRICH; GROSS, 2012). Em nosso estudo a estrutura dos

canais manteve a dispersão estrutural frente a variável analisada semelhante ao decorrente com a dispersão dos receptores pré-sinápticos (BASSOON) o que mais uma vez demonstra sua relação estrutural, funcional e molecular como já descrito por Nishimune et al. (2012) e consequentemente sua dependência frente a região onde são encontrados (CHEN et al., 2011).

Os receptores pós-sinápticos (AChR) foram as estruturas mais comprometidas frente ao protocolo de lesão proposto devido a lesão direta na região do ventre muscular, onde estes estão localizados e consequentemente são os mais comprometidos como já evidenciado por YIN et al. (2019) e constatados morfoquantitativamente em nosso estudo.

Os receptores apresentaram redução progressiva de sua área até o período de 48h, e mesmo após 7d não retornaram aos padrões encontrados no Grupo Controle, devido ao extenso comprometimento estabelecido e mesmo frente ao processo regenerativo no tecido muscular que afeta diretamente a estrutura do sarcolema, como já apresentado na literatura em animais saudáveis comparados ao modelo de distrofia muscular e em modelo de distrofia muscular associados a lesão muscular que frente a degeneração progressiva apresentaram redução expressiva da estrutura da JNM frente ao acometimento do músculo analisado (PRATT et al., 2013; aPRATT et al., 2015).

Os resultados obtidos frente às variáveis mensuradas dos receptores AChR corroboram com o identificado quanto ao nível de expressão gênica de AChR-α, principal subunidade presente e integrante destes receptores (WITZMANN; SAKMANN, 1991), que se mantiveram reduzidas mesmo após 7d, e demonstra o amplo comprometimento não só morfológico mas a nível molecular desta região frente ao protocolo de lesão, que podem afetar a funcionalidade muscular (AWAD et al., 2001) devido ao comprometimento já constatado nas membranas presentes nesta região (PACINO et al., 1996; MOREIRA-PAIS et al., 2022).

Os receptores pós-sinápticos apresentam alta plasticidade frente a repercussão do tecido muscular analisado o que altera a recepção das vesículas de AChR, e que possibilitam a ação da contração muscular, já constatado em protocolo de treinamento de *endurance* em modelo experimental de ratos *Wistar* adultos e idosos, onde foram analisadas as alterações nos tipos de fibra muscular, nas ramificações dos nervos periféricos e nos receptores de acetilcolina dos músculos plantar e extensor longo dos

dedos, e que apresentaram aumentos significativos das variáveis analisadas em conjunto com a compactação das JNMs no músculo plantar e a manutenção dos receptores sem dados significativos para o músculo extensor longo dos dedos (DESCHENES et al., 2016), resultados diferentes dos observados em nosso protocolo de lesão muscular, onde obtivemos a redução das variáveis de interesse.

Em experimento realizado com protocolo de alongamento, treinamento resistido em escada vertical e com a associação destes protocolos nos músculos plantar e sóleo foram analisadas variáveis semelhantes ao do presente estudo, o alongamento promoveu aumento significativo apenas nas variáveis de perímetro e na contagem de clusters, variável não considerada no nosso estudo, já o treinamento resistido isolado promoveu o aumento significativo das variáveis dos receptores pós sinápticos apenas, enquanto os protocolos associados apresentaram aumento na área corada dos receptores e na compactação da JNM, todos no músculo plantar, por outro lado o músculo sóleo não apresentou adaptações significativas (JACOB et al., 2022), o que pode demonstrar a relação do músculo ativado ou repercutido pelo protocolo, como proposto em nosso estudo em lesão direta no músculo a ser analisado para destaque de suas alterações.

Por outro lado em modelo experimental realizado com treinamento resistido com carga, sem carga e associados em análise do músculo bíceps braquial de ratos *Wistar,* foram observadas o aumento da área de secção transversa das fibras Tipo I e Tipo IIx e a redução mesmo que não significativa das variáveis dos receptores pós sinápticos, com a redução significativa da dispersão desta estrutura, o que demonstra a compactação desta região frente ao protocolo e ao estímulo específico executado por este músculo do membro dianteiro dos animais (PIMENTEL NETO et al., 2021), em nosso estudo observamos apenas a redução das estruturas mas não a compactação destas analisadas com uso da variável de dispersão, o que representa os fatores prejudiciais e degenerativos da lesão.

Em protocolo de salto vertical em modelo experimental foi utilizado o músculo gastrocnêmio, como em nosso estudo, para análise das variáveis de interesse, frente ao treinamento ocorreu a redução de todas as variáveis analisadas (ROCHA-BRAGA et al., 2024), com destaque para a redução significativa da variável do perímetro total que demonstra a redução e compactação desta região, com a priorização da sinalização

nervosa para as fibras musculares requisitada frente ao modelo, semelhante ao decorrente em nosso protocolo, nos períodos 0h e 24h, onde a redução pode determinar o rearranjo para as fibras que permitem o movimento, mesmo que limitado, mas funcional para a deambulação do animal.

A organização e o rearranjo das estruturas pós-sinápticas ocorreram frente ao processo degenerativo e regenerativo com redução nos períodos mais agudos (0h a 24h) como já destacado e retorno após 7 dias, essa região tende a redução de suas variáveis frente a acometimentos lesivos a curto e longo período como já constatado em modelo experimental de imobilização associada a recuperação com implemento de protocolo de natação (ROCHA et al., 2020), onde o processo de imobilização promoveu amplo remodelamento das JNMs em conjunto com a redução da área de secção transversa das fibras musculares analisadas por tipo de fibra e retorno após o protocolo de recuperação feito em meio aquático.

Frente a identificação e descrição das CPS observamos a compactação destes elementos que acompanham a estrutura da junção neuromuscular, e devido a sua função, contribuem com a manutenção ao seguir as adaptações estruturais da placa motora devido ao seu acoplamento na região como observado por Ko; Robitaille (2015) e Alvarez-Suarez et al. (2020) em ampla revisão sobre estes elementos celulares que abordam sua função múltipla frente às repercussões e adaptações da junção neuromuscular, e consequentemente a sua importância quanto a localização nesta região.

O nível de agravamento da lesão proporcionada, considerada leve (CONTRERAS-MUÑOZ et al., 2015), não promoveu alterações morfológicas consideráveis nas CPS que diante de sua função na preservação da integridade e funcionalidade da JNM se mantiveram com pequenas alterações observadas, diferentes do comprometimento decorrente da lesão nervosa periférica onde está célula foi analisada por Kang et al. (2003) e Bosch-Queralt et al. (2023) frente a este acometimento e atuaram como elementos compactadores e de suporte e proteção da JNM, atuando de forma mais acentuada no processo regenerativo.

As únicas alterações observadas e caracterizadas em nosso estudo em relação as CPS e o processo de lesão foram a compactação destas células em conjunto com os receptores pós-sinápticos nos períodos de 0h e 24h, o que coincide com os fatores de

suporte e proteção que estes elementos propiciam na região da JNM descritos por GOULD et al. (2025) em recente revisão, onde é ressaltada a importância de sua função para a JNM e a necessidade das futuras análises quanto a esta célula.

Em relação a expressão gênica analisada das CPS, foram selecionadas os oligos S100 e NG2. A expressão gênica de NG2 apresentou aumento progressivo e significativo em 48h, ou seja, os genes destes elementos celulares aumentados determinam a ação protetiva das CPS quanto a redução da expressão de AChR-α, para proporcionar o suporte e auxiliar no processo de recuperação da estrutura da JNM, como já constatado em diferentes estudos relacionados a função destas células e sua atuação no remodelamento da JNM (SUGIURA; LIN, 2011).

Em nosso estudo, os telócitos foram encontrados de forma inédita adjacentes e coabitando as junções neuromusculares na região da matriz extracelular. Por meio da imunomarcação positiva com CD34, esta célula foi primeiramente descrita e caracterizada em outros tecidos e eram denominadas como células intersticiais de CAJAL, ou confundidas devido a sua similaridade morfológica e sua localização com os fibrócitos, fibroblastos e células epiteliais, porém foram renomeadas devido a característica de seus prolongamentos, e na época devido a suposição de que eram células de suporte (POPESCU et al., 2010), como observados no presente estudo adjacentes a JNM.

Os telócitos já foram associados e identificados a regiões, sistemas e tecidos similares ao tecido analisado em nosso estudo (músculo estriado esquelético) como músculo liso (LIANG et al., 2019), cardíaco (MARINI et al., 2018), língua de ratos (músculo estriado esquelético) (ROSA et al., 2019), junção miotendínea (PIMENTEL NETO, et al., 2020) associada ao sistema nervoso central (POPESCU et al., 2012) e aos nervos periféricos (DÍAZ-FLORES et al., 2013; ZHANG et al., 2023), porém nunca havia sido identificada e associada a JNM.

O fato de identificarmos estas células em todos os grupos experimentais, sugere o indício de uma conexão entre os telócitos e as CPS na JNM, que desta forma podem ser associadas a manutenção, funcionalidade e principalmente a manutenção frente às lesões que acometem direta e indiretamente esta região, devido a comunicação extracelular promovida pelo telócitos, sempre que encontrado em outros tecidos como determinado por ampla revisão sobre a heterogeneidade e sobre a funções desta célula

CRETOIU et al. (2017), consequentemente relacionados ao processo de regeneração muscular (POPESCU et al., 2010), a diferentes doenças (ZHENG et al., 2012) e a formação de nichos relacionados às células satélites (BOJIN et al., 2011).

Outra importante característica frente a descoberta realizada no presente estudo que pode determinar a relação e comunicação dos telócitos com as demais células adjacentes, se deve aos aspectos morfológicos destas, que apresentam projeções de intercomunicação celular e a liberação de vesículas extracelulares (FAUSSONE-PELLEGRINI; GHERCIANU, 2012; EDELSTEIN et al., 2016; CHAITOW, 2017) que consequentemente, pela associação com as CPS na região da JNM podem ser associadas e relacionadas a resposta sináptica, manutenção e regeneração desta (KO; ROBITAILLE, 2015; CARR et al., 2019, HASTINGS et al., 2020),

Os kranócitos que também coabitam esta região, primeiramente descrito e identificados por COURT et al. (2008), inclusive com o uso do anticorpo CD34 e com marcador específico (2166) não mais produzido, também citados como elementos da JNM por SUGIURA; LIN (2011) e LEPORE et al. (2019), foram esquecidos pelos demais autores e pesquisadores e desta forma minimamente descritos, tendo em vista o observado e identificado no presente estudo, a identificação dos telócitos nesta região dá-nos o indício de que na verdade estes são telócitos.

Na análise de cultivo celular foi possível produzir as células de Schwann e os telócitos separadamente e imuno marcá-los por meio do anticorpo padrão para telócitos CD34 atribuindo assim uma possível relação entre estas células, porém não foram identificados fatores morfológicos semelhantes. Em uma tentativa de evidenciar novos marcadores e o isolamento para as CPS foi realizado experimento semelhante que apresentou a expressão de S100β (marcador clássico) e NG2 como marcadores específicos das CPS (CASTRO et al., 2020).

As células cultivadas foram também utilizadas para a análise de citometria de fluxo, que possibilitaram o entendimento quanto a distinção entre estes elementos celulares, que corroboram com o encontrado nas imagens imunomarcadas. Estas células são então distintas, porém atuam em conjunto, e, desta forma podem contribuir com o fato de que os telócitos são na verdade as células de suporte das CPS, função semelhante à dos kranócitos identificadas por COURT et al. (2008) como 4° elemento da JNM é de suma importância para futuras análise quanto às alterações específicas e

gerais da JNM, além disso, que estas interagem diante das adaptações necessárias para a manutenção da JNM.

6. CONCLUSÃO

Concluímos que a lesão muscular acarretou adaptações morfológicas teciduais com a identificação das regiões inflamatórias com rearranjo nuclear e características fibróticas de acúmulo de tecido conjuntivo associado, e após 7 dias apresentaram aspecto praticamente recuperado.

Quanto às variáveis das diferentes regiões da junção neuromuscular analisadas, todas foram afetadas, porém a região pré-sináptica e os canais de cálcio apresentaram uma rápida recuperação estrutural, já a região pós-sináptica foi a que apresentou maiores alterações e não demonstrou total recuperação mesmo após 7 dias.

Foram identificados em todos os grupos experimentais as CPS, desta forma foi possível diferenciá-las de acordo com sua morfologia em relação aos telócitos na junção neuromuscular. Os telócitos foram de forma inédita identificados na região da junção neuromuscular e assim podem ser caracterizados como mais um elemento estrutural desta importante região microscópica e fundamentalmente funcional do aparelho locomotor.

A técnica de cultivo celular em conjunto com a técnica de citometria de fluxo contribuíram para a comprovação de que as CPS não são e não possuem relação celular com os telócitos e desta forma são células individualmente específicas encontradas no tecido muscular analisado.

Quanto aos genes analisados, a expressão gênica NG2 apresentou aumento no período 48h, o que apresenta a adaptação molecular deste gene associado às CPS frente ao protocolo, e demonstra sua atuação durante o processo regenerativo da JNM, assim como o aumento de NRG1 e Agrina associados a recuperação da região pós-sináptica.

Frente ao local onde os telócitos foram encontrados e devido ao fato de que os kranócitos, 4° elemento da JNM apresentado na literatura, puderam ser relacionados aos resultados obtidos neste estudo, o indício de que o 4º elemento da tríade são os telócitos, foi ressaltado em nosso estudo, pela comprovação da presença destes na região da JNM, desta forma, as análises quanto a este elemento terão em projetos já em andamento com a implementação da análise da microscopia eletrônica de transmissão que adicionará informações complementares a presente descoberta. E com projetos

futuros com novas perspectiva principalmente quanto aos seus aspectos funcionais e sua adaptação diante de estímulos como, exercício físico, imobilização e atrofia muscular, para melhor entendimento quanto a possíveis tratamentos e métodos preventivos de impactos a região da JNM.

REFERÊNCIAS

ALEKSANDROVYCH V, PASTERNAK A, BASTA P, SAJEWICZ M, WALOCHA JA, GIL K. Telocytes: facts, speculations and myths (Review article). **Folia Med Cracov**. 2017;57(1):5-22. PMID: 28608858.

ALHINDI, A., BOEHM, I., FORSYTHE, R.O., MILLER, J., SKIPWORTH, R.J.E, SIMPSON, H., JONES, R.A., GILLINGWATER, T.H. Terminal Schwann cells at the human neuromuscular junction. **Brain Communications**. v.3, p.1-12, 2021. 10.1093/braincomms/fcab081.alvarez.

ALLEN, R.E.; BOXHORN, L.K. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-b, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. **J. Cell. Physiol**. 138, 311–315,1989. DOI: 10.1002/jcp.1041380213.

ALVAREZ-SUAREZ, P., GAWOR, M., PRÓSZYŃSKI, T.J. Perisynaptic schwann cells – The multitasking cells at the developing neuromuscular junctions. **Seminars in Cellular and Developmental Biology**, v.104, p.31-38, 2020. DOI:10.1016/j.semcdb.2020.02.011.

ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R.P.; HAYDON, P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci**. 1999; 22:208–215. [PubMed: 10322493]

AULD, D.S.; ROBITAILLE, R. Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation, **Neuroscientist**. n.9 p.144–157, 2003. DOI: 10.1177/1073858403252229.

AWAD, S.S.; LIGHTOWLERS, R.N.; YOUNG, C.; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z.M.; LOMO, T; SLATER, C.R. Sodium channel mRNAs at the neuromuscular junction: distinct patterns of accumulation and effects of muscle activity. **J Neurosci**. 2001 Nov 1;21(21):8456-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-21-08456.2001. PMID: 11606634; PMCID: PMC6762790.

BEHM, D. G., BLAZEVICH, A. J., KAY, A. D., & MCHUGH, M. Acute effects of muscle stretching on physical performance, range of motion, and injury incidence in healthy active individuals: a systematic review. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, 41(1), 1–11, 2016. https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0235.

BHUTDA, S; SURVE, M.V.; ANIL, A.; KAMATH, K; SINGH, N; MODI, D; BANERJEE, A. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues, **Bio-protocol**, v.7, p.1-10, 2017. DOI: 10.21769/BioProtoc.2592.

BLOCH-GALLEGO E. Mechanisms controlling neuromuscular junction stability. **Cell Mol Life Sci**. 2015 Mar;72(6):1029-43. doi: 10.1007/s00018-014-1768-z. Epub 2014 Oct 31. PMID: 25359233; PMCID: PMC11113273.

BROOKS, J.H.M, FULLER, C.W., KEMP, S.P.T, REDDIN, D.B. Incidence, Risk, and Prevention of Hamstring Muscle Injuries in Professional Rugby Union. American Journal of **Sports and medicine**. 2006; v.34, p.1297–1306, 2006. DOI:10.1177/0363546505286022.

BRZOSKA, E., CIEMERYCH, M. A., PRZEWOZNIAK, M., ZIMOWSKA, M. Regulation of muscle stem cells activation: the role of growth factors and extracellular matrix. **Vitamins and hormones**, 87, 239–276, 2011. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386015-6.00031-7.

BOJIN, F.M., GAVRILIUC, O.I., CRISTEA, M.I., TANASIE, G., TATU, C.S., PANAITESCU, C. AND PAUNESCU, V. Telocytes within human skeletal muscle stem cell niche. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 15: 2269-2272, 2011. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01386.x.

BODINE-FOWLER S. Skeletal muscle regeneration after injury: an overview. **Journal of voice** official journal of the Voice Foundation, 8(1), 53–62, 1994. https://doi.org/10.1016/s0892-1997(05)80319-4

BORNEMANN, A., SCHMALBRUCH, H. Desmin and vimentin in regenerating muscles. **Muscle & Nerve**, v.15, p.14–20, 1992. DOI:10.1002/mus.880150104.

BOSCH-QUERALT, M., FLEDRICH, R., & STASSART, R. M. Schwann cell functions in peripheral nerve development and repair. **Neurobiology of disease**, 176, 105952, 2023. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105952.

BOSCO, C.; DÍAZ, E.; GUTIÉRREZ, R.; GONZÁLEZ, J.; PÉREZ, J. Ganglionar nervous cells and telocytes in the pancreas of Octodon degus Extra and intrapancreatic ganglionar cells and telocytes in the degus. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v.177, p.224–230, 2013. DOI:10.1016/j.autneu.2013.05.002.

CARR, M.J., TOMA, J.S, JOHNSTON, A.P.W., STEADMAN, P.E., YUZWA, S.A., MAHMUD, N., FRANKLAND, P.W., KAPLAN, D.R., MILLER, F.D. Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration, Cell **Stem Cell**, V.24, 2, P. 240-256.e9, ISSN 1934-5909, 2019.https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.10.024.

CARDIFF, R.D.; MILLER, C. H.; MUNN, R.J. Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.2014, p.655–658, 2014. DOI: 10.1101/pdb.prot073411.

CARLSON, B. M.; FAULKNER, J. A. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. **Medicine & Science in Sports & Exercise** 15(3):p 187-198, 1983.

CASTRO, R., TAETZSCH, T., VAUGHAN, S. K., GODBE, K., CHAPPELL, J., SETTLAGE, R. E., & VALDEZ, G. Specific labeling of synaptic schwann cells reveals unique cellular and molecular features. **eLife**, 9, e56935, 2020. https://doi.org/10.7554/eLife.56935.

CHAITOW, L. Telocytes: Connective tissue repair and communication cells, **Journal of Bodywork and Movement Therapies**, V. 21, 2, 2017, Pages 231-233, 2017, ISSN 1360-8592, https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2017.01.011.

CHEN, J.; BILLINGS, S.E.; NISHIMUNE, H. Calcium channels link the muscle-derived synapse organizer laminin β2 to Bassoon and CAST/Erc2 to organize presynaptic active zones. **J Neurosci**. 2011 Jan 12;31(2):512-25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3771-10.2011. PMID: 21228161; PMCID: PMC3723116.

CHEN, J.; MIZUSHIGE, T.; NISHIMUNE, H. Active zone density is conserved during synaptic growth but impaired in aged mice. **J Comp Neurol**. 2012 Feb 1;520(2):434-52. doi: 10.1002/cne.22764. PMID: 21935939; PMCID: PMC3731066.

CIEMERYCH, M. A., ARCHACKA, K., GRABOWSKA, I., & PRZEWOŹNIAK, M. Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. **Results and problems in cell differentiation**, 53, 473–527, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_20

CRETOIU, D.; RADU, B.M; BANCIU, A.; BANCIU, D.D.; CRETOIU, S.M. Telocytes heterogeneity: from cellular morphology to functional evidence. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.64, p.26-39, 2016. DOI:10.1016/j.semcdb.2016.08.023.

CRETOIU, D.; RADU, B.M.; BANCIU, A.; BANCIU, D.D.; CRETOIU, S. M. Telocytes heterogeneity: From cellular morphology to functional evidence, **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Volume 64, 2017, Pages 26-39,https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.023.

CONCEA, DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA – DBCA, **1ª edição**, 2024.

CONNOR, E. A, MCMAHAN, U. J. Cell accumulation in the junctional region of denervated muscle. **Journal of Cell Biology**. v.104, p.109–120, 1987. DOI: 10.1083/jcb.104.1.109.

CONNOR, E. Developmental regulation of interstitial cell density in bullfrog skeletal muscle. **Journal of Neurocytology**. v.26, p.23–32, 1997. DOI:10.1023/a:1018507324217.

CONTRERAS-MUÑOZ, P., FERNÁNDEZ-MARTÍN, A., TORRELLA, R., SERRES, X., DE LA VARGA, M., VISCOR, G., JÄRVINEN, T.A., MARTÍNEZ-IBÁÑEZ, V., PEIRÓ, J.L,.

RODAS, G., MAROTTA, M. A New Surgical Model of Skeletal Muscle Injuries in Rats Reproduces Human Sports Lesions. **International Journal of Sports and Medicine**. v.37, p.183-190, 2016. DOI:10.1055/s- 0035-1555933.

COURT, F. A., GILLINGWATER, T. H., MELROSE, S., SHERMAN, D. L., GREENSHIELDS, K. N., MORTON, A. J., HARRIS, J. B., WILLISON, H. J., & RIBCHESTER, R. R. Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. **Journal of Cell Science**, 121, p. 3901–3911, 2008. https://doi.org/10.1242/jcs.031047.

CURY, S.S.; FREIRE, P.P.; MARTINUCCI, B.; DOS SANTOS, V.C.; OLIVEIRA, G.; FERRETTI, R.; DAL-PAI-SILVA, M.; PACAGNELLI, F.L.; DELELLA, F.K.; CARVALHO, R.F. Fractal dimension analysis reveals skeletal muscle disorganization in mdx mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p.1-7, 2018.

DARABID, H; ARBOUR, D.; ROBITAILLE, R. Glial cells decipher synaptic competition at the mammalian neuromuscular junction, **Journal of Neuroscience**. n.33 p.1297–1313, 2013. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2935-12.2013.

DARABID, H., PEREZ-GONZALEZ, A.P., ROBITAILLE, R. Neuromuscular synaptogenesis: coordinating partners with multiple functions. **Nature Reviews Neuroscience**.v.15, p.703-18, 2014. DOI:10.1038/nrn3821.

DAY, N.C.; WOOD, S.J.; INCE, P.G.; VOLSEN, S.G.; SMITH, W.; SLATER, C.R.; SHAW, P.J. Differential localization of voltage-dependent calcium channel alpha1 subunits at the human and rat neuromuscular junction. **J Neurosci**. 1997 Aug 15;17(16):6226-35. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-16-06226.1997. PMID: 9236233; PMCID: PMC6568369.

DELANEY, K., KASPRZYCKA, P., CIEMERYCH, M. A., ZIMOWSKA, M. The role of TGF-β1 during skeletal muscle regeneration. **Cell Biology International**, 41(7), 706–715, 2017. https://doi.org/10.1002/cbin.10725.

DESCHENES, M.R., HURST, T.E., RAMSER, A.E., SHERMAN, E.G. Presynaptic to postsynaptic relationships of the neuromuscular junction are held constant across age and muscle fiber type. **Developmental Neurobiology**, v.73, p.744–753, 2013.

DESCHENES, M.R., SHERMAN, E.G., ROBY, M.A., GLASS, E.K., HARRIS, M.B. Effect of resistance training on neuromuscular junctions of Young and aged muscles featuring different recruitment patterns. **Journal of Neurosciences Research** v.93, p.504–513, 2015.

DESCHENES, M.R.; KRESSIN, K. A.; GARRATT, R. N.; LEATHRUM, C. M.; SHAFFREY, E. C. Effects of Exercise of Training on Neuromuscular Junction Morphology and Pre to Post-synaptic Coupling in Young and Aged Rats. **Physiology & Behavior**, v.316, p.167–177, 2016. DOI: j.neuroscience.2015.12.004.

DESCHENES, M.R.; ADAN, M.A.; KAPRAL, M.C.; KRESSIN, K.A.; LEATHRUM, C.M.; SEO, A.; LI, S.; SCHAFFREY, E.C. Neuromuscular adaptability of male and female rats to muscle unloading. **J Neurosci Res**. 2018 Feb;96(2):284-296. doi: 10.1002/jnr.24129. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28759131; PMCID: PMC5726924.

DESCHENES, M.R. Adaptations of the neuromuscular junction to exercise training. **Current Opinion in Psychology**, v.10, p.10–16, 2019. DOI:10.1016/j.cophys.2019.02.004.

DESCHENES, M.R.; TUFTS, H.L.; LI, S.; NORONHA, A.L.; ADAN, Matthew A. Effects of exercise training on neuromuscular junctions and their active zones in young and aged muscles. **Neurobiology of Aging**, v.95, p.1–8, 2020. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2020.07.001.

DESCHENES, M.R.; TREBELHORN, A.M.; HIGH, M. C.; TUFTS, H.L.; OH, J. Sensitivity of subcellular components of neuromuscular junctions to decreased neuromuscular activity. **Synapse**, p1-13, 2021. DOI:10.1002/syn.22220.

DESCHENES, M.R.; MIFSUD, M.K.; PATEK, L.G.; FLANNERY, R.E. Cellular and Subcellular Characteristics of Neuromuscular Junctions in Muscles with Disparate Duty Cycles and Myofiber Profiles. **Cells**. 2023 Jan 18;12(3):361. doi: 10.3390/cells12030361. PMID: 36766702; PMCID: PMC9913535.

DÍAZ-FLORES, L., GUTIÉRREZ, R., SÁEZ, F.J., DÍAZ-FLORES, L., JR. AND MADRID, J.F. Telocytes in neuromuscular spindles. **J. Cell. Mol. Med**., 17: 457-465, 2013. https://doi.org/10.1111/jcmm.12015.

DING, T., GE, S. Metabolic regulation of type 2 immune response during tissue repair and regeneration. **Journal of Leukocyte Biology**, 112(5), 1013–1023, 2022. https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0422-665R.

DOESSING, S., HOLM, L., HEINEMEIER, K. M., FELDT-RASMUSSEN, U., SCHJERLING, P., QVORTRUP, K., LARSEN, J. O., NIELSEN, R. H., FLYVBJERG, A., & KJAER, M. (2010). GH and IGF1 levels are positively associated with musculotendinous collagen expression: experiments in acromegalic and GH deficiency patients. **European journal of endocrinology**, 163(6), 853–862, 2010. https://doi.org/10.1530/EJE-10-0818.

EDELSTEIN, L. FUXE, K. LEVIN, M, POPESCU B.O., SMYTHIES, J. Telocytes in their context with other intercellular communication agents, **Seminars in Cell & Developmental Biology**, V. 55, P. 9-13, ISSN 1084-9521, 2016 https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.010.

FAUSSONE-PELLEGRINI; M.S.; POPESCU, L.M. Telocytes. **Biomolecular Concepts**. V.2, E.6, 2011.

FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S. GHERGHICEANU, M. Telocyte's contacts, Seminars in **Cell & Developmental Biology**, V. 55, P. 3-8, ISSN 1084-9521, 2016 https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.036.

FENG, L. T., CHEN, Z. N., BIAN, H. Skeletal muscle: molecular structure, myogenesis, biological functions, and diseases. *MedComm*, 5(7), e649, 2024. https://doi.org/10.1002/mco2.649

FUERTES-ALVAREZ, S., & IZETA, A. Terminal Schwann Cell Aging: Implications for Age-Associated Neuromuscular Dysfunction. **Aging and disease**, v.12(2), p.494–514, 2021. https://doi.org/10.14336/AD.2020.0708

GARCIA, T. A., CAMARGO, R. C. T., KOIKE, T. E., OZAKI, G. A. T., CASTOLDI, R. C., & CAMARGO FILHO, J. C. S. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. **Brazilian journal of physical therapy**, 21(6), 425–433, 2017. https://doi.org/10.1016/j.bjpt.2017.06.007.

GONZALEZ-FREIRE, M.; SEMBA, R.D.; UBAIDA-MOHEIN, C.; FABBRI, E.; SCALZO, P; HOJLUND, K.; DUFRESNE, C.; LYASHKOV, A.; FERRUCI, L. The Human skeletal muscle proteome project: a reappraisal of the current literature. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**. p.1-14, 2016.

GOULD, T.W.; KO, C.P.; WILLISON, H.; ROBITAILLE, R. Perisynaptic Schwann Cells: Guardians of Neuromuscular Junction Integrity and Function in Health and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2025 Jan 7;17(1):a041362. doi: 10.1101/cshperspect.a041362. PMID: 38858074; PMCID: PMC11694759.

GREFTE, S., KUIJPERS-JAGTMAN, A.M., TORENSMA, R., VON DEN HOFF, J.W. Model for muscle regeneration around fibrotic lesions in recurrent strain injuries. **Medicine & Science in Sports & Exercise**. v.42, p.813–819, 2009. DOI:10.1249/MSS.0b013e3181beeb52.

GROGAN, B. F., HSU, J. R., & SKELETAL TRAUMA RESEARCH CONSORTIUM. Volumetric muscle loss. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, 19 Suppl 1, S35–S37, 2011. https://doi.org/10.5435/00124635-201102001-00007.

HARDY, D., BESNARD, A., LATIL, M., JOUVION, G., BRIAND, D., THÉPENIER, C., PASCAL, Q., GUGUIN, A., GAYRAUD-MOREL, B., CAVAILLON, J. M., TAJBAKHSH, S., ROCHETEAU, P., & CHRÉTIEN, F. Comparative Study of Injury Models for Studying Muscle Regeneration in Mice. **PloS One**, 11(1), e0147198, 2016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147198.

HASTINGS, R.L., MIKESH, M., LEE, Y.I. et al. Morphological remodeling during recovery of the neuromuscular junction from terminal Schwann cell ablation in adult mice. **Scientific Reports** 10, 11132, 2020. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67630-1.

HSIEH, Y. T., CHEN, S. L. (2024). Visualization and Analysis of Neuromuscular Junctions Using Immunofluorescence. **Bio-protocol**, 14(19), e5076. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.5076.

JACOB, C.D.S.; BARBOSA, G.K.; RODRIGUES, M.P.; PIMENTEL NETO, J.; ROCHA, L.C.; CIENA, A.P. Stretching prior to resistance training promotes adaptations on the postsynaptic region in different myofiber types. **Eur J Histochem**. 2022 Feb 15;66(1):3356. doi: 10.4081/ejh.2022.3356. PMID: 35164481; PMCID: PMC8875788.

JÄRVINEN, T.A.H, JÄRVINEN, T.L.N, KÄÄRIÄINEN, M. Muscle injuries: optimising recovery, **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 21, p. 317-331, 2007. DOI:10.1016/j.berh.2006.12.004.

JONES, R.A.; REICH, C.D.; DISSANAYAKE, K.N.; et al. NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure - Function relationships at the neuromuscular junction. **Open Biology**. v.6, p.1-16, 2016. DOI: 10.1098/rsob.160240.

KAEFER, S. L., SHAY, E. O., MORRISON, R. A., ZHANG, L., VOYTIK-HARBIN, S., & HALUM, S. (2025). Neuromuscular junction visualization in paraffin-embedded thyroarytenoid muscle sections: Expanding options beyond frozen section analysis. **Laryngoscope investigative otolaryngology**, 10(1), e70020. https://doi.org/10.1002/lio2.70020.

KANG, H., TIAN, L., & THOMPSON, W. Terminal Schwann cells guide the reinnervation of muscle after nerve injury. **Journal of neurocytology**, 32(5-8), 975–985, 2003. https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000020636.27222.2d.

KO, C.P.; SUGIURA, Y.; FENG, Z. The biology of perisynaptic (terminal) Schwann cells. In: Armati, P., editor. The Biology of Schwann Cells. **Cambridge University Press**; New York: 2007. p. 72-99.

KO, C. P., & ROBITAILLE, R. Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 7(10), a020503, 2015. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020503.

KONDO, A., KAESTNER, K. H. Emerging diverse roles of telocytes. **Development**. v.146, p.2019. DOI:10.1242/dev.175018.

KRAUSE, W.N.; SILVA, W.; CIENA, A.P.; BOCALINI, D.; ANARUMA, C.; GAMA, E. 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, 2017a. DOI: 10.1016/j.exger.2017.08.018.

LEPORE, E.; CASOLA, I.; DOBROWOLNY, G.; MUSARÒ, A. Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. **Cells**. v.8, n.8, e.906, p1-15, 2019. https://doi.org/10.3390/cells8080906.

LI, Y., FOSTER, W., DEASY, B. M., CHAN, Y., PRISK, V., TANG, Y., CUMMINS, J., & HUARD, J. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **The American Journal of Pathology**, 164(3), 1007–1019, 2004. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63188-4.

LI, L., XIONG, W-C., ME, IL. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. **Annual Review of Physiology**. v.80, p.159-88, 2018.

LIANG, Y.; WANG, S.; AN, T.; TARIQUE, I.; VISTRO, W.A.; LIU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, H., SHI, Y.H.; HASEEB, A.; GANDAHI N.S.; IQBA, A.; YANG, H.; CHEN, Q.; YANG, P. Telocytes as a novel structural component in the muscle layers of the goat rumen. **Cell Transplant**. v.28, p.955–966, 2019. DOI:10.1177/0963689719842514.

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

LIU, Y.; LIANG, Y.; WANG, S.; TARIQUE, I.; VISTRO, W.A.; ZHANG, H.; HASEEB, A.; GANDAHI, N.S.; IQBAL, A.; AN, T.; YANG, H.; CHEN, Q.; YANG, P. Identification and characterization of telocytes in rat testis. **Aging**. v. 11, p. 5757-68, 2019. DOI:10.18632/aging.102158.

LUBISCHER, J. L., & THOMPSON, W. J. Neonatal partial denervation results in nodal but not terminal sprouting and a decrease in efficacy of remaining neuromuscular junctions in rat soleus muscle. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 19(20), 8931–8944, 1999. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-20-08931.1999.

MACDONALD, E. M., COHN, R. D. TGFβ signaling: its role in fibrosis formation and myopathies. **Current Opinion in Rheumatology**, 24(6), 628–634, 2012. https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328358df34.

MACKEY, A. L., KJAER, M. Connective tissue regeneration in skeletal muscle after eccentric contraction-induced injury. **Journal of Applied Physiology** (Bethesda, Md. : 1985), 122(3), 533–540, 2017. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00577.2016.

MANETTI, M., TANI, A., ROSA, I., CHELLINI, F., SQUECCO, R., IDRIZAJ, E., ORLANDINI, Z., MANNESCHI, L.I., SASSOLI, C. Morphological evidence for telocytes as stromal cells supporting satellite cell activation in eccentric contraction-induced skeletal muscle injury. **Scientific Reports**, v.10, p.1–14, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-51078-z.

aMARINI, M., MANETTI, M., ROSA, I., IBBA-MANNESCHI, L., SGAMBATI, E.Telocytes in human fetal skeletal muscle interstitium during early myogenesis. **Acta Histochemica**, v. 120, p.397-404, 2018. DOI:10.1016/j.acthis.2018.04.003.

bMARINI, M., ROSA, I., IBBA-MANNESCHI, L., MANETTI, M. Telocytes in skeletal, cardiac and smooth muscle interstitium: morphological and functional aspects. **Histology and Histopathology**, v.33, p.1151-1165, 2018. DOI: 10.14670/HH-11-994.

MINTY, G.; HOPPEN, A.; BOEHM. I. ANMJ-morph: A simple macro for rapid analysis of neuromuscular junction morphology. **Royal Society Open Science**, v.7, p.1-8 2020. DOI:10.1098/rsos.200128.

MILDE, S.; ADALBERT, R.; HANDAN ELAMAN, M.; COLEMAN, M.P. Axonal transport declines with age in two distinct phases separated by a period of relative stability, **Neurobiology of Aging**, Volume 36, Issue 2, 2015, Pages 971-981, ISSN 0197-4580, https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.018.

MOISEEVA, V., CISNEROS, A., SICA, V., DERYAGIN, O., LAI, Y., JUNG, S., ANDRÉS, E., AN, J., SEGALÉS, J., ORTET, L., LUKESOVA, V., VOLPE, G., BENGURIA, A., DOPAZO, A., BENITAH, S. A., URANO, Y., DEL SOL, A., ESTEBAN, M. A., OHKAWA, Y., SERRANO, A. L., MUÑOZ-CÁNOVES, P. Senescence atlas reveals an aged-like inflamed niche that blunts muscle regeneration. **Nature**, 613(7942), p.169–178, 2023. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05535-x

MOREIRA-PAIS, A.; FERREIRA, R.; OLIVEIRA, P.A.; DUARTE, J.A. A neuromuscular perspective of sarcopenia pathogenesis: deciphering the signaling pathways involved. **Geroscience**. 2022 Jun;44(3):1199-1213. doi: 10.1007/s11357-021-00510-2. Epub 2022 Jan 4. PMID: 34981273; PMCID: PMC9213593.

MURRAY, L.M., COMLEY, L.H., THOMSON, D., PARKINSON, N., TALBOT, K., GILLINGWATER, T.H. Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. **Human molecular genetics**; v.17, p.949-962, 2008. DOI:10.1093/hmg/ddm367.

NIMMRICH, V.; GROSS, G. P/Q-type calcium channel modulators. **Br J Pharmacol**. 2012 Oct;167(4):741-59. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02069.x. PMID: 22670568; PMCID: PMC3575775.

NISHIMUNE, H.; NUMATA, T.; CHEN, J.; AOKI, Y.; WANG, Y.; STARR, M.P.; MORI, Y.; STANFORD, J.A. Active zone protein Bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise. **PLoS One**. 2012;7(6):e38029. doi: 10.1371/journal.pone.0038029. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22701595; PMCID: PMC3368936.

NISHIMUNE, H.; BADAWI, Y.; MORI, S.; SHIGEMOTO, K. Dual-color STED microscopy reveals a sandwich structure of Bassoon and Piccolo in active zones of adult and aged mice. **Sci Rep**. 2016 Jun 20;6:27935. doi: 10.1038/srep27935. PMID: 27321892; PMCID: PMC4913281.

NISHIMUNE H., SHIGEMOTO, K. Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. **Neurologic clinics**, v.36, e.2, p.231–240. https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.01.009, 2018.

PASINO, E.; BUFFELLI, M.; ARANCIO, O.; BUSETTO, G.; SALVIATI, A.; CANGIANO, A. Effects of long-term conduction block on membrane properties of reinnervated and normally innervated rat skeletal muscle. **J Physiol**. 1996;497:457-72. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021780. PMID: 8961187; PMCID: PMC1160996.

PELOSI, L., GIACINTI, C., NARDIS, C., BORSELLINO, G., RIZZUTO, E., NICOLETTI, C., WANNENES, F., BATTISTINI, L., ROSENTHAL, N., MOLINARO, M., & MUSARÒ, A. Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines. **FASEB journa**l: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 21(7), 1393–1402m, 2007. https://doi.org/10.1096/fj.06-7690com.

PIMENTEL NETO, J.; ROCHA, L.C.; BARBOSA, G.K.; JACOB, C.S.; KRAUSE NETO, W.; WATANABE, I. S.; CIENA, A. P. Myotendinous junction adaptations to ladder - based resistance training: identification of a new telocyte niche. **Scientific Reports**, v. 10, n. 14124, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70971-6.

PIMENTEL NETO, J.; ROCHA, L.C.; BARBOSA, G.K.; JACOB, C.S.; CIENA, A.P. Postsynaptic cleft density changes with combined exercise protocols in an experimental model of muscular hypertrophy. **European Journal of Histochemistry**; v. 65, 3274, p.1-8, 2021. DOI: 10.4081/ejh.2021.3274.

PIZZA, F. X., BUCKLEY, K. H. Regenerating Myofibers after an Acute Muscle Injury: What Do We Really Know about Them?. **International Journal of Molecular Sciences**, 24(16), 12545, 2023. https://doi.org/10.3390/ijms241612545.

POLLOT, B.E.; CORONA, B.T. Volumetric Muscle Loss. **Methods Mol Biol.** 2016;1460:19-31. doi: 10.1007/978-1-4939-3810-0_2. PMID: 27492162.

POPESCU, L. M.; FAUSSONE-PELLEGRINI, M.S. TELOCYTES – a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 14, p. 729-740, 2010. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01059.x.

POPESCU, L.M., MANOLE, E., ŞERBOIU, C.S., MANOLE, C.G., SUCIU, L.C., GHERGHICEANU, M. e POPESCU, B.O. Identification of telocytes in skeletal muscle interstitium: implication for muscle regeneration. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 15: 1379-1392, 2010. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01330.x.

POPESCU, B.O, GHERGHICEANU, M., KOSTIN, S., CEAFALAN, L., L.M. POPESCU,L.M. Telocytes in meninges and choroid plexus, **Neuroscience Letters**, V. 516, 2, P.265-269, ISSN 0304-3940, 2012. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.04.006.

PRATT, S.J.P.; SHAH, S.B.; WARD, C.W.; INACIO, M.P.; STAINS, J.P.; LOVERING, R.M. Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. **J Physiol**. 2013 Jan 15;591(2):559-70. doi: 10.1113/jphysiol.2012.241679. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23109110; PMCID: PMC3577526.

aPRATT, S.J.P.; SHAH, S.B.; WARD, C.W.; KERR, J.P.; STAINS, J.P.; LOVERING, R.M. Recovery of altered neuromuscular junction morphology and muscle function in mdx mice after injury. **Cell Mol Life Sci**. 2015 Jan;72(1):153-64. doi: 10.1007/s00018-014-1663-7. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24947322; PMCID: PMC4282693.

bPRATT, S. J. P., VALENCIA, A. P., LE, G. K., SHAH, S. B., LOVERING, R. M. (2015). Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. **Frontiers in physiology**, 6, 252. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00252

ROCHA, L.C., JACOB, C.D.S., BARBOSA, G.K., PIMENTEL NETO, J., KRAUSE NETO, W., GAMA, E.F., CIENA, A.P. (2020). Remodeling of the skeletal muscle and postsynaptic component after short-term joint immobilization and aquatic training. **Histochemistry and cell biology**, 154(6), 621–628. https://doi.org/10.1007/s00418-020-01910-9.

ROCHA, L.C.; BARBOSA, G.K.; PIMENTEL NETO, J.; JACOB, C.D.S.; KNUDSEN, A.B.; WATANABE, I.-S.; CIENA, A.P. Aquatic Training after Joint Immobilization in Rats Promotes Adaptations in Myotendinous Junctions. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, p.6983-6994, 2021. DOI:10.3390/ijms22136983.

ROCHA, L.C.; GOMES, P.; PIMENTEL NETO, J.; JACOB, C.D.S.; TOMIATE, A.N.; CAMARGO, P.O.; da SILVA, J.R.R.; CIENA, A.P. The Impact of Vertical Jump Exercise in the Postsynaptic Cleft in Wistar Rats. **Muscle, Ligaments and Tendons**, Original Article, 396-401, doi: 10.32098/mltj.03.2024.02, 2024.

ROMAN, W., & MUÑOZ-CÁNOVES, P. Muscle is a stage, and cells and factors are merely players. **Trends in cell biology**, 32(10), 835–840, 2022. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.03.001.

ROSA, I. TAVERNA, C.; NOVELLI, L.; MARINI, M.; IBBA-MANNESCHI, L.; MANETTI, M.Telocytes constitute a widespread interstitial meshwork in the lamina propria and underlying striated muscle of human tongue. **Scientific Reports**, v.9, p.1-10, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-42415-3.

SHAVLAKADZE, T., CHAI, J., MALEY, K., COZENS, G., GROUNDS, G., WINN, N., ROSENTHAL, N., GROUNDS, M. D. A growth stimulus is needed for IGF-1 to induce skeletal muscle hypertrophy in vivo. **Journal of Cell Science**, 123(Pt 6), 960–971, 2010. https://doi.org/10.1242/jcs.061119.

SHEN, C., LU, Y., ZHANG, B., FIGUEIREDO, D., BEAN, J., JUNG, J., WU, H., BARIK, A., YIN, D.M., XIONG, W.C., MEI, L. Antibodies against low-density lipoprotein receptor-

related protein 4 induce myasthenia gravis. **Journal of Clinical Investigation**. v.123, p.5190-2502, 2013. DOI:10.1172/JCI66039.

SHIN, E.H.; CATERSON, E.J.; JACKSON, W.M.; NESTI, L.J. Quality of healing: defining, quantifying, and enhancing skeletal muscle healing. **Wound Repair Regen**. 2014 May;22 Suppl 1:18-24. doi: 10.1111/wrr.12163. PMID: 24813360.

SILVA, R.M.; RIBEIRO, E.A.; CANTO, A.L.; MORAES, L.H.F.; CANEVARI, R.A. Análise da expressão dos genes serpina1 e tff3 na predição do envolvimento de linfonodos em neoplasias mamárias. **Educação e Ciência para a Cidadania Global**. v.22, p.1-16, 2016. DOI:10.18066/revistaunivap.v22i40.1195.

SMITH, C.; KRUGER, M.J.; SMITH, R.M.; MYBURGH, K.H. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. **Sports Med**. 2008;38(11):947-69. doi: 10.2165/00007256-200838110-00005. PMID: 18937524.

STILHANO, R.S., SAMOTO, V.Y., SILVA, L.M., PEREIRA, G.J., ERUSTES, A.G., SMAILI, S.S., WON HAN, S. Reduction in skeletal muscle fibrosis of spontaneously hypertensive rats after laceration by microRNA targeting angiotensin II receptor. **PLoS One**. v.12, p.1-18; 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0186719.

SOUZA, J.D.; GOTTFRIED, C. Muscle injury: review of experimental models. **J Electromyogr Kinesiol**. 2013 Dec;23(6):1253-60. doi: 10.1016/j.jelekin.2013.07.009. Epub 2013 Aug 19. PMID: 24011855.

SUGIURA, Y.; LIN, W. Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function. **Biosciences Reports**. 2011; v. 31, e.5, p.295–302, 2011. DOI: 10.1042/BSR20100107.

TAETZSCH, T & VALDEZ, G. NMJ maintenance and repair in aging. **Current opinion in physiology**, 4, 57–64, 2018. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.05.007.

TEJERO, R., LOPEZ-MANZANEDA, M., ARUMUGAM, S., & TABARES, L. (2016). Synaptotagmin-2, and -1, linked to neurotransmission impairment and vulnerability in Spinal Muscular Atrophy. **Human molecular genetics**, 25(21), 4703–4716. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw297.

TSANG, Q.K.; GALLO, L.; ZHU, X.M.; LEVEILLE, C.F. Terminal Schwann cells: modulators of the neuromuscular junction and a potential target for nerve reinnervation. J Physiol. 2025 Mar 20. doi: 10.1113/JP288563. Epub ahead of print. PMID: 40112192.

TU, W.Y., XU. W., ZHANG, K., SHEN, C. Whole-mount staining of neuromuscular junctions in adult mouse diaphragms with a sandwich-like apparatus. Journal of **Neuroscience Methods**. v.350, p.1- 21, 2020. DOI:10.1016/j.jneumeth.2020.109016.

VANNUCCHI, M.G. The Telocytes: Ten Years after Their Introduction in the Scientific Literature. An Update on Their Morphology, Distribution, and Potential Roles in the Gut.

Int J Mol Sci. 2020 Jun 24;21(12):4478. doi: 10.3390/ijms21124478. PMID: 32599706; PMCID: PMC7352570.

VARGA, I.; POLÁK, Š.; KYSELOVIČ, J.; KACHLÍK, D.; DANIŠOVIČ, Ľ.; KLEIN, M. Recently Discovered Interstitial Cell Population of Telocytes: Distinguishing Facts from Fiction Regarding Their Role in the Pathogenesis of Diverse Diseases Called "Telocytopathies". **Medicina 2019**, 55, 56. https://doi.org/10.3390/medicina55020056

VERMA, S., KHURANA, S., VATS, A., SAHU, B., GANGULY, N. K., CHAKRABORTI, P., GOURIE-DEVI, M., TANEJA, V. Neuromuscular Junction Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Mol Neurobiol**, v.59, p.1502–1527, 2022. https://doi.org/10.1007/s12035-021-02658-6.

WITZEMANN, V.; BRENNER, H.R.; SAKMANN, B. Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses. **J Cell Biol.** 1991 Jul;114(1):125-41. doi: 10.1083/jcb.114.1.125. PMID: 1646821; PMCID: PMC2289058.

WÖRL, J.; MAYER, B.; NEUHUBER, W.L. Spatial relationships of enteric nerve fibers to vagal motor terminals and the sarcolemma in motor endplates of the rat esophagus: a confocal laser scanning and electron-microscopic study. **Cell Tissue Res**. 1997 Jan;287(1):113-8. doi: 10.1007/s004410050736. PMID: 9011386.

YIN, X.; YU, T.; CHEN, B.; XU, J.; CHEN, W.; QI, Y.; ZHANG, P.; LI, Y.; KOU, Y.; MA, Y.; HAN, N.; WAN, P.; LUO, Q.; ZHU, D.; JIANG, B. Spatial Distribution of Motor Endplates and its Adaptive Change in Skeletal Muscle. **Theranostics**. 2019 Jan 24;9(3):734-746. doi: 10.7150/thno.28729. PMID: 30809305; PMCID: PMC6376466.

ZELADA, D., BERMEDO-GARCÍA, F., COLLAO, N., HENRÍQUEZ, J.P. Motor function recovery: deciphering a regenerative niche at the neuromuscular synapse, **Biological Reviews**, v.96, p. 752-766. DOI:10.1111/brv.12675.

ZHENG, Y., BAI, C. AND WANG, X. Telocyte morphologies and potential roles in diseases. **J. Cell. Physiol**., 227: 2311-2317, 2012. https://doi.org/10.1002/jcp.23022.

ZHANG, X, LU, P, SHEN, X. Morphologies and potential roles of telocytes in nervous tissue. **Clin. Transl. Disc**. 2023; 3:e186. https://doi.org/10.1002/ctd2.186.

APÊNDICE 1

Documento de aprovação do Comitê de Ética e Uso de Animais – CEUA, IB UNESP Rio Claro – SP, decisão CEUA n° 07/2022.

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 07/2022

Instituição: **UNESP – IB – CRC**	Departamento: Educação Física
Data de Registro CEUA: 19.04.2022	

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Telócitos e células perisinápticas de Schwann; repercussão na junção neuromuscular em modelo experimental de lesão muscular**", protocolo nº 1037, sob a responsabilidade de Jurandyr Pimentel Neto (Pesquisador Responsável) e Adriano Polican Ciena (Orientador), que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto n 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 **49ª reunião ordinária**, realizada em **14.09.2022:**

(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: 01/08/2022 a 01/09/2025

Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: ratos heterogênicos *Wistar*

Número de animais: 80 Peso: 300 g Idade: 60 dias - Sexo: M

Origem dos animais (Informações sobre o fornecedor): Biotério Central da UNESP – Campus de Botucatu

Objetivo Acadêmico:	( ) TCC ( ) Mestrado (x) Doutorado ( ) Outros – (Iniciação Científica) ( ) Pós- Graduação

Rio Claro, 14/09//2022

Claudio José Von Zuben

Prof. Dr. Claudio Jose Von Zuben
Coordenador