

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Efeitos da obesidade na morfologia muscular e na junção neuromuscular dos
músculos tibial anterior, vasto lateral e medial de ratos**

Isabela Piazzi

SÃO CARLOS, SÃO PAULO.

Fevereiro, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**Efeitos da obesidade na morfologia muscular e na junção neuromuscular dos
músculos tibial anterior, vasto lateral e medial de ratos**

Isabela Piazzini

Material apresentado ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia. Área de concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Stela Márcia Mattiello

Co-Orientador: Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SÃO CARLOS, SÃO PAULO.

Fevereiro, 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Isabela Piazzini, realizada em 20/02/2020:

Profa. Dra. Stela Marcia Mattiello
UFSCar

Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot
USP

Profa. Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi
UFSCar

Resumo

A obesidade afeta diversos tecidos corporais, no entanto ainda não está claro se o sistema neuromuscular também pode sofrer alterações. O objetivo deste estudo foi analisar aspectos morfológicos das junções neuromusculares (JNM) e adaptações dos músculos vasto lateral (VL), vasto medial (VM) e tibial anterior (TA) e concentração de citocinas séricas em ratos Wistar, após um período de 28 semanas alimentados com dieta indutora de obesidade. Dois grupos de ratos machos com idade de 6 semanas foram analisados: DIO (dieta indutora de obesidade, n = 5) e controle (dieta padrão, n = 5). Após a eutanásia foram analisados no soro os níveis circulantes de IL-6, TNF- α , leptina e adiponectina. Os músculos VL, VM e TA foram removidos para análise de parâmetros morfométricos. Foram feitas medidas da área de seção transversal (CSA) da fibra muscular, quantificação da gordura e tecido conjuntivo intramuscular. Também foram realizadas medidas da área total, do perímetro e diâmetro máximo das JNMs dos músculos supracitados. Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e posteriormente foi feita comparação entre os grupos. Nos casos em que os pressupostos paramétricos foram atingidos ($p \geq 0,05$) foi utilizado o teste t de Student e quando não, o teste de Mann Whitney. Para análise da relação entre as citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e o índice de sarcopenia foi utilizado o coeficiente de Correlação de Spearman. O grupo DIO demonstrou aumentos nos níveis de leptina ($p=0,033$) e diminuição nos níveis de adiponectina ($p=0,002$). O músculo VM mostrou aumento na área, perímetro e diâmetro máximo da JNM, assim como aumento de gordura intramuscular ($p=0,001$) e tecido conjuntivo ($p=0,005$). Foi observada também redução na CSA da fibra muscular do VM, no grupo DIO ($p=0,021$). Podemos concluir que a obesidade, no modelo testado, promoveu, um remodelamento das JNMs dos músculos estudados, acompanhada por atrofia muscular, bem como aumento da gordura intramuscular e adipocinas circulantes, mostrando que a obesidade pode afetar a função do tecido muscular.

Palavras chave: sistema nervoso periférico, tecido adiposo, atrofia, músculo esquelético, citocinas, inflamação sistêmica.

Abstract

Obesity affects several body tissues, however it is not yet clear whether the neuromuscular system can also change. The objective of this study was to analyze morphological aspects of the neuromuscular junctions (NMJ) and adaptations of the vastus lateralis (VL), vastus medialis (VM) and anterior tibialis (TA) muscles and serum cytokine concentration in Wistar rats, after a period of 28 weeks fed an obesity-inducing diet. Two groups of male rats aged 6 weeks were analyzed: DIO (obesity-inducing diet, n = 5) and control (standard diet, n = 5). After euthanasia, circulating levels of IL-6, TNF- α , leptin and adiponectin were analyzed in the serum. The VL, VM and TA muscles were removed for analysis of morphometric parameters. Measurements were made of the cross-sectional area (CSA) of the muscle fiber, fat quantification and intramuscular connective tissue. Measurements of the total area, perimeter and maximum diameter of the NMBs of the aforementioned muscles were also performed. All data were assessed for normality using the Shapiro-Wilk test and later a comparison was made between groups. In cases where the parametric assumptions were reached ($p \geq 0.05$), Student's t test was used and when not, the Mann Whitney test. Spearman's correlation coefficient was used to analyze the relationship between pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) and the sarcopenia index. The DIO group demonstrated increases in leptin levels ($p = 0.033$) and decreases in adiponectin levels ($p = 0.002$). The VM muscle showed an increase in the area, perimeter and maximum diameter of the NMN, as well as an increase in intramuscular fat ($p = 0.001$) and connective tissue ($p = 0.005$). A reduction in the CSA of the muscle fiber of the VM was also observed in the DIO group ($p = 0.021$). We can conclude that obesity, in the tested model, promoted a remodeling of the NMBs of the studied muscles, accompanied by muscle atrophy, as well as increased intramuscular fat and circulating adipokines, showing that obesity can affect the function of muscle tissue.

Key-words: systemic inflammation, atrophy, peripheral nervous system, adipose tissue, muscle.

Dedicatória

Á minha mãe e meu pai, pois tudo o que sou ou pretendo ser devo a eles.

Agradecimento especial

À Deus.

Obrigada Senhor pelo teu amor para comigo.

Por todas as bênçãos a mim concedidas, sem merecimento.

Pela oportunidade de concluir esse trabalho.

Por todas as pessoas que o Senhor colocou em meu caminho. Sei que houve um propósito em cada uma.

Pelas lutas enfrentadas. Foram elas que me permitiram te conhecer e entender como é bom estar ao Seu lado.

Por tua graça e misericórdia que me permitiu receber a Jesus Cristo.

“Tu que habitas sob a proteção do Altíssimo, que moras à sombra do Onipotente, dize ao Senhor: Sois meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em quem eu confio.”
Salmo 90

Agradecimentos

À minha mãe,

Por ser minha luz! Por ser fonte de segurança e alegria, minha maior incentivadora e amiga! O meu eterno agradecimento por seu amor, dedicação e cuidado. Por ter me aconselhado a seguir pelo lindo caminho da fisioterapia!

Ao meu pai,

Por ter me ensinado a importância do empenho e da dedicação ao trabalho, você é o meu exemplo. Obrigada por sempre cuidar tão bem de mim. Por ter dedicado sua vida a nossa família!

Ao meu irmão,

Por tornar minha vida mais leve e divertida. Por ser exemplo de inteligência e esperança. Por sempre me encorajar e me fazer sentir segura!

Ao meu namorado,

Por todo amor e cuidado em todos os momentos nesses anos. Pela paciência nos meus piores momentos. Por nossa amizade e companheirismo. Por sempre me incentivar e acreditar em mim. Por tornar minha vida mais feliz a cada dia!

“Caiu a chuva, transbordaram os rios, sopraram os ventos e deram contra aquela casa, e ela não caiu, pois seus alicerces estavam sobre a rocha.” Matheus 7:27

Aos meus avós,

Pelo exemplo de honestidade, simplicidade e alegria! Por terem me ensinado o significado da fé. Saudades imensas, vocês estarão pra sempre em meu coração

Aos meus tios,

Por todos os conselhos, incentivo e apoio desde sempre. Vocês são minha inspiração,
obrigada!

A Profa. Stela Marcia Mattiello,

Por ter aberto as portas de seu laboratório e pela orientação. Pela paciência com minhas teimosias. Pela disponibilidade e compreensão. Por sempre nos fazer sentir seguros e protegidos!

Ao Prof. Thiago Luiz de Russo,

Por ter me apoiado nos momentos que mais precisei. Por todos os conselhos e por sempre ter acreditado em mim!

Ao Jonathan Emanuel Cunha,

Por sempre ter sido luz durante a execução desse trabalho e me colocar na direção correta!

A Paula Aiello Tomé de Souza Castro,

Pela dedicação a essa pesquisa! Sua paixão por essa área do conhecimento me inspirou!

A Cristina Arrais Lima,

Por sempre ensinar com tanta paciência e me fazer rir! Com certeza aprendi muito sobre a vida com você!

A Jéssica Bianca Aily,

Por nunca poupar esforços em ajudar. Por sempre estar presente, ser minha amiga e confidente. Por ter sido luz desde o início. Sua dedicação à pesquisa sempre me inspirou!

A Gláucia H. Gonçalves e Maria Gabriela Pedroso,

Como era bom ter vocês por perto! Vocês são exemplo. A alegria e bom humor de vocês sempre tornava tudo mais leve!

A Alyssa Conte e Ricardo M. Liberatori,

Pela companhia divertida no laboratório e por nunca medirem esforços em ajudar!

A Angélica V. Ferrari,

Por sempre estar ao meu lado, amiga querida! Com certeza você foi um anjinho enviado por Deus. Obrigada pela amizade, por me ouvir, pelos sábios conselhos e pela companhia divertida e alegre.

Às professoras Patricia Driusso e Ana Carolina S. Beleza,

Pela oportunidade de conhecer uma área linda da fisioterapia. Por sempre terem confiado e acreditado em mim. Vocês são exemplo de dedicação e amor a profissão!

As companheiras: Tereza Fattori, Iolanda, Fabiana e Andreia,

Por todo o apoio nesse período, amizade e conselhos. A companhia de vocês fez a diferença nessa jornada.

A todos os professores,

Hoje sou um pouquinho de cada um que passou pela minha vida. Vocês contribuíram para minha formação profissional e pessoal. O amor e dedicação de vocês pela profissão me inspiram. Levo cada um no coração!

À Universidade Federal de São Carlos,

Pelo universo de possibilidades a mim apresentado. Pela oportunidade de formação na graduação e pós-graduação em Fisioterapia. Com orgulho, posso dizer que é a melhor!

Aos membros da banca,

Por aceitarem o convite e por todas as contribuições que enriquecem o trabalho!

A CAPES,

Pelo apoio financeiro.

Lista de Figuras

Figura 1- Junção Neuromuscular	Erro! Indicador não definido.
Figura 2 - Massa Corporal e Gordura Corporal.....	33
Figura 3– Massa Muscular, Índice de Sarcopenia e Área de Secção Transversa da fibra Muscular	345
Figura 4- Tecido Conjuntivo e gordura intramuscular	36
Figura 5 – Morfologia da Junção Neuromuscular	38

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Citocinas e adipocinas séricas.	35
Tabela 2 - Massa muscular, índice de sarcopenia e área de secção transversa da fibra muscular	38
Tabela 3 - Relação entre o índice de sarcopenia e citocinas inflamatórias	Erro!

Indicador não definido.

SUMÁRIO

1. PREFÁCIO	16
2. CONTEXTUALIZAÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Obesidade e comprometimentos na integridade muscular	18
2.2. Características da Junção Neuromuscular	20
2.3. Plasticidade da Junção Neuromuscular	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
4. ESTUDO	28

Epígrafe

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

-Arthur Schopenhauer

1. PREFÁCIO

Essa dissertação está organizada da seguinte forma: uma breve contextualização do tema com a lacuna existente na literatura, uma revisão da literatura e um manuscrito. O estudo “Obesity induces neuromuscular junction remodelling in the vastus medialis, vastus lateralis and tibialis anterior muscles of rats” submetido a periódico da área, como determinado pelo regimento interno do programa para defesa de mestrado.

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

Essa dissertação foi desenvolvida com o propósito de avaliar características do sistema neuromuscular em um modelo de obesidade, visto que esse distúrbio atinge grande parte da população, sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública mundial. (ABESO, 2019).

As alterações metabólicas advindas da obesidade tem demonstrado comprometer a estrutura e função do tecido músculo esquelético. O músculo desempenha um importante papel no equilíbrio biomecânico durante o movimento, assim modificações em sua função predis põem a disfunções físicas e doenças, uma vez que se torna vulnerável em um estado inflamatório (COLLINS, 2018). As propriedades contráteis do músculo esquelético também tem se mostrado alteradas em modelos de obesidade. (TALLIS, et al., 2017) Estudos têm mostrado que a obesidade afeta a transmissão neuromuscular nos músculos lisos. (BHATTARAI, ET AL., 2016)

No entanto, há diversas lacunas no entendimento atual de como a obesidade pode afetar esse sistema, especialmente a Junção Neuromuscular (JNM). Permanece incerto na literatura se os distúrbios metabólicos presentes na obesidade modificam o sistema neuromuscular do músculo esquelético. Para a fisioterapia, investigar tais aspectos é importante no sentido de direcionar e auxiliar no desenvolvimento de tratamentos que contribuam para prevenir as consequências funcionais decorrentes da obesidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Obesidade e comprometimentos na integridade muscular

A obesidade pode ser definida como uma doença crônica não transmissível caracterizada pelo excesso de gordura corporal, que causa prejuízos à saúde do indivíduo (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004). É identificada através do índice de massa corporal (IMC). Esse índice é calculado através do peso em quilogramas dividido pela altura em metros quadrados. Um IMC de 25,0 a 29,9 kg / m² em adultos é definido como sobrepeso e um IMC de 30 kg / m² ou superior é definido como obeso. (APOVIAN, 2016)

Essa doença foi apontada como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde. Estima-se que, em 2025, mais de 700 milhões de adultos estejam obesos. No Brasil, a obesidade aumenta progressivamente, sendo que no último levantamento oficial feito pelo IBGE entre 2008/2009 a obesidade atingia mais de 50% da população adulta (ABESO, 2019).

Tal condição tem sido caracterizada como um estado inflamatório sistêmico crônico de baixo grau. As alterações metabólicas advindas desse processo afetam a integridade e função de tecidos como o musculoesquelético. Um tecido plástico como o músculo, passa constantemente por remodelamentos e se torna vulnerável em um estado inflamatório (GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; TIDBALL, J.G. 2005).

As alterações na integridade do músculo envolvem a atrofia muscular, aumento de lipídios intramusculares e deposição de tecido conjuntivo (LEE et al., 2012). Esses prejuízos predisõem a disfunções físicas como osteoporose, tendinopatias e osteoartrite, condições que contribuem para a perda de funcionalidade e afastamento do trabalho (COLLINS et al., 2018).

O acúmulo de lipídios em sistemas como o músculo esquelético é conhecido como acúmulo ectópico de lipídios. Esse processo demonstrou estar associado ao aumento de ácidos graxos na circulação sanguínea (UNGER ET AL., 2010 VAN HERPEN E SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008; GOODPASTER ET AL., 2000; SINHA ET AL., 2002; BONEN ET AL., 2004). O tecido adiposo intermuscular se encontra localizado entre as fibras musculares e tem sido relacionado à redução do desempenho muscular. O tecido adiposo intramuscular se encontra localizado no

interior das fibras musculares, em gotículas lipídicas (COLLINS, 2017; FUJIMOTO et al., 2008; THIELE e SPANDL, 2008).

A inflamação do tecido adiposo está associada ao acúmulo de macrófagos do tipo pró-inflamatório e hipertrofia de adipócitos. Esses armazenam e secretam adipocinas como leptina, adiponectina, Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (WU & PAE, 2007). Há evidências de que a inflamação derivada dos adipócitos contribui para a atrofia das células musculares em modelos de obesidade (PELLEGRINELLI et al., 2015).

No processo de atrofia muscular o sistema proteolítico é ativado, proteínas e organelas contráteis são removidas, promovendo a diminuição das fibras musculares. O Sistema Ubiquitina Proteossoma é principal via da atrofia muscular e envolve genes como o *Muscle RING Finger-1* (MuRF1) e Atrogina-1. Esse sistema é regulado por uma complexa rede de vias de sinalização, sendo as principais: IGF-1-Akt-FoxO, miostatina, glicocorticoides e Nuclear Factor Kappa B (NFkB) (BONALDO & SANDRI, 2013).

Em resposta a fatores inflamatórios, a principal via ativada é a NFkB mediante a sinalização de citocinas como TNF- e IL-1 β , através da regulação do MuRF1 (PETERSON; BAKKAR; GUTTRIDGE, 2011). Além disso, o TNF- α demonstrou ter efeitos inibitórios sobre a via IGF-1 (P13K Akt mTOR), resultando na inibição do crescimento muscular (AKHMEDOV E BERDEAUX, 2013; BROWN et al., 2015).

As propriedades contráteis do músculo esquelético também tem se mostrado alteradas em modelos de obesidade (TALLIS, et al., 2017). No estudo de Lee, et al., 2015, camundongos C57BL/6 alimentados com dieta rica em gordura, indutora da obesidade, demonstraram menor força de prensão (-15%) e de coordenação sensorio motora (-11%) comparado ao grupo controle. Considerando as alterações na função muscular é esperado que outras estruturas musculares possam estar alteradas na obesidade.

A Junção Neuromuscular (JNM) é uma estrutura fundamental para a função muscular (NUDELL; GRINNELL, 1983). Há evidências de que a transmissão neuromuscular nos músculos lisos é afetada em modelos de obesidade. No estudo de

Bhattarai, et al., 2016 a obesidade, induzida por dieta hiperlipídica, promoveu alterações na transmissão neuromuscular do cólon distal de camundongos.

2.2. Características da Junção Neuromuscular

A contração do músculo esquelético é regulada pelo sistema nervoso central, por meio de uma sinapse química altamente especializada, denominada Junção Neuromuscular (TINTIGNAC; BRENNER; RÜEGG; 2015). Trata-se de uma sinapse responsável por transmitir impulsos elétricos do terminal nervoso ao músculo esquelético através de um neurotransmissor químico, a acetilcolina (ACh) (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006).

Estruturalmente, a JNM possui três componentes principais: a região pré-sináptica composta pelo terminal nervoso e a célula de Schwann; a região pós-sináptica formada pelo sarcolema e o sarcoplasma da fibra muscular e o espaço sináptico situado entre as regiões pré e pós-sináptica que é preenchido pela lâmina basal sináptica (Figura 1) (ENGEL, 2003). Na região pré-sináptica, o neurônio motor perde sua bainha de mielina ao atingir a fibra muscular alvo e se ramifica em um complexo de 100-200 terminações nervosas ou botões sinápticos (OMAR, 2019). Cada botão sináptico contém neurofilamentos, microtúbulos, retículos endoplasmático liso, variável número de mitocôndrias e vesículas sinápticas (ENGEL, 2003).

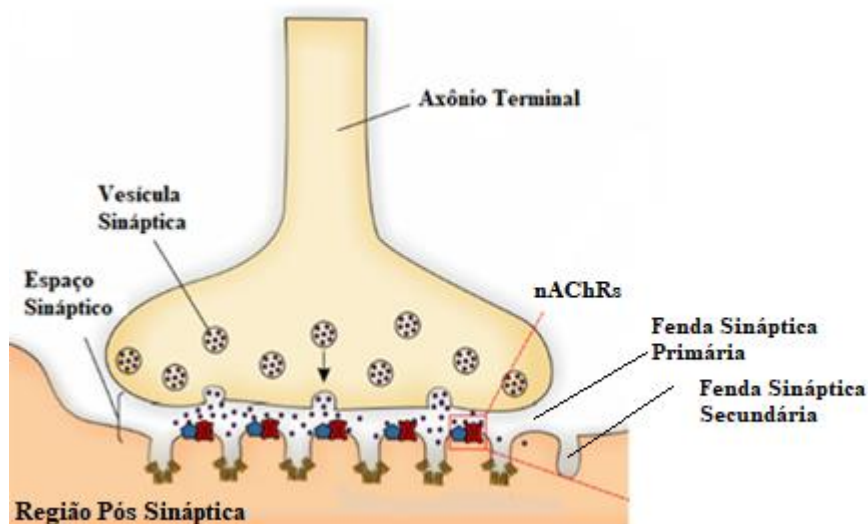


Figura 1. Junção Neuromuscular. Porção terminal do axônio motor formando a região pré-sináptica, onde estão contidas as vesículas sinápticas que armazenam o neurotransmissor químico, a acetilcolina (ACh). A região pós-sináptica é formada pelo

sarcolema e sarcoplasma da fibra muscular, onde estão concentrados os receptores da ACh, os nAChRs. Adaptado de Campanari, et al., (2016).

As vesículas sinápticas apresentam em média 50 a 60nm de diâmetro e armazenam o neurotransmissor ACh, além de ATP e proteoglicanas (Figura 1) (ENGEL, 2003). Essas vesículas se concentram na região da membrana do terminal nervoso, voltadas para as fibras musculares, num local chamado zona ativa (SANNES & LICHTMAN, 1999). Nesse local ocorre a fusão da vesícula sináptica com a membrana da região pré-sináptica permitindo a liberação de ACh no espaço sináptico (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006).

O espaço sináptico se localiza entre as membranas pré e pós-sinápticas e tem aproximadamente 50nm de largura. Esse espaço é preenchido com a lâmina basal sináptica e se encontra dividido em duas fendas sinápticas (ENGEL, 2003 & PLOMP, 2018). A fenda sináptica primária é limitada de um lado pela membrana da terminação nervosa e do outro pelas projeções das dobras juncionais. A fenda sináptica secundária encontra-se entre as projeções das dobras juncionais e esta em contato com a fenda primária (Figura 1) (ENGEL, 2003).

O interior do espaço sináptico é preenchido pela lâmina basal sináptica essa contém importantes proteínas da estrutura e função da sinapse, como colágeno IV (cadeias $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\alpha 5$), laminina-4, laminina-9 e laminina-11 e acetilcolinesterase (AChE) (PLOMP, 2018; RUFF, 2003). As lamininas desempenham um importante papel na organização e manutenção da zona ativa da região pré-sináptica (ROGERS & NISHIMUNE, 2017). Elas formam uma rede ancorando outras proteínas do espaço sináptico, como agrina, perlecan e entactina (RUFF, 2003). Os diferentes tipos de colágeno são importantes no desenvolvimento e estabilidade da JNM (SINGHAL, 2011). A AChE é uma enzima chave na fenda sináptica, sendo responsável por catalisar a hidrólise da ACh em ácido acético e colina, encerrando assim o efeito do neurotransmissor sobre os receptores pós-sinápticos (ARAÚJO, 2016).

A região pós-sináptica é formada pelo sarcolema da fibra muscular e pelo sarcoplasma juncional. Nesse estão contidas organelas que fornecem suporte estrutural e metabólico para essa região, como mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e rugoso, Complexo de Golgi, lisossomos, microtúbulos, grânulos de glicogênio e núcleos sinápticos. As funções metabólicas do sarcoplasma incluem síntese e degradação de

receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) e de AChE (ENGEL, 2003; HALL; SANES 1993).

O sarcolema se apresenta em pregas formando depressões na fibra muscular. Essas pregas são denominadas dobras juncionais. No ápice dessas, estão aglomerados os nAChRs em uma densidade de aproximadamente 15.000 a 20.000 receptores/ μm^2 , além de proteínas como a α -distrobrevina-1, rapsina e utrofina. Na base das dobras juncionais estão concentrados os canais de sódio (Na^+) sensíveis à tensão, anquirina e moléculas de adesão neuronal (N-CAM) (RUFF, 2003; FLUCHER & DANIELS, 1989; COVAULT & SANES, 1986).

Os nAChRs são formados por cinco subunidades proteicas que formam um poro aquoso central. Esses receptores são considerados ionotrópicos, ou seja, canais iônicos dependentes de ligantes. Quando uma molécula de ACh se liga aos mesmos, eles adquirem a forma de canal aberto, se tornando permeáveis aos íons Na^+ e potássio (K^+). (COX, 2008) Os nAChRs da fibra muscular embrionária ou desnervada são formados pelas subunidades $\alpha 1(2)$, $\beta 1$, δ e γ (γ -nAChR) e na fibra muscular madura inervada, são formados pelas subunidades $\alpha 1(2)$, $\beta 1$, δ e ϵ (ϵ -nAChR). Cada subunidade é constituída de um componente extracelular N-terminal hidrofílico e quatro componentes que abrangem a membrana plasmática, designados α -hélice (M1 a M4) hidrofóbicos, sendo que o M2 limita a região do poro (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006).

A transmissão sináptica tem início com a chegada do impulso nervoso no terminal do axônio. Os canais de Na^+ se abrem despolarizando a membrana terminal e causando a abertura dos canais voltagem-dependentes de cálcio (Ca^{+2}). O influxo de Ca^{+2} na célula ativa as proteínas SNAREs (sinaptobrevina, SNAP-25 e syntaxina) promovendo a fusão das vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica (SEAGAR et al., 1999). As moléculas de ACh difundem-se através do espaço sináptico e se ligam aos nAChRs na membrana pós-sináptica, permitindo a entrada de Na^+ e Ca^{+2} e saída de K^+ . Esse processo promove “resumidas” despolarizações da membrana pós-sináptica que irão estimular a abertura dos canais de Na^+ presentes na base das dobras juncionais, promovendo um potencial de ação das fibras musculares. Esse se propaga ao longo da fibra muscular, atingindo os Túbulos-T e desencadeia a liberação do Ca^{+2} presente no retículo sarcoplasmático ativando o mecanismo de contração da fibra muscular, de forma uniforme (PLOMP, 2018).

2.3. Plasticidade da Junção Neuromuscular

Após o desenvolvimento pós-natal, a JNM alcança o aspecto de sinapse madura, com a conformação semelhante a um “pretzel”. Essa esta constantemente em processo de remodelamento, passando por alterações morfológicas e funcionais no decorrer da vida (SIECK, 1997). Trata-se de uma reforma estrutural suave, porém constante, conferindo a sinapse um estado de “equilíbrio dinâmico” entre fases de expansão e regressão, brotamento e retração (WILSON & DESCHENES, 2005).

Esse equilíbrio dinâmico pode ser modificado por diversos fatores como crescimento, senescência e mudanças nos padrões de atividade muscular (desuso, treinamento físico, desnervação e lesão medular) (SIECK, 1997). Além de patologias genéticas, como a Síndrome Miastênica Congênita e de origem adquirida (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006).

Durante o processo de envelhecimento há atrofia e diminuição da função muscular, acompanhado de degeneração de neurônios motores e alterações nas características morfológicas e funcionais das JNMs. Essas alterações variam de acordo com o tipo de fibra e o nível de atividade muscular (JANG & VAN REMMEN, 2011; NARICI & MAFFULLI, 2010). Os axônios se tornam mais delgados, há maior número de vesículas e pregas sinápticas, bem como aumento da área total, perímetro e comprimento dos terminais nervosos (FAHIM, 1993). Além disso, a densidade dos receptores de nAChR é reduzida em camundongos idosos (<2 anos de idade) (VALDEZ, et al 2010).

As fibras musculares passam por processos de desnervação e reinervação durante o envelhecimento (JANG & VAN REMMEN, 2011). No processo de desnervação há maior expressão de proteínas e sinais quimiotáticos por parte dos neurônios motores residuais, promovendo o surgimento de novos dendritos, levando a expansão das unidades motoras pré-existentes, com o objetivo de retornar a função das fibras musculares (GONZALEZ-FREIRE, et al., 2014). No entanto, permanece incerto na literatura se os prejuízos musculares promovem as alterações nas JNMs ou se resultam delas (LI; XIONG; MEI, 2018).

A obesidade tem demonstrado afetar o músculo esquelético de diversas formas. No entanto faltam evidências na literatura se o sistema neuromuscular também é afetado

nessa condição. Especialmente a JNM, uma importante estrutura de comunicação entre o sistema nervoso periférico e o músculo esquelético, fundamental para a função muscular.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APOVIAN, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*, 22 (7 Suppl), s176-85, 2016.
2. ARAÚJO, Cleônia Roberta Melo; SANTOS, VL dos A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.
3. BHATTARAI, Yogesh et al. High-fat diet-induced obesity alters nitric oxide-mediated neuromuscular transmission and smooth muscle excitability in the mouse distal colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 311, n. 2, p. G210-G220, 2016.
4. BONALDO P.; SANDRI M., Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms*. v. 6, p. 25-39, 2013.
5. BONILLA, et al. Single pellet retrieval task performance is associated to neuromuscular junction adaptations in rats with type 1 Diabetes Mellitus. Dados não publicados.
6. COVAULT, Jonathan; SANES, Joshua R. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, v. 102, n. 3, p. 716-730, 1986.
7. COX, Brandon C. et al. Transport of multiple nicotinic acetylcholine receptors in the rat optic nerve: high densities of receptors containing $\alpha 6$ and $\beta 3$ subunits. *Journal of neurochemistry*, v. 105, n. 5, p. 1924-1938, 2008.
8. ENGEL, A .G. The neuromuscular junction. In: ENGEL, A. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. *Myology – basic and clinical*. 3.ed. New York: International Edition, 2003. p. 325-372. Vol.1.
9. HUGHES, Benjamin W.; DE CASILLAS, Maria Luisa Moro; KAMINSKI, Henry J. Pathophysiology of myasthenia gravis. In: *Seminars in neurology*. Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., 2004. p. 21-30.
10. HUGHES, Benjamin W.; KUSNER, Linda L.; KAMINSKI, Henry J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, v. 33, n. 4, p. 445-461, 2006.

11. JANG, Youngmok C.; VAN REMMEN, Holly. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Experimental gerontology*, v. 46, n. 2-3, p. 193-198, 2011.
12. LAND, Bruce R.; SALPETER, Edwin E.; SALPETER, Miriam M. Kinetic parameters for acetylcholine interaction in intact neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, n. 11, p. 7200-7204, 1981.
13. LI, Lei; XIONG, Wen-Cheng; MEI, Lin. Neuromuscular junction formation, aging, and disorders. *Annual review of physiology*, v. 80, p. 159-188, 2018.
14. LEE, Sang-Rok et al. Effects of chronic high-fat feeding on skeletal muscle mass and function in middle-aged mice. *Aging clinical and experimental research*, v. 27, n. 4, p. 403-411, 2015.
15. LEHRER, B. G. M. & Ornstein, L. A Diazo Coupling Method for the Electron Microscopic Localization of Cholinesterase. *Cell*, v. 6, p. 399-406, 1959.
1. NARICI, Marco V.; MAFFULLI, Nicola. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *British medical bulletin*, v. 95, n. 1, p. 139-159, 2010.
2. NUDELL, B. M.; GRINNELL, A D. Regulation of synaptic position, size, and strength in anuran skeletal muscle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 3, n. 1, p. 161-176, 1983.
3. TINTIGNAC, Lionel A.; BRENNER, Hans-Rudolf; RÜEGG, Markus A. Mechanisms regulating neuromuscular junction development and function and causes of muscle wasting. *Physiological reviews*, v. 95, n. 3, p. 809-852, 2015.
4. PETERSON, Jennifer M.; BAKKAR, Nadine; GUTTRIDGE, Denis C. NF- κ B signaling in skeletal muscle health and disease. In: *Current topics in developmental biology*. Academic Press, 2011. p. 85-119.
5. PINHEIRO, Anelise Rízzolo de Oliveira; FREITAS, Sérgio Fernando Torres de; CORSO, Arlete Catarina Tittoni. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, p. 523-533, 2004.
6. PLOMP, Jaap J. Neuromuscular junction physiology and pathophysiology. In: *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Humana Press, Cham, 2018. p. 1-12.

7. OMAR A, MARWAHA K, BOLLU PC. Physiology, Neuromuscular Junction. [Updated 2019 Aug 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470413/>
8. ROGERS, Robert S.; NISHIMUNE, Hiroshi. The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. *Matrix Biology*, v. 57, p. 86-105, 2017.
9. RUFF, ROBERT L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 998, n. 1, p. 1-10, 2003.
10. SANES, Joshua R.; LICHTMAN, Jeff W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual review of neuroscience*, v. 22, n. 1, p. 389-442, 1999.
11. SIECK, Gary C.; PRAKASH, Y. S. Morphological adaptations of neuromuscular junctions depend on fiber type. *Canadian Journal of Applied Physiology*, v. 22, n. 3, p. 197-230, 1997.
12. SINGHAL N, Martin PT. Role of extracellular matrix proteins and their receptors in the development of the vertebrate neuromuscular junction. *Dev Neurobiol*. 2011;71:982–1005.
13. VENTURA, Ana LM et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação ea relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Archives of Clinical Psychiatry*, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010.
14. WILSON, Meredith H.; DESCHENES, Michael R. The neuromuscular junction: anatomical features and adaptations to various forms of increased, or decreased neuromuscular activity. *International journal of neuroscience*, v. 115, n. 6, p. 803-828, 2005.
15. Wu D, Ren Z, Pae M, et al. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. *J Immunol*. 2007;179:4829-4839.

4. ESTUDO

A obesidade induz o remodelamento da junção neuromuscular no músculo vasto medial, vasto lateral e tibial anterior de ratos

Isabela Piazzzi, Paula Aiello Tome de Souza Castro; Cristina Arrais lima; Jonathan Emanuel Cunha; Jéssica Bianca Aily; Cynthia Aparecida de Castro; Thiago Luiz de Russo; Stela Marcia Mattiello.

Palavras chave: sistema nervoso periférico; tecido adiposo; atrofia; músculo esquelético; citocinas; inflamação sistêmica.

Resumo

A obesidade afeta diversos tecidos corporais, no entanto ainda não está claro se o sistema neuromuscular também pode sofrer alterações. O objetivo deste estudo foi analisar aspectos morfológicos das junções neuromusculares (JNM) e adaptações dos músculos vasto lateral (VL), vasto medial (VM) e tibial anterior (TA) e concentração de citocinas séricas em ratos Wistar, após um período de 28 semanas alimentados com dieta indutora de obesidade. Dois grupos de ratos machos com idade de 6 semanas foram analisados: DIO (dieta indutora de obesidade, n = 5) e controle (dieta padrão, n = 5). Após a eutanásia foram analisados no soro os níveis circulantes de IL-6, TNF- α , leptina e adiponectina. Os músculos VL, VM e TA foram removidos para análise de parâmetros morfométricos. Foram feitas medidas da área de seção transversal (CSA) da fibra muscular, quantificação da gordura e tecido conjuntivo intramuscular. Também foram realizadas medidas da área total, do perímetro e diâmetro máximo das JNMs dos músculos supracitados. Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e posteriormente foi feita comparação entre os grupos. Nos casos em que os pressupostos paramétricos foram atingidos ($p \geq 0,05$) foi utilizado o teste t de Student e quando não, o teste de Mann Whitney. Para análise da relação entre as citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e o índice de sarcopenia foi utilizado o coeficiente de Correlação de Spearman. O grupo DIO demonstrou aumentos nos níveis de leptina ($p=0,033$) e diminuição nos níveis de adiponectina ($p=0,002$). O músculo VM mostrou aumento na área, perímetro e diâmetro máximo da JNM, assim como aumento

de gordura intramuscular ($p=0,001$) e tecido conjuntivo ($p=0,005$). Foi observada também redução na CSA da fibra muscular do VM, no grupo DIO ($p=0,021$). Podemos concluir que a obesidade, no modelo testado, promoveu um remodelamento das JNMs dos músculos estudados, acompanhada por atrofia muscular, bem como aumento da gordura intramuscular e adipocinas circulantes, mostrando que a obesidade pode afetar a função do tecido muscular.

Introdução

A obesidade pode ser definida como uma doença crônica não transmissível caracterizada pelo excesso de gordura corporal, que causa prejuízos à saúde do indivíduo (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004). A obesidade tem sido caracterizada como um estado inflamatório sistêmico crônico de baixo grau, com leve aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF-alfa (GREGOR & HOTMISLIGIL, 2011). Os comprometimentos metabólicos causados pela obesidade afetam diferentes sistemas corporais, entre eles o musculoesquelético, um tecido que sofre constantemente remodelamento e que se torna suscetível frente a um estado inflamatório como a obesidade (COLLINS et al., 2018; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2011; TIDBALL, J.G. 2005).

Os prejuízos musculares decorrentes da obesidade incluem isquemia tecidual, infiltração de macrófagos, diminuição de células satélites, depósito de lipídios intramusculares, e atrofia muscular (LEE et al., 2012; ZHANG et al., 2013; BROWN et al., 2015; MENG, et al., 2015, D'SOUZA, et al., 2015). Essas alterações musculares aumentam o risco de doenças musculoesqueléticas, como a obesidade sarcopênica, osteoporose, tendinopatia e osteoartrite, condições que contribuem para incapacidade e afastamento do trabalho (COLLINS et al., 2018).

Estudos têm demonstrado que as propriedades contráteis do músculo esquelético são alteradas em modelos de obesidade (TALLIS, et al., 2017). Os mecanismos envolvidos nesse processo são semelhantes aos que ocorrem durante o envelhecimento e inclui interrupção da sinalização de cálcio, diminuição da massa contrátil, alterações no tipo de fibra muscular, acúmulo de lipídios e inflamação sistêmica (TALLIS; JAMES; SEEBACHER; 2018; AKHMEDOV & BERDEAUX, 2013). Durante o processo de envelhecimento também tem sido descritas alterações na junção neuromuscular (JNM), como a quantidade de liberação de neurotransmissores nas sinapses e alterações

morfológicas, como aumento do número de pregas e vesículas sinápticas (JANG & VAN REMMEN, 2011).

A obesidade é uma doença crônica sistêmica e que afeta diferentes tecidos do corpo entre eles os sistema musculoesquelético, no entanto faltam evidências se o sistema neuromuscular também pode ser comprometido pela mesma. Assim, o objetivo desse estudo foi analisar adaptações do sistema neuromuscular, sob aspectos morfológicos da JNM e conteúdo de tecido adiposo muscular, bem como a relação com citocinas circulantes.

A hipótese do estudo foi que a obesidade altera a morfologia das JNMs dos músculos do membro inferior de ratos e promove atrofia muscular, podendo estar relacionada com a circulação de citocinas inflamatórias, decorrentes da obesidade.

Métodos

Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) (Nº 6435181218) e seguiram as diretrizes contidas no The ARRIVE guidelines.

Dez ratos machos, Wistar, com idade inicial de 5-6 semanas, foram alocados em gaiolas plásticas (dois animais por gaiola) a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e luz artificial (12h claro/12h escuro), com acesso livre à alimentação e água tratada. Para definir o tamanho da amostra, foram utilizados os dados do estudo de Bonilla, et al., 2018 (dados não publicados). Assim, através do programa G*POWER 3.1.9.2, Alemanha, obteve-se que para atingir um poder de 95%, com tamanho do efeito da amostra de 2,56 e nível de significância de 5%, a amostra deveria ser de 10 animais, divididos igualmente entre os dois grupos, ou seja, 5 animais por grupo. Os animais foram randomizados entre os grupos: DIO (dieta indutora da obesidade) e controle (dieta padrão), ambos por 28 semanas. O período de 28 semanas tem sido descrito como o período necessário para a indução da obesidade de forma crônica em ratos. (COLLINS, 2017)

Para a dieta padrão foi utilizada a ração da marca PRIMOR® (São Paulo, Brasil), composta por 23g de proteína; 49g de carboidrato; 4g de gordura; 5g de fibra; 7g de cinza; e 6g de vitaminas, em cada 100g. A dieta indutora da obesidade foi composta por 20g de proteína, 20g de gordura, 48g de carboidratos e 4g de fibras. A

densidade calórica das dietas foi determinada através do calorímetro adiabático (IKA-C400) sendo de 5,12 Kcal/g para a dieta hiperlipídica e 4,07 Kcal para a dieta padrão. (SENE-FIORESE, et al., 2008).

Coleta de amostras e experimentos

A massa corporal de cada animal foi registrada semanalmente por meio de pesagem em balança digital. Para análise de composição corporal os animais foram anestesiados com Cetamin® e Xilazin® (*Syntec*), de forma intraperitoneal (12mg/kg e 95mg/kg). Para coleta do material biológico foi realizada a eutanásia dos animais com overdose de Barbitúrico, também de forma intraperitoneal (95mg/kg). O sangue de cada animal foi coletado e armazenado em tubos com sistema a vácuo (*Labor Import, China*). Após um período de 30 minutos, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm (*Sorval ST 8, Thermo Scientific*) e armazenados em -80° até o momento da análise.

Composição Corporal

A porcentagem de gordura corporal foi mensurada utilizando a Absorciometria de Raios-X de Dupla Energia e analisada com Software para análise de pequenos animais (*DXA, Hologic Discovery A, Bedford, MA*). As análises foram realizadas após o período 28 semanas do início do consumo da dieta.

Medidas de citocinas e adipocinas

Os níveis de citocinas e adipocinas foram quantificados através do método *Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), em amostras de soro homogeneizadas. Foram analisados os níveis de adiponectina (*Rat ADP/Acrp30, Elabscience, USA*), leptina (*Rat Leptin, AE335754RA, Abebio, China*), IL-6 (BD OptEIA (BD Biosciences) e TNF- α (BD OptEIA (BD Biosciences)). Todas as análises seguiram as recomendações dos fabricantes.

Histologia

Coleta de amostras musculares

Após a eutanásia, os músculos vasto lateral (VL), vasto medial (VM) e tibial anterior (TA) das patas traseiras direita e esquerda foram isolados, removidos e pesados. Os músculos retirados da pata esquerda foram fixados em solução *Karnovsky* e utilizados na técnica de esterase inespecífica (LEHRER; ORNSTEIN, 1959). Os músculos retirados da pata direita foram imediatamente envoltos em talco, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°.

Preparação de lâminas

Os músculos colhidos da pata direita foram utilizados para mensurar a área da fibra muscular, quantificar a gordura intramuscular e a porcentagem de tecido conjuntivo. Foram realizados cortes histológicos desses músculos, de forma seriada em um micrótomo criostato (*Leica, CM1860, Alemanha*), na espessura de 10 µm para a confecção de lâminas.

Área de secção transversa da fibra muscular

As lâminas foram coradas com Tricômico de Masson (*Êxodo Científica, Brasil*) e capturadas imagens através de um microscópio de luz (*Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha*). A área da fibra muscular de cada músculo foi obtida medindo 100 fibras localizadas na região central de cada imagem, utilizando o software *Image J, versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA* e normalizada pelo valor do peso muscular (CUNHA, et al., 2019).

Quantificação do tecido conjuntivo

Foram utilizadas as imagens coradas com Tricômico de Masson (*Êxodo Científica, Brasil*) e analisadas por meio do software *Image J, versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA*. Foram aplicadas sobre as imagens capturadas, em aumento de 20X, uma grade contendo linhas verticais e horizontais (13 linhas verticais e 13 linhas horizontais). Foi contado o número de intersecções das linhas, que estivessem sobre o tecido conjuntivo. Posteriormente foi realizado um cálculo para obter a porcentagem de tecido conjuntivo de cada músculo (número de intersecções sobre o tecido conjuntivo/total de intersecções da grade x 100).

Porcentagem de gordura intramuscular

As lâminas foram incubadas em solução de propilenoglicol (100%) (*LABSYNTH, Brasil*) por dois minutos e em Solução de *Oil Red O* de 2 a 3 horas em temperatura ambiente. Essa solução foi preparada com 1g de *Oil Red O* (*Sigma, Aldrich, USA*) + 100 ml de propilenoglicol. Após esse período as lâminas foram lavadas suavemente com propilenoglicol (85%) por 1 minuto e montadas em meio aquoso. Foram capturadas 10 imagens de cada músculo através de um microscópio de luz, em aumento de 20x (*Axiovision 0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha*) e analisadas utilizando um programa MatLab personalizado. (COLLINS, 2016)

Índice de Sarcopenia

O índice de sarcopenia foi calculado por meio da razão entre a massa muscular (valor em gramas) e o massa corporal (valor em quilogramas) (COLLINS, et al., 2016).

Análise JNM – Esterase Inespecífica

Para a identificação das junções neuromusculares, os músculos foram cortados longitudinalmente em três ou quatro fatias. Foram confeccionadas lâminas, as quais foram submetidas à reação de Esterase Inespecífica para caracterização da JNM (LEHRER; ORNSTEIN, 1959; CONFORTIM, et al., 2015)

Análise Morfométrica

Foram capturadas imagens por meio do microscópio de luz *Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha* e mensurado área total, perímetro e diâmetro máximo de 50 JNMs de cada musculo, por animal. As imagens foram analisadas com o software *Image J (version 1.43u, National Institutes of Health, USA)* por um pesquisador em estudo cego.

Análise Estatística

As variáveis foram apresentadas como média \pm desvio padrão. Para verificar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk e observada assimetria dos dados. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste *t de Student*, nos casos em que os pressupostos paramétricos foram atingidos ($p \geq 0,05$). Quando não, foram utilizados os testes U de Mann-Whitney. Para analisar a relação entre as citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e o índice de sarcopenia foi utilizado o coeficiente de Correlação de Spearman. Todas as análises foram feitas com o Software Statistical

Package for the Social Science versão 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). As figuras foram produzidas no Software *Graphpad Prism*, versão 5.0. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$). Para interpretação da força do coeficiente de correlação foi utilizada a Proposta de Munro.

Resultados

Porcentagem de gordura corporal e massa corporal

Após 28 semanas do início da dieta, os animais DIO demonstraram estatisticamente maior massa corporal (DIO $902,02g \pm 44,50g$ vs controle $596,48g \pm 50,89g$; $p=0,001$) e gordura corporal (DIO $28,78g \pm 4,45g$ vs $15,38g \pm 1,59g$; $p=0,001$) quando comparado aos animais controle (Fig. 1A e 1B $p < 0,05$).

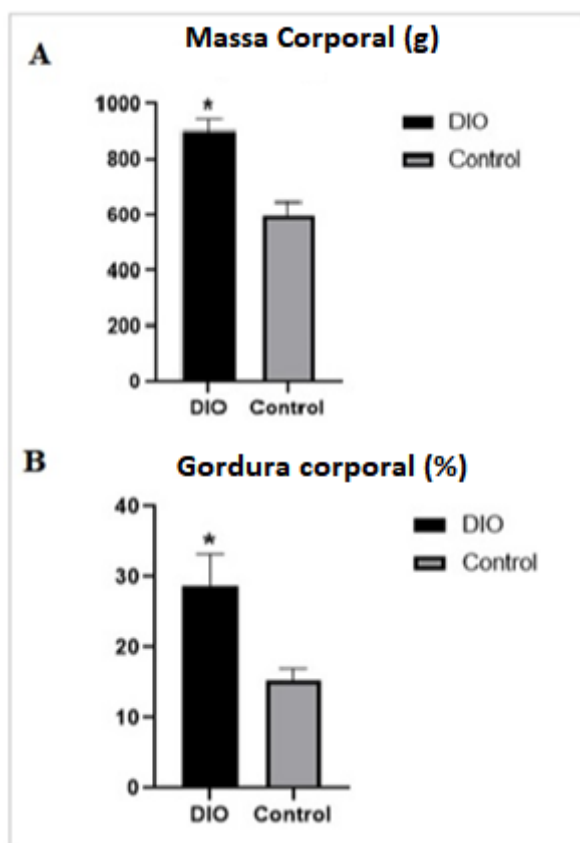


Figura 2 – Massa Corporal e gordura corporal (A) A massa corporal é aumentada para animais DIO em comparação com animais controle ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles. (B) A gordura corporal está aumentada para animais DIO em comparação com animais controle ($p < 0,05$). Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles.

Citocinas e adipocinas

O grupo DIO apresentou maiores níveis de leptina comparado ao grupo controle ($p=0,033$), enquanto os níveis de adiponectina foram maiores no grupo controle quando comparados ao grupo DIO ($p=0,002$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as medidas de IL-6 e TNF- α (Tabela 1).

Tabela 1 - Citocinas e adipocinas séricas

Citocinas e Adipocinas séricas (pg/ml)	Controle (n=5)	DIO (n=5)	p value
IL-6	5048,37 \pm 1577,31	6999,13 \pm 1242,52	0,062
TNF-α	650,24 \pm 111,50	588,92 \pm 101,32	0,363
Adiponectina	47,06 \pm 3,39	38,27 \pm 2,54	*0,002
Leptina	0,04 \pm 0,01	0,07 \pm 0,009	*0,033

Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado ao controle.

Massa Muscular, Índice de Sarcopenia e Área de Secção Transversa da Fibra muscular

O grupo DIO apresentou redução de massa do músculo VM em comparação ao grupo controle (controle 1,49g \pm 0,28g vs DIO 0,9g \pm 0,33g; $p=0,006$). O músculo VL apresentou valores semelhantes entre os dois grupos (controle 2,25g \pm 0,79g vs DIO 2,08g \pm 0,34g; $p=0,207$). O mesmo ocorreu com o músculo TA (controle 1,54g \pm 0,30g vs DIO 1,69g \pm 0,25g; $p=0,548$) (Figura 2A $p < 0,05$).

O grupo DIO apresentou um menor índice de sarcopenia comparado ao grupo controle, para os músculos VM (DIO 1,07 \pm 0,34 vs controle 3,40 \pm 2,53; $p=0,008$) e TA (DIO 2,38 \pm 0,33 vs controle 3,14 \pm 1,34; $p=0,034$). Para o músculo VL os valores continuaram semelhantes entre os dois grupos (DIO 2,50 \pm 0,64 vs controle 4,35 \pm 1,19, $p=0,070$).

O animais do grupo DIO demonstraram uma diminuição nas medidas de área de secção transversa normalizada, quando comparado ao grupo controle para os músculos VL (controle 0,70 \pm 0,09 vs DIO 0,66 \pm 0,10; $p=0,038$) e VM (controle 0,76 \pm 0,32 vs DIO 0,50 \pm 0,10; $p=0,021$). As medidas do músculo TA foram semelhantes entre os

dois grupos (controle $1,72 \pm 0,53$ vs DIO $1,43 \pm 0,26$ vs; $p=,0119$) (Figura 2C $p < 0,05$). As medidas foram normalizadas pela peso corporal do animal.

Parâmetros morfométricos das JNMs

O músculo VM apresentou um aumento nas medidas de área, perímetro e diâmetro máximo no grupo DIO comparado ao grupo controle ($p=0,001$), enquanto o músculo VL, apresentou aumento apenas nas medidas do perímetro da JNM ($p=0,001$) no grupo DIO. No músculo TA as medidas foram maiores apenas para a área total da JNM ($p=0,001$) do grupo DIO (Tabela 2) (Figura 4).

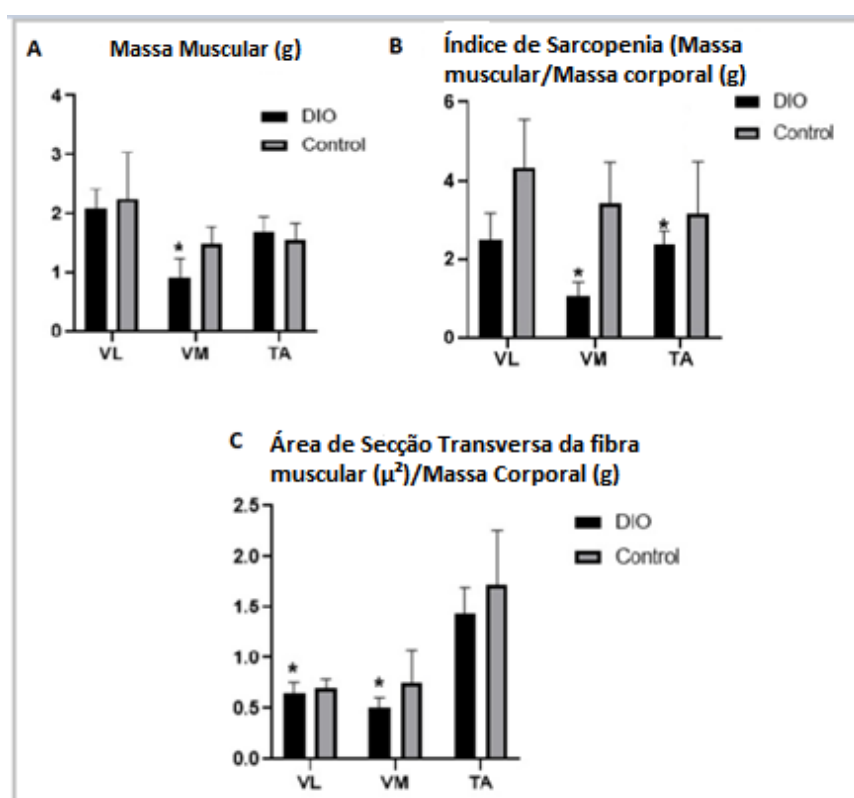
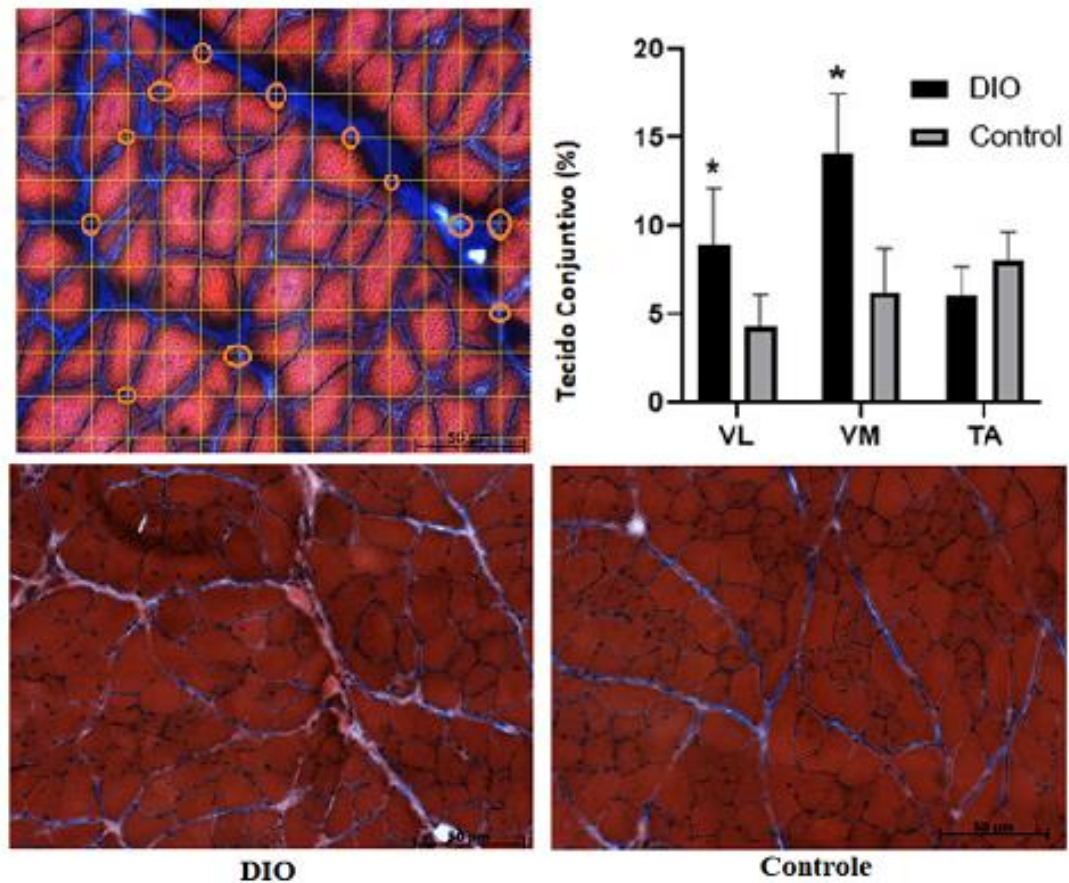


Figura 3 – Massa muscular, índice de sarcopenia e área de secção transversa da fibra muscular (A) Massa muscular dos músculos VL, VM e TA. Os dados são mostrados como valores brutos dentro dos grupos e expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles. (B) Índice de sarcopenia dos músculos VL, VM e TA. Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles. (C) Área de secção transversa da fibra muscular VL, VM e AT. Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles.

Porcentagem de tecido conjuntivo e de gordura intramuscular

Os animais do grupo DIO demonstraram maior quantidade de tecido conjuntivo comparado ao grupo controle para o músculo VM (DIO $14,18 \pm 3,29$ vs controle $6,26 \pm$

2,50; $p=0,005$) e VL (DIO $8,97 \pm 3,18$ vs controle $4,33 \pm 1,78$; $p=0,047$). Para o músculo TA os grupos DIO e controle demonstraram quantidades semelhantes de tecido conjuntivo (DIO $6,03 \pm 1,69$ vs controle $8,05 \pm 1,62$; $p=0,11$). O grupo DIO demonstrou um aumento da porcentagem de gordura intramuscular comparado ao grupo controle, para o músculo VL (DIO $3,24 \pm 1,72$ vs controle $1,07 \pm 0,87$; $p=0,001$), VM (DIO $2,43 \pm 1,51$ vs controle $0,73 \pm 0,54$; $p=0,001$) e TA (DIO $2,17 \pm 1,35$ vs controle $0,84 \pm 0,44$; $p=0,001$) (Figura 3).



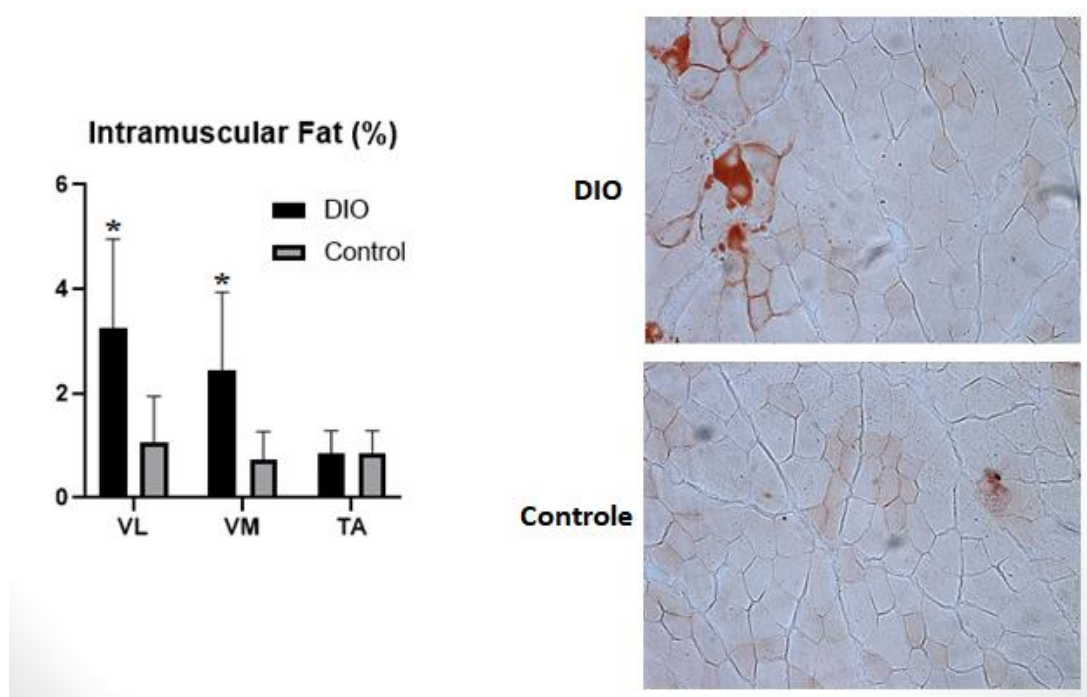


Figura 4 – Tecido Conjuntivo e gordura intramuscular. (A) Coloração com Tricômico de Masson e aplicação de grade para quantificar a porcentagem de tecido conjuntivo (%) no músculo vasto medial. Uma imagem representativa para cada grupo. Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles. (B) Coloração com Oil-RedO para quantificar a porcentagem de gordura intramuscular (%) no músculo vasto medial. Uma imagem representativa para cada grupo. Abreviação: DIO = Obesidade Induzida pela Dieta. Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles.

Tabela 2 – Parâmetros morfométricos da JNM

Parâmetros morfométricos JNM	Controle (n=5)	DIO (n=5)	<i>p value</i>
Vasto lateral			
Área Total (μm^2)	18,81 (8,53)	18,52 (6,36)	0,503
Perímetro (μm)	20,09 (4,86)	19,18 (3,77)	*0,001
Diâmetro Máximo (μm)	7,16 (1,66)	6,88 (1,49)	0,061
Vasto medial			
Área Total (μm^2)	17,33 (9,54)	23,03 (7,82)	*0,001
Perímetro (μm)	18,30 (4,54)	20,87 (4,33)	*0,001
Diâmetro máximo (μm)	6,67 (1,78)	7,29 (1,61)	*0,001
Tibial anterior			
Área Total (μm^2)	16,28 (9,43)	17,70 (7,02)	*0,001
Perímetro (μm)	17,78 (4,71)	18,28 (3,99)	0,096
Diâmetro máximo (μm)	6,44 (1,76)	6,69 (1,83)	0,11

Os dados são expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$, grupo DIO comparado aos controles.

Relação entre sarcopenia e citocinas pró-inflamatórias Houve uma relação significativa positiva forte entre concentração sérica de IL-6 com o índice de sarcopenia

do músculo VM ($r=0,733$, $p=0,003$), moderada com o VL ($r=0,638$, $p=0,047$) e moderada, negativa com o TA ($r=-0,676$, $p=0,032$). (Tabela 3)

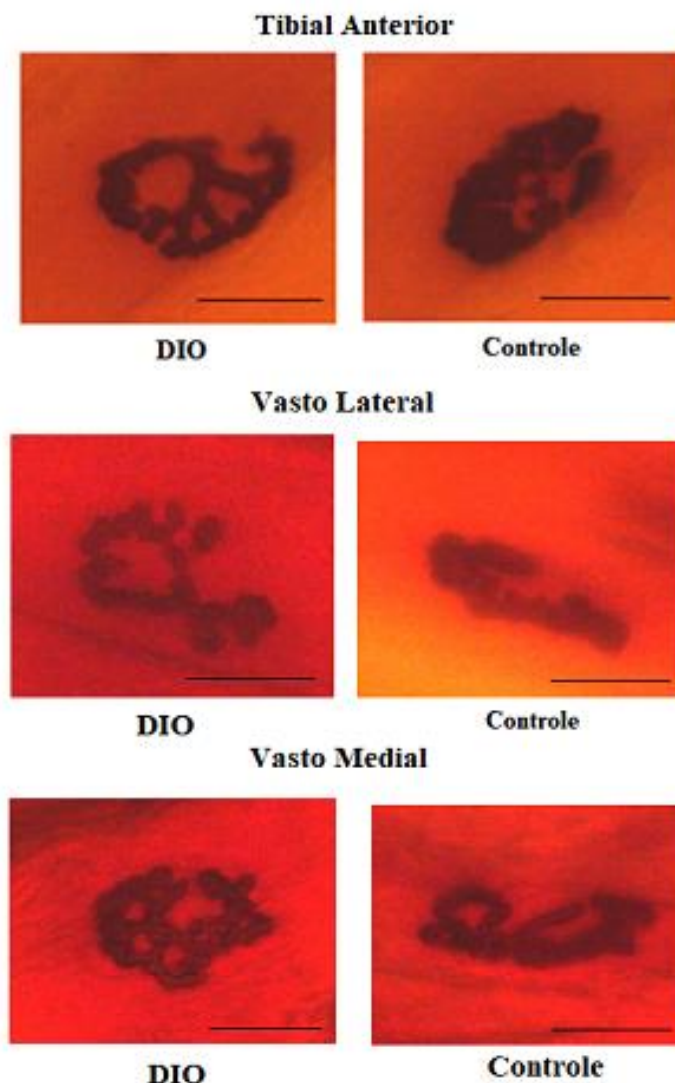


Figura 5. Morfologia da junção neuromuscular (*Técnica de Esterase Inespecífica*). Músculo tibial anterior, vasto lateral e vasto medial. Uma imagem representativa para cada grupo. Escala de barras: 10 μ m. Aumento 40x.

Tabela 2 – Relação entre o índice de sarcopenia e citocinas inflamatórias. Efeito do Modelo: Índice de sarcopenia.

Variáveis	Vasto Lateral		Vasto medial		Tibial Anterior	
	Spearman	p value	Spearman	p value	Spearman	p value
IL-6 (pg/ml)	-0,638	0,047*	0,733	0,003*	-0,676	0,032*
TNF-(pg/ml)	0,274	0,444	0,067	0,788	-0,165	0,650

Os dados são expressos com o valor do coeficiente de correlação. A força do coeficiente foi analisada de acordo com a proposta de Munro.* $p < 0,05$. A citocina IL-6 apresentou correlação moderada nos 3 músculos analisados.

Discussão

Esse é o primeiro estudo demonstrando o remodelamento das JNMs em animais obesos. Nosso principal achado revelou que os comprometimentos metabólicos advindos da obesidade promovem a expansão da JNM dos músculos VL, VM e TA. Esses resultados demonstram o potencial da obesidade de estar associada a alterações no sistema neuromuscular.

Foi observado um intenso remodelamento das JNMs do músculo VM do grupo DIO, representado pelo aumento de área total, perímetro e diâmetro máximo dessas sinapses. O processo de expansão das JNMs, encontrado em nosso estudo, é semelhante ao encontrado em situações de envelhecimento. No estudo de Deschenes, et al., 2010 ratos Fischer idosos (21 meses, $n=10$) apresentaram maiores dimensões de área total e perímetro das JNMs dos músculos plantares, comparado a animais jovens (10 meses, $n=10$)

As alterações no sistema neuromuscular durante o envelhecimento têm sido associadas ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial uma vez que esses danos reduzem a eficiência de diversos processos celulares (JANG, et al., 2010). Da mesma maneira, modelos de obesidade têm sido associados a disfunções mitocondriais principalmente devido ao processamento excessivo de nutrientes, gerando aumento de espécies reativas de oxigênio e menor produção de ATP (WEISS et al., 2013; revisado em COLLINS, et al., 2018).

Na região pós-sináptica das JNMs as mitocôndrias fornecem suporte metabólico, auxiliam na regulação de cálcio e na transmissão sináptica. Dessa forma, disfunções mitocondriais nessa região levam a um tamponamento do cálcio e alterações em moléculas importantes da JNM, como a rapsina (JANG & REMMEN, et al., 2011). O estudo de Opalach et al., 2010, demonstrou que a restrição calórica reduz os danos resultantes do estresse oxidativo nos axônios motores periféricos em animais idosos.

Os resultados do nosso estudo corroboram com o estudo de Valdez, et al., 2010, em que foram avaliados os efeitos da restrição calórica nas alterações sinápticas de animais idosos. O grupo de animais idosos que teve o conteúdo calórico da dieta reduzido em 40% apresentou preservação das JNMs e redução da incidência de distensão das dobras, diferentemente do grupo controle. Estes dados fornecem evidências que, intervenções na dieta, podem reverter mudanças sinápticas relacionadas à idade.

Dessa maneira, a expansão das JNMs observadas em nosso estudo pode estar associada às disfunções mitocondriais observadas na obesidade. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na remodelação da JNM e os possíveis efeitos na funcionalidade em modelos de obesidade.

Nesse estudo as concentrações séricas das citocinas pró-inflamatória IL-6 e TNF-alfa não foram significativamente diferentes entre os grupos DIO e controle. Esses achados estão de acordo com estudos prévios de obesidade induzida por dieta, que mostram alterações significativas de aumento na inflamação do tecido adiposo, mas aumentos leves na concentração sistêmica. No estudo de Griffin, et al., 2010 camundongos fêmeas C57BL/6J alimentadas com dieta hiperlipídica (45% de gordura) e padrão (10% de gordura) por 45 semanas, não demonstraram alterações significativas nas concentrações séricas de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, comparado ao controle.

Embora não tenham sido observadas diferenças na concentração séricas de IL-6 entre os grupos, foi observada uma relação positiva entre o índice de sarcopenia e IL-6. A CSA e o índice de sarcopenia foram menores no grupo DIO comparado ao grupo controle, sugerindo alterações relacionadas à atrofia muscular. Esses resultados corroboram com estudos prévios que demonstraram que citocinas inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo podem afetar a estrutura interna dos sarcômeros, através da modulação de proteínas como a miogenina e MyoD do músculo esquelético e de proteínas da junção neuromuscular como tirosina quinase específica do músculo (MuSK) (PELLEGRINELLI, et al., 2015).

As citocinas TNF-alfa e IL-6 são capazes de inibir o crescimento muscular através da inibição do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), o principal

ativador do mechanistic target of rapamycin (mTOR), uma proteína-chave envolvida na iniciação da tradução e síntese de proteínas (SCOTT; LAWRENCE, 1998, YOON, 2017; AKHMEDOV & BERDEAUX, 2013; KATO et al., 1994). Além disso, o TNF- α pode levar a indução da atrofia muscular através da ativação da via clássica Nuclear Factor Kappa B(NFKB), (CAI et al., 2004). No estudo de Collins, et al., 2016, ratos Sprague-Dawley machos que consumiram dieta rica em gordura e alto teor de sacarose, apresentaram diminuição nos níveis de mRNA para MAFbx/atrogina comparado ao grupo controle, indicando alterações musculares como sarcopenia.

O grupo DIO apresentou os níveis séricos de leptina aumentados e de adiponectina reduzidos. Esses resultados estão de acordo com literatura, pois tem sido demonstrado que a concentração de adiponectina diminui com o aumento de tecido adiposo, apresentando atividade anti-inflamatória, enquanto a leptina é produzida essencialmente pelo tecido adiposo e apresenta atividade pró-inflamatória. Além disso, a leptina tem demonstrado influência negativa na fase de proliferação do crescimento muscular (AKHMEDOV & BERDEAUX, 2013; GRIFFIN, et al., 2010).

O grupo DIO demonstrou uma maior porcentagem de tecido conjuntivo, ou seja, de fibrose muscular, comparado ao grupo controle. Esses resultados estão de acordo com estudos D'SOUZA, et al (2015), que demonstraram que a obesidade induzida por dieta pode interromper os processos de reparo muscular. A fibrose é o último estágio do processo de reparo tecidual típico, assim a fibrose muscular, observada em nosso estudo, pode indicar um dano muscular induzido pela dieta e uma interrupção no processo de cicatrização adequada do tecido (MANN, et al., 2011).

Os níveis de gordura intramuscular foram maiores no grupo DIO comparado ao grupo controle. Esses níveis estão de acordo com estudos prévios e estão relacionados à maior absorção de ácidos graxos da circulação (UNGER ET AL., 2010 VAN HERPEN E SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008; GOODPASTER ET AL., 2000B; SINHA ET AL., 2002; BONEN ET AL., 2004; COLLINS, 2016) Esses resultados demonstram a potencial implicação do acúmulo de gordura na estrutura e função muscular, uma vez que a gordura intramuscular pode substituir a porção contrátil do músculo, diminuindo assim sua efetividade (COLLINS, 2017; FUJIMOTO et al., 2008; THIELE e SPANDL, 2008).

Dessa maneira, a expansão das JNMs observadas em nosso estudo pode estar relacionada aos prejuízos da integridade muscular como aumento de gordura intramuscular, tecido conjuntivo e atrofia muscular. No entanto, outros estudos são necessários para avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na remodelação da JNM e os possíveis efeitos na funcionalidade em modelos de obesidade.

As limitações do presente estudo foram à ausência de análises funcionais e de proteínas envolvidas na JNM. Os achados desse estudo apontam a importância e necessidade de medidas de intervenção, que busquem estimular a modulação da inflamação, uma vez que estão envolvidas com alterações das JNMs. Desta forma, novos programas de reabilitação devem ser investigados, a fim de incorporar exercícios que envolvam a função muscular, além dos ganhos de massa e força e eliminação da gordura intramuscular.

Conclusão

No modelo de obesidade em ratos, utilizado neste estudo, pudemos identificar que a obesidade promoveu um remodelamento das JNMs dos músculos vasto medial, vasto lateral e tibial anterior de ratos, a qual foi acompanhada por atrofia muscular. Da mesma forma, houve aumento da quantidade de gordura intramuscular e de tecido conjuntivo, sugerindo que o aumento de tecido adiposo em decorrência de uma dieta rica em gordura e açúcar, modificam as junções neuromusculares, adipocinas circulantes e citocinas inflamatórias, podendo afetar a função do tecido muscular.

Referências

AKHMEDOV, Dmitry; BERDEAUX, Rebecca. The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Frontiers in physiology*, v. 4, p. 371, 2013.

BALICE-GORDON, R. J.; LICHTMAN, J. W. In vivo visualization of the growth of pre-and postsynaptic elements of neuromuscular junctions in the mouse. *Journal of Neuroscience*, v. 10, n. 3, p. 894-908, 1990.

BONEN, Arend et al. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and

increased sarcolemmal FAT/CD36. *The FASEB Journal*, v. 18, n. 10, p. 1144-1146, 2004.

BROWN, L. A. et al. Diet-induced obesity alters anabolic signalling in mice at the onset of skeletal muscle regeneration. *Acta physiologica*, v. 215, n. 1, p. 46-57, 2015.

CAI D. et al. IKKbeta/NF-KappaB activation causes severe in mice. *Cell*. v. 119, p 285-298, 2004.

CONFORTIM, Heloisa Deola et al. Efeitos do envelhecimento e da restrição de proteínas maternas na morfologia das fibras musculares e nas junções neuromusculares de ratos após recuperação nutricional. *Micron* , v. 71, p. 7-13, 2015.

CUNHA, J. E. et al. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 6366, 2019.

D'SOUZA, Donna M. et al. Diet-induced obesity impairs muscle satellite cell activation and muscle repair through alterations in hepatocyte growth factor signaling. *Physiological reports*, v. 3, n. 8, p. e12506, 2015.

GOODPASTER, Bret H.; THAETE, F. Leland; KELLEY, David E. Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition*, v. 71, n. 4, p. 885-892, 2000.

COLLINS, Kelsey Helen-Marie Collins. Diet-Induced Obesity and Musculoskeletal Health: Studies in a Rat Model. 2017. Tese de Doutorado. University of Calgary.

COLLINS, Kelsey H. et al. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. *Frontiers in physiology*, v. 9, p. 112, 2018.

COLLINS, Kelsey H. et al. High-fat high-sucrose diet leads to dynamic structural and inflammatory alterations in the rat vastus lateralis muscle. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 34, n. 12, p. 2069-2078, 2016.

DESCHENES, Michael R. et al. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle & nerve*, v. 23, n. 10, p. 1576-1581, 2000.

DESCHENES, Michael R. et al. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Experimental gerontology*, v. 45, n. 5, p. 389-393, 2010.

D'SOUZA, Donna M. et al. Diet-induced obesity impairs muscle satellite cell activation and muscle repair through alterations in hepatocyte growth factor signaling. *Physiological reports*, v. 3, n. 8, p. e12506, 2015.

GONZALEZ-FREIRE, Marta et al. The neuromuscular junction: aging at the crossroad between nerves and muscle. *Frontiers in aging neuroscience*, v. 6, p. 208, 2014.

GREGOR, Margaret F.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*, v. 29, p. 415-445, 2011.

GRIFFIN, Timothy M. et al. Diet-induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. *Arthritis research & therapy*, v. 12, n. 4, p. R130, 2010.

GOODPASTER, Bret H. et al. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism*, v. 49, n. 4, p. 467-472, 2000.

HILL, Cameron et al. Does Dietary-Induced Obesity in Old Age Impair the Contractile Performance of Isolated Mouse Soleus, Extensor Digitorum Longus and Diaphragm Skeletal Muscles?. *Nutrients*, v. 11, n. 3, p. 505, 2019.

JANG, Youngmok C. et al. Increased superoxide in vivo accelerates age-associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration. *The FASEB Journal*, v. 24, n. 5, p. 1376-1390, 2010.

JANG, Youngmok C.; VAN REMMEN, Holly. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Experimental gerontology*, v. 46, n. 2-3, p. 193-198, 2011.

LEE, S. et al. Relationships between insulin sensitivity, skeletal muscle mass and muscle quality in obese adolescent boys. *European journal of clinical nutrition*, v. 66, n. 12, p. 1366-1368, 2012.

LEHRER, B. G. M. & Ornstein, L. A Diazo Coupling Method for the Electron Microscopic Localization of Cholinesterase. *Cell*, v. 6, p. 399–406, 1959.

MANN, Christopher J. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal muscle*, v. 1, n. 1, p. 21, 2011.

MEHTA, Ranjana K.; CAVUOTO, Lora A. The effects of obesity, age, and relative workload levels on handgrip endurance. *Applied ergonomics*, v. 46, p. 91-95, 2015.

PELLEGRINELLI, Vanessa et al. Human adipocytes induce inflammation and atrophy in muscle cells during obesity. *Diabetes*, v. 64, n. 9, p. 3121-3134, 2015.

SENE-FIORESE, Marcela et al. Efficiency of intermittent exercise on adiposity and fatty liver in rats fed with high-fat diet. *Obesity*, v. 16, n. 10, p. 2217-2222, 2008.

SINHA, Ranjana et al. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes*, v. 51, n. 4, p. 1022-1027, 2002.

TALLIS, Jason et al. The effect of obesity on the contractile performance of isolated mouse soleus, EDL, and diaphragm muscles. *Journal of Applied Physiology*, v. 122, n. 1, p. 170-181, 2017.

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

VALDEZ, Gregorio et al. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 33, p. 14863-14868, 2010.

WEISS, Ram; BREMER, Andrew A.; LUSTIG, Robert H. What is metabolic syndrome, and why are children getting it?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1281, n. 1, p. 123, 2013.

WILLMANN, Raffaella et al. Cholesterol and lipid microdomains stabilize the postsynapse at the neuromuscular junction. *The EMBO journal*, v. 25, n. 17, p. 4050-4060, 2006.

YOON, Mee-Sup. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass. *Frontiers in physiology*, v. 8, p. 788, 2017.

ZAMIR, Orit; CHARLTON, Milton P. Cholesterol and synaptic transmitter release at crayfish neuromuscular junctions. *The Journal of physiology*, v. 571, n. 1, p. 83-99, 2006.

ZHANG, Congcong et al. Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 3, p. 1489-1499, 2013.

5. ANEXOS

5.1. Anexo 1

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da dieta hiperlipídica, indutora da obesidade na morfologia da Junção Neuromuscular no músculo esquelético de ratos", protocolada sob o CEUA nº 6435181218 (ID 001128), sob a responsabilidade de **Stela Márcia Mattiello** e equipe; *Isabela Piazzí; Thiago Luiz de Russo* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 21/02/2019.

We certify that the proposal "Effects of the hyperlipidic, obesity-inducing diet on the neuromuscular junction morphology in the skeletal muscle of rats", utilizing 10 Heterogenics rats (10 males), protocol number CEUA 6435181218 (ID 001128), under the responsibility of **Stela Márcia Mattiello** and team; *Isabela Piazzí; Thiago Luiz de Russo* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 02/21/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2019** a **08/2019**

Área: **Fisioterapia**

Origem: **Biotério Central da UFSCar**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **40 a 60 dias**

N: **10**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **220 a 250 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Imuno-Histoquímica, do Departamento de Fisioterapia, da UFSCar.

São Carlos, 28 de janeiro de 2020

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos