



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

**ADAPTAÇÕES DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR NA ISQUEMIA CEREBRAL E
NO DIABETES MELLITUS**

YISEL CAROLINA ESTRADA BONILLA

**São Carlos
2018**



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

**ADAPTAÇÕES DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR NA ISQUEMIA CEREBRAL E
NO DIABETES MELLITUS**

Discente: Yisel Carolina Estrada Bonilla

Orientador: Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Aiello Castro de Souza-Tomé

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Fisioterapia.

**São Carlos
2018**

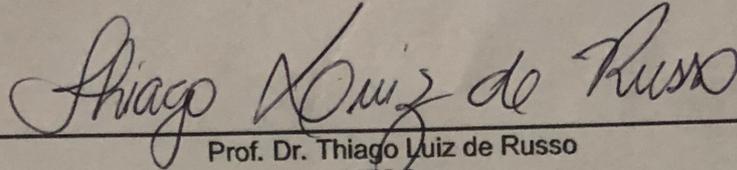


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

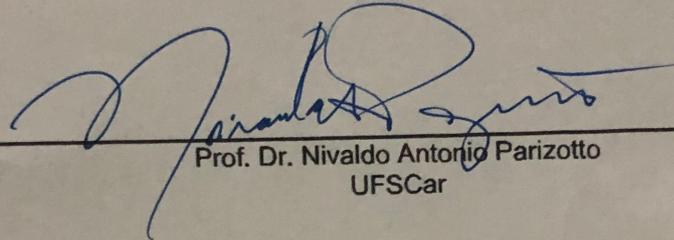
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

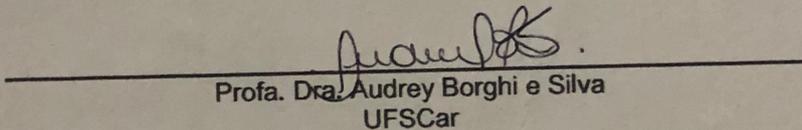
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Yisel Carolina Estrada Bonilla, realizada em 20/07/2018:



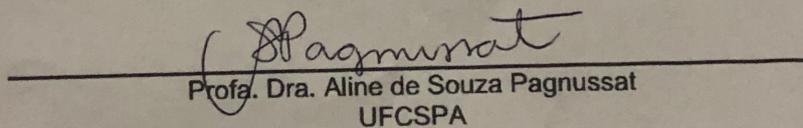
Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
UFSCar



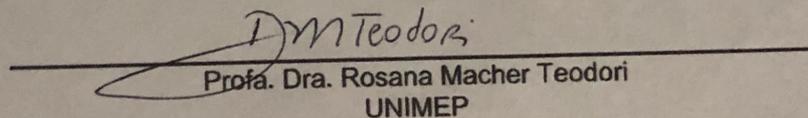
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
UFSCar



Profa. Dra. Audrey Borghi e Silva
UFSCar



Profa. Dra. Aline de Souza Pagnussat
UFCSPA



Profa. Dra. Rosana Macher Teodori
UNIMEP

Apoio Financeiro e colaborações

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2013/21621-3), apoio do Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq (Brasil) além do apoio de Colfuturo/Colciencias – (52844219-Governo da Colômbia), assim como o suporte da Unidade de Pesquisa da Universidade Santo Tomás – Bogotá, D.C., Colômbia. O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Neurológica – LaFiN e com colaboração dos Laboratórios de Neurociências e de Plasticidade Muscular do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

São inúmeras as palavras para expressar este momento. Para todas as lutas, sacrifícios, aprendizados, conquistas e metas que consegui até aqui e as que ainda estão por vir, gostaria de expressar minha alegria da seguinte forma:

“¡Soñar, con lo que más queremos,
aquello difícil de lograr!
¡Es ofrecer llevar la meta a su fin
y creer que la veremos cumplir!
¡Arriesgar de una vez lo que soy por lo que puedo ser!
¡Puedes llegar, lejos!
¡A las estrellas alcanzar y hacer de sueños realidad!
¡Y puedes volar, alto!
¡Sobre las alas de la fé, sin más temores por vencer...
Puedes llegar!
Hay días que pasan a la historia...
¡Son días difíciles de olvidar!
Se muy bien que puedo triunfar,
¡Seguiré con toda mi voluntad!
Hasta el destino enfrentar
¡Y por siempre mis huellas, dejar!”

G. Estefan.

Dedico esta tese a Deus, já que sem o Pai do céu não estaria aqui, atingindo os meus sonhos. Dedico também à minha família: meus pais, Álvaro e Luz Mariela, por todos os exemplos, suporte, companhia e amor que recebi durante todos estes anos de vocês. À minha irmã, Maryi Viviana, minha fofura de gato, obrigada por ser o meu exemplo de disciplina, constância e amor pelo que faz. Ao meu amado esposo, meu pato lindo, meu Germán, que amo com meu coração inteiro. Obrigada amor por ser meu companheiro de vida, pela tua infinita paciência, amor e compreensão. Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos, sem os quais esta tese e o desenvolvimento do projeto de pesquisa não seriam hoje uma realidade, e àqueles que contribuíram de alguma forma para meu crescimento profissional, acadêmico e pessoal. Gostaria de agradecer a Deus, porque graças a Ele estou aqui, tendo a linda oportunidade de crescer em todos os aspectos da minha vida. Só Ele sabe o caminho todo que percorri para finalmente realizar a minha meta de formação como Doutora. Graças a Deus do céu pelas oportunidades dadas e por me acompanhar neste processo, nunca me deixando desamparada.

À minha família, pais e irmã, sempre presentes, fazendo parte importante das minhas alegrias e das minhas tristezas. Graças a vocês, exemplos de constância, cuidado, gosto pelo estudo e amor pelo que fazem. Vocês foram o combustível mais que necessário para chegar até onde estou hoje. Obrigada por me ensinarem que quando você quer conseguir as coisas, você deve trabalhar para conquistá-las com constância e responsabilidade. Ao meu grande amor, meu esposo Germán, quem teve a força para me esperar neste tempo que estive estudando aqui no Brasil, com toda a paciência e amor possíveis. Amo muito todos vocês! Grande parte das minhas conquistas devo a vocês. Gostaria de fazer um reconhecimento especial e lembrança ao meu irmão Boris (*in memoriam*). Ele já se encontra na presença do nosso Pai do céu, mas no tempo que esteve neste mundo, me ensinou muitas coisas que não somente me inspiraram a ser uma profissional em fisioterapia, mas também ser uma pessoa melhor.

Agradeço também aos meus amigos de sempre, que me conhecem desde criança e que compartilhei muitos momentos. Elizabeth, Ivonne Adriana, Helena, Sandra Paola, obrigada por estarem aí, me acompanhando e torcendo por mim desde o nosso país. Aos meus amigos e colegas do trabalho, Adriana, Yohanna, Isabel Adriana, Diana, Yennys e Felipe, obrigada pela oportunidade e confiança. As minhas caras amigas que fiz aqui, queridas Genoveva e Gabriela, obrigada pela paciência, carinho e companhia. Agradeço de forma muito especial ao Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo, minha imensa gratidão pela oportunidade dada e por tudo que me ensinou neste tempo. Obrigada por ser como um pai para mim e por me oferecer a sua família como minha família aqui no Brasil.

Às pessoas dos laboratórios que sempre estiveram disposta a me ajudar com o desenvolvimento do projeto. Do Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Neurológica – LaFiN, agradeço infinitamente aos meus colegas pela disposição e ajuda, agradeço especialmente à Dra. Fernanda Faturi por me ensinar e me transmitir o amor pelos animais. Agradeço igualmente as caras ICs que trabalharam comigo, Rafaella, Gracielle e Gabrielle, obrigada pela

dedicação e vontade de aprender. Do Laboratório de pesquisa em Plasticidade Muscular, Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini, pelo aporte feito com seus amplos conhecimentos e experiência, aprendi muito com você. Gostaria de agradecer também à Dra Paula Aiello Castro de Souza–Tomé, minha coorientadora, obrigada pelos aportes feitos e conhecimento dado, gostei muito de trabalhar com você. Aos meus caros colegas de trabalho no lab, Jonnatan e Germana, mil e mil graças pelos ensinamentos, risadas e momentos compartilhados. Do Laboratório de Neurociências, agradeço à Profa. Dra. Ana Carolyna Lepesteur Gianlorenço pela ajuda e disponibilidade dada para o uso da infraestrutura desse laboratório.

Aos meus animais usados em meus experimentos, meus ratinhos, meu respeito absoluto. Obrigada por permitirem que eu aprendesse de vocês e com vocês. Aos funcionários do biotério central por estarem sempre dispostos a ajudar com a parte técnica do desenvolvimento do projeto, com o fornecimento de animais e de insumos necessários. Finalmente, mas não menos importante, agradeço às agências/fundações de amparo à pesquisa que ajudaram na realização deste projeto. Do Brasil, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo número 2013/21621-3), pelos fundos oferecidos para o desenvolvimento deste projeto. Da Colômbia agradeço enormemente à Fundação COLFUTURO que em parceria com a COLCIENCIAS – Governo da Colômbia, ofertaram a bolsa de estudos para me manter neste tempo. Agradeço igualmente à Universidade Santo Tomás – USTA Colômbia, mais especificamente ao escritório de desenvolvimento curricular e docente, assim como à Faculdade de Cultura Física, Esportes e Lazer, e em seu nome, aos meus chefes Padre Pedro José Diaz Camacho-PhD, Coordenador da divisão de Ciências da Saúde campus Bogotá, D.C, assim como ao Prof. Dr. Jesús Astolfo Romero García, Coordenador do programa de Cultura Física, Esporte e Lazer, Bogotá, D.C. Sem a ajuda econômica e o tempo recebido, não teria a oportunidade de fazer meu Doutorado.

RESUMO

Introdução: As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são a causa principal de mortalidade e incapacidade prematura na maioria dos países do continente americano, incluindo ao Brasil. Entre as DCNT encontram-se o Diabetes Mellitus (DM) e o Acidente Vascular Cerebral (AVC). Tanto o DM como o AVC, podem comprometer a função dos membros superiores (MMSS), diminuindo o desempenho motor pelo comprometimento da estrutura e da função do tecido muscular. A junção neuromuscular (JNM) é uma importante estrutura que relaciona a função do sistema nervoso central e periférico a do tecido muscular. Compreender as alterações da JNM no DM e no AVC e sua relação com a função do membro superior, pode auxiliar na compreensão da fisiopatologia destas doenças, bem como norteia possíveis terapias.

Objetivo: Os dois estudos tiveram por objetivo avaliar a plasticidade da JNM em modelos animais de DM e de isquemia cerebral, separadamente, assim como a sua relação com a destreza motora em uma tarefa de alcance e manipulação. **Método:** Para tal, dois estudos foram conduzidos. No estudo 1, 12 ratos Wistar de 3 meses de idade, divididos em 2 grupos Controle (C) e DM, foram treinados na tarefa de alcance, passando por processos de habituação, determinação da dominância e treinamento da tarefa de alcance. Após esses processos, todos os animais foram avaliados com o teste de recolher tabletes. Nos animais do grupo DM foi realizada a indução do DM, com a injeção de Estreptoizotocina dissolvida em tampão citrato. No estudo 2, 12 ratos Wistar de 3 meses de idade, divididos em 2 grupos (C e isquemia cerebral, IC) foram também treinados para a tarefa de recolher tabletes, como anteriormente explicado. Em IC, a isquemia foi induzida com injeção de Endotelina 1 – ET1 na área de representação motora da pata dianteira. Após 15 dias, todos os animais dos dois grupos foram eutanasiados, extraindo-se os músculos bíceps, tríceps, flexor e extensor dos dedos. A área de secção da fibra muscular, a porcentagem de tecido conjuntivo e a área da JNM foram analisadas nos dois estudos. Correlações entre variáveis morfométricas e desempenho motor foram realizadas

Resultados: No estudo 1, houve diminuição dos parâmetros morfométricos da JNM, como também um aumento da atrofia dos músculos dos animais do grupo DM comparado com os animais do grupo C. No estudo 2, houve um aumento nos parâmetros morfométricos da JNM e um aumento da atrofia dos músculos dos animais do grupo IC comparado com os animais do grupo C. Nos dois estudos, houve uma associação importante é direta entre os parâmetros da JNM e o desempenho motor avaliados nos grupos DM e IC. **Conclusões:** Tanto o DM como a IC geram alterações na JNM, atrofia muscular e fibrose dos músculos da pata dianteira. Tais alterações associam-se ao desempenho em tarefas coordenadas da pata dianteira dos animais.

Palavras chave: Síndrome metabólica, Doença Cerebrovascular, Junção Neuromuscular, Fisioterapia, Desempenho Motor.

ABSTRACT

Introduction: Chronic Noncommunicable Diseases (CNCDs) are the leading cause of mortality and premature disability in most countries of the American continent, including Brazil. Among CNCDs are Diabetes Mellitus (DM) and Cerebral Vascular Accident (CVA). Both DM and CVA can compromise upper limb (UL) function, decreasing motor performance by compromising the structure and function of muscle tissue. The Neuromuscular Junction (NMJ) is an important structure that relates the function of the central and peripheral nervous system to that of muscle tissue. Understanding NMJ changes in DM and CVA and its relation to UL function may help in understanding the pathophysiology of these diseases, as well as guide possible therapies. **Objective:** The objective of the two studies was to evaluate the plasticity of NMJ in animal models of DM and Brain Ischemia (BI) separately, as well as its relationship with motor skills in a reach and manipulation task. **Method:** For this, two studies were conducted. In study 1, 12 3-month-old Wistar rats, divided into two Control (C) and DM groups, were trained in reaching task, through habituation, dominance determination and reach task training. After these procedures, all animals were evaluated with the test of collecting tablets. In the animals of the DM group, the induction of DM was performed, with the injection of streptozotocin (STZ) dissolved in citrate buffer. In study 2, 12 3-month-old Wistar rats divided into 2 groups (C and BI) were also trained for the task of collecting tablets, as previously explained. In BI group, ischemia was induced with injection of Endothelin 1 (ET1) in the area of motor representation of forelimb. After 15 days, all animals of both groups were euthanized, extracting the biceps, triceps, fingers flexor and fingers extensor muscles. The cross-sectional muscle fiber area (CSA) the percentage of connective tissue and NMJ area were investigated in both studies. Correlations between morphometric variables and motor performance were performed. **Results:** In study 1, there was a decrease in the morphometric parameters of the NMJ, as well as an increase in the atrophy of the muscles of the DM group compared to the animals in C group. In study 2, there was a increase in the morphometric parameters of NMJ and an increase in muscle group atrophy of the BI group compared to the animals in C group. In the two studies, there was an important association between the NMJ parameters and the motor performance evaluated in the DM and BI. **Conclusions:** Both DM and BI generate changes in NMJ, muscular atrophy and fibrosis of the forelimb muscles. Such alterations are associated with performance in coordinated tasks of the forelimb of the animals.

Key words: Metabolic Syndrome, Cerebrovascular Disease, Neuromuscular Junction, Physiotherapy, Motor Performance.

ABREVIATURAS

Em Português:

DM: Diabetes Mellitus

STZ: Estreptozotocina

IC: Isquemia Cerebral

AVC: Acidente Vascular Cerebral

MMSS: Membros Superiores

JNM: Junção Neuromuscular

ACh: Acetilcolina

RACHR: Receptores de Acetilcolina

AST: Área de Secção Transversa da Fibra Muscular

Em Inglês:

CVA: Cerebrovascular Accident

BI: Brain Ischemia

DM: Diabetes Mellitus

ET1: Endothelin 1

STZ: Streptozotocin

UL: Upper Limbs

ACh: Acetylcholine

ACR – AChR: Acetylcholine Receptors

ADL: Activity Daily Living

ECM: Extracellular Matrix

ROS: Reactive Oxygen Species

NO: Nitric Oxide

NMJ: Neuromuscular Junction

CSA: Cross Sectional Muscular Fiber Area

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Estudio 1	45
Figura 2 – Estudio 1	46
Figura 3 – Estudio 1	45
Figura 1 – Estudio 2	73
Figura 2 – Estudio 2	74
Figura 3 – Estudio 2	75
Figura 4 – Estudio 2	75

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Estudo 1	42
Tabela 2 – Estudo 1	43
Tabela 1 – Estudo 2	70
Tabela 2 – Estudo 2	71

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice 1. Formatos de acompanhamento – grupos BI (ET1), DM(STZ) e Controle (C)	81
Apêndice 2. Aprovação do comitê de ética em pesquisa com animais CEUA/UFSCar	93
Apêndice 3. Anais do XI Congresso Nacional/XII Simpósio Internacional de Neurociências do COLNE – Bogotá, D.C., Colômbia	94

SUMÁRIO

	Página
PREFÁCIO	15
CONTEXTUALIZAÇÃO	16
Referências	19
ESTUDO 1	21
Título e autores	22
Resumo e palavras chave	23-24
Introdução	25
Métodos	26
Resultados	32
Discussão	34
Conclusão	37
Referências	38
ESTUDO 2	47
Título e autores	48
Resumo e palavras chave	48
Introdução	50
Metodología	51
Resultados	58
Discussão	61
Conclusão	64
Referências	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO DE ESTUDOS	77
APÊNDICES	79

PREFÁCIO

Esta tese está organizada da seguinte forma: uma breve contextualização do problema e dois manuscritos. O primeiro estudo intitulado “Reaching task performance is associated to neuromuscular junction adaptations in rats with type 1 Diabetes Mellitus” submetido ao *Brazilian Journal of Physical Therapy* investigou o efeito do Diabetes do tipo 1 sobre as modificações neuromusculares, com destaque para a junção neuromuscular e sua relação com o desempenho de uma tarefa coordenada de alcance e manipulação em ratos. Já o segundo estudo intitulado “Compensatory neuromuscular junction adaptations of forelimb muscles in focal cortical ischemia in rats” submetido à revista *Neuroscience Letters*. Verificou-se de que forma a isquemia cortical focal afeta a junção neuromuscular e também sua relação com o desempenho. Ao final da tese, uma conclusão geral é apresentada, assim como a descrição das atividades desenvolvidas.

CONTEXTUALIZAÇÃO

As Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) referem-se a um conjunto de condições que são responsáveis por 40 milhões de mortes no mundo ao ano, sendo que 87% das mortes ocorrem em países em desenvolvimento, como o Brasil. Além disso, geram custos excessivos devido a complicações de saúde que elas trazem. Algumas das DCNT mais recorrentes são as doenças cardiovasculares e o Diabetes Mellitus (DM), os quais geram respectivamente, cerca de 17 milhões e 2 milhões de mortes ao ano (OMS, 2016).

As DCNT são caracterizadas como de longo prazo. Acontecem pela combinação de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e comportamentais. Afetam todas as faixas etárias, regiões e países. Crianças, adultos e idosos são vulneráveis aos fatores de risco que favorecem o surgimento e desenvolvimento das DCNT, como dietas inadequadas, ricas em gorduras saturadas e carboidratos, inatividade física, que leva a um estilo de vida sedentário, tabagismo e consumo excessivo de álcool (OMS., 2016).

O desenvolvimento das DCNT deve-se, entre outros aspectos, a fatores como a urbanização rápida e não planejada, a massificação de estilos de vida pouco saudáveis, bem como o aumento da expectativa de vida. Dietas inadequadas e inatividade física podem gerar, entre outras complicações, hipertensão arterial sistêmica - HAS, hiperglicemia, quadros de dislipidemia/ hiperlipidemia e obesidade. Estes últimos são conhecidos como Fatores de Risco Metabólicos que, por sua vez, podem acarretar no desenvolvimento de doenças vasculares - DV e metabólicas (como síndrome metabólica e Diabetes Mellitus - DM), sendo estas as principais causas de morte prematura, sendo também as doenças que geram maiores custos de saúde, para o tratamento a ser seguido e para as consequências que podem deixar (OMS., 2014).

O DM é definido como “uma doença crônica que aparece quando o pâncreas não produz as quantidades necessárias de insulina ou, quando o organismo não utiliza eficazmente a insulina que produz” (resistência à insulina). A falta de insulina gera por sua vez, hiperglicemia (OMS, 2016). Sabe-se que o número de pessoas com DM tem aumentado de 108 milhões em 1980 a 422 milhões de pessoas no mundo em 2014. Da mesma forma, a prevalência mundial do DM em adultos (acima de 18 anos de idade), tem aumentado do 4,7% em 1980 para 8,5% em 2014. Além disso, a prevalência do DM tem aumentado com maior rapidez nos países desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Por ser uma doença sistêmica, o DM gera, entre outras complicações: cegueira, insuficiência renal, infarto agudo do miocárdio e acidente cerebral vascular – AVC. Outras das principais complicações do DM (mais especificamente do DM tipo I) são: a miopatia diabética, que pode se desenvolver na fase aguda do DM e a

neuropatia diabética, que pode se desenvolver na etapa mais crônica do DM (OMS, 2014; NUNNES DE SENA., 2015; BALCELLS et al., 2016).

A miopatia diabética é definida como uma desordem muscular que pode ter várias características, sendo a fraqueza muscular o principal sintoma. Há vários tipos de miopatia, entre eles, a miopatia inflamatória, onde a principal característica é o aumento do estresse oxidativo nas fibras musculares (SOUZA et al., 2013). Este processo leva à ativação de cascatas de inflamação dentro das células musculares, com aumento no acúmulo de linfócitos, gerando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio - EROs. Desta forma, as EROs podem ser as responsáveis pelos processos de apoptose e de morte celular, assim como dos processos de oxidação de inúmeros tipos de proteínas musculares.

Algumas das proteínas afetadas pelo aumento do estresse oxidativo são a rapsina e a agrina, proteínas que são importantes para a estabilidade dos receptores de Acetilcolina – RAC, nas membranas pós-sinápticas. Ao serem oxidados, os RAC da JNM estarão menos estáveis, gerando alterações estruturais (perda de cristas funcionais da JNM, perda de área de sinapse), assim como alterações funcionais da JNM (SOUAYAH et al., 2009; GARCIA et al., 2012). Como consequências destas alterações destacam-se problemas na transmissão sináptica, alterações dos motoneurônios e a atrofia muscular (RAMJI et al., 2007; NUNNES DE SENNA., 2015).

Uma outra DCNT que também gera inúmeras alterações é o Acidente Vascular Cerebral – AVC. A Organização Mundial da Saúde – OMS - define o AVC como “uma síndrome clínica de desenvolvimento rápido devido a uma perturbação focal da função cerebral, de origem vascular, de mais de 24 horas de duração” (OMS., 2016). As consequências que traz o AVC dependem do local e tamanho da lesão. Cada ano, cerca de 80 milhões de pessoas morrem por causa de um AVC no mundo, sendo uma das doenças neurológicas mais comuns; é considerada a primeira causa de incapacidade na população idosa e segunda causa de demência em nível mundial (JORGUENSEN et al., 2000; MOYANO et al., 2010).

Segundo as estatísticas, 15% a 30% da população que sofreu um AVC apresenta um comprometimento funcional severo a longo prazo, que implica em um alto grau de dependência para realização das atividades de vida diária – AVDs (JORGUENSEN et al., 2000; MOYANO et al., 2010). Graças à chegada de novas terapias e tratamentos, a mortalidade ocasionada pelo AVC tem reduzido significativamente nos últimos anos. Isto deixa um número cada vez mais alto de sobreviventes com maior probabilidade de recorrência. Se para esta situação se adiciona que a população é mais idosa (pelo aumento da expectativa de vida), é gerado um importante impacto sanitário: uma maior propensão de apresentar risco de complicações associadas,

gravidade do quadro clínico e maior será o número de pessoas com déficits funcionais (JORGENSEN et al., 2000; FEIDY., 2002).

Mais da metade dos indivíduos com AVC apresentam comprometimento da função dos membros superiores - MMSS, afetando a independência nas AVDs. Déficits observados nos MMSS em indivíduos pós AVC podem estar relacionados à ruptura do controle sensoriomotor que inclui, por exemplo, comprometimentos na força (AVILA et al., 2013; SANTOS et al., 2016). A fraqueza muscular tem sido associada a estratégias compensatórias de movimento devido à lesão do córtex motor e suas vias de projeção descendente, redução da ativação e incoordenação muscular e modificações anatômicas no músculo esquelético, como alteração do fenótipo da fibra muscular, fibrose e atrofia.

A JNM tem papel na regulação da atividade contrátil dos músculos esqueléticos. Alterações na morfologia da JNM, tais como o tamanho do terminal nervoso e o número de zonas ativas, foram descritas em diferentes doenças (TINTIGNAC et al., 2015). Além disso, alguns estudos mostram que após o AVC, os músculos podem sofrer atrofia e fibrose, comprometendo ainda mais a execução dos movimentos.

Até agora, os estudos feitos evidenciaram os diferentes tipos de alterações que tanto o DM, como AVC, gera aos níveis musculares e de desempenho motor. Contudo, até o momento, não há estudos que correlacionem as mudanças estruturais ou funcionais que os diferentes componentes do tecido muscular têm com o desempenho motor avaliado mediante algum tipo de teste de tarefa motora. Há na literatura estudos que testaram o desempenho motor (tanto em seres humanos como em modelos animais das doenças), mas ainda não fizeram correlações específicas que mostrem a importância do tecido muscular (mais concretamente da junção neuromuscular) no desempenho motor em tarefas específicas com os membros superiores. Portanto, o objetivo deste projeto foi de descrever a plasticidade da placa motora em decorrência de DM e da isquemia cerebral em modelos animais com aprendizagem da tarefa de alcance.

Referências

- AVILA, M.A., ROMAGUERA, F., OLIVEIRA, A.B., CAMARGO, P.R., SALVINI, T.F. Bilateral impairments of shoulder abduction in chronic hemiparesis: electromyographic patterns and isokinetic muscle performance. **J. Electromyogr. Kinesiol: Official J. Int. Soc. Electrophysiol. Kinesiol.** 23: 712–720. 2013.
- BALCELLS, M. et al. El estudio Framingham. **Neurosci. And Hystory.** 4(1): 43-46, 2016.
- D'SOUZA, D, et al. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. **Front. In. Physiol.** 4: 1-7, 2013.
- FAHIM, M.A, et al. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in murine model of diabetes. **J Appl Physiol.** 89:2235-2240. 2000.
- FEYDY, A et al. Longitudinal study of motor recovery after stroke: recruitment and focusing of brain activation. **Stroke.** 33:1610-1617, 2002.
- GARCIA, C et al. Acetylcholinesterase deficiency contributes to neuromuscular junction dysfunction in type 1 diabetic neuropathy. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 303(4):E551-561. 2012.
- JORGENSEN H.S, et al. Functional and neurological outcome of stroke and the relation to stroke severity and type, stroke unit treatment, body temperature, age, and other risk factors: the copenhagen stroke Study. **Top Stroke Rehabil.** 6(1):1-19, 2000.
- MOYANO, A et al. El accidente cerebrovascular desde la mirada del rehabilitador. **Rev.Hosp.Clin.Univ.Chile.** 21:348-355, 2010.
- NUNES DE SENNA, P et al. Physical Exercise reverses spatial memory deficit and induces hippocampal astrocytes plasticity in diabetic rats. **Brain Res.** 1655:242-251. 2015.
- NUNES DE SENNA, P et al. Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier (BBB) in diabetic rat. **Brain Res.** 1618:75-82. 2015.
- RAMJI N, TOTTH C, KENNEDY J, ZOCHODNE DW. Does diabetes mellitus target motor neurons? **Neurobiol Dis.** 26:301–311. 2007.
- SOUAYAH ET AL. Motor unit number estimate as a predictor of motor dysfunction in an animal model of type 1 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** E602-E608. 2009.
- SANTOS, G., GARCÍA-SALAZAR, L,F., BRAGANÇA-SOUZA, M., OLIVEIRA, A,B., CAMARGO, P., RUSSO, T,L. Torque steadiness and muscle activation are bilaterally impaired during shoulder abduction and flexion in chronic post-stroke subjects. **J Electromyogr Kinesiol.** 30:151-160. 2016

TINGINAC L,A. BRENNER H,R., RUEGG, M.A. Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscular Wasting. **Physiol Rev.** 95(3) 809-852. 2015.

World Health Organization. Current topics about Diabetes Mellitus. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>; 2014. Acesso 21 Junho 2018.

World Health Organization – WHO, http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/, 2016. Acesso 30 Junho 2018.

ESTUDO 1

O desempenho na tarefa de alcance tem associação com as adaptações das junções neuromusculares em ratos com Diabetes Mellitus tipo 1 induzida.

Yisel Carolina Estrada-Bonilla, PhD^{a,c}, Paula Aiello de Souza-Tomé Castro, PhD^a, Genoveva Lourdes Flores Luna, PhD^a, Ana Beatriz Anjos Souza, MSc^a, Gracielle da Silva Santos, PT^a, Tania Fatima Salvini, PhD^a, Angela Merice de Oliveria Leal, PhD^b, Thiago Luiz Russo, PhD^a.

^aDepartamento de Fisioterapia (DFisio). Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Neurológica (LaFiN) - Cidade de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil. ^bDepartamento de Medicina (DMed). Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Cidade de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil. ^cGrupo de Pesquisa em Corpo, Sujeito e Educação. Universidade Santo Tomás. Programa de Cultura Física, Esporte e Lazer - Bogotá, D.C., Colômbia.

Autor de correspondência: Thiago Luiz de Russo. Departamento de Fisioterapia - DFisio. Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Rodovia Washington Luís, Km 235. Monjolinho. 13565-570. São Carlos, SP, Brasil. Telefone: 55 16 33066702. E-mail: russo@ufscar.br

Agradecimentos: Este projeto foi apoiado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: outorga 2013 / 21621-3). Y. C. Estrada-Bonilla foi bolsista de doutorado do Colfuturo/Colciencias e do apoio escolar da Universidade de Saint Thomas. P. A. Souza-Tomé e B. A. Souza foram bolsistas da FAPESP (subvenções 2015/21718-2 e 2016/09750-0, respectivamente). G. L. Flóres-Luna foi bolsista de doutorado do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

O desempenho na tarefa de alcance tem associação com as adaptações das junções neuromusculares em ratos com Diabetes Mellitus tipo 1 induzida.

Resumo.

Introdução: O desempenho do membro superior é afetado pelo Diabetes Mellitus (DM). A miopatia diabética causa atrofia do músculo esquelético. A Junção Neuromuscular (JNM) é uma estrutura fundamental para entender a relação entre desempenho e morfologia no DM.

Objetivo: Avaliar a plasticidade do NMJ no DM e sua relação com a destreza dos membros anteriores em ratos.

Métodos: Doze ratos Wistar, com 3 meses de idade, foram divididos nos grupos Controle (C) e DM. Os animais foram treinados na tarefa de alcance. Os seguintes procedimentos foram realizados: tarefa de habituação, determinação de dominância e treinamento na tarefa de alcance. O DM foi induzido usando Estreptozotocina. O desempenho neuromuscular da pata dianteira dominante foi avaliado na execução da tarefa de alcance um dia antes da indução do DM e cinco semanas após da mesma. Em seguida, foram extraídos os músculos envolvidos na tarefa de alcance (bíceps, tríceps, flexores e extensores dos dedos). Foram avaliadas as características morfométricas do JNM (área total, perímetro e feret). A área transversal da fibra muscular, assim como a porcentagem do tecido conjuntivo. O teste t de Student foi usado para comparações entre os grupos C e DM. A correlação de Tau-Kendall foi aplicada entre as variáveis nos indivíduos do grupo DM.

Resultados: Observa-se diminuição nos parâmetros morfométricos da JNM, assim como aumento da atrofia muscular nos músculos dos indivíduos do grupo DM comparado com C. Observa-se também um alto nível de correlação direta entre o valor médio da morfometria da JNM com a porcentagem de desempenho motor (na tarefa de alcance) no grupo DM.

Conclusão: O DM tipo 1 levou ao desenvolvimento de retrações da JNM, assim como a atrofia muscular e fibrose nos músculos da pata dianteira dominante relacionados ao desempenho motor avaliado.

Palavras-chave: Placa Motora, Junção Neuromuscular, Miopatia Diabética, Desempenho Motor, Tarefa de Alcance, Doenças Metabólicas, Diabetes Mellitus.

Destaques

- ✓ O Diabetes Mellitus pode levar ao desenvolvimento de miopatia diabética que causa atrofia e fibrose do músculo esquelético.
- ✓ A Junção Neuromuscular (JNM) é uma estrutura fundamental para entender a relação entre o desempenho motor do membro superior e a morfologia muscular em doenças metabólicas como o Diabetes Mellitus.
- ✓ O Diabetes Mellitus (DM) pode afetar o desempenho motor do membro superior.

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é definido como uma doença metabólica que causa hiperglicemia devido a alterações na liberação e/ou função da insulina. Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS, estima-se que 422 milhões de adultos estivessem vivendo com diagnóstico de DM (para 2014) em todo o mundo. Além disso, a prevalência aumentou mais rapidamente, especialmente em países de baixa e média renda, impactando negativamente os sistemas de saúde¹. Em relação à funcionalidade e independência nas atividades da vida diária, (não somente na execução da marcha)², mas também os déficits de alcance e manipulação são comprometimentos recorrentes vivenciados por pessoas diabéticas³.

Compreender a conexão entre o desempenho neuromuscular e o DM é um tema importante para a reabilitação. A miopatia diabética tem sido considerada como uma complicação comum do DM e está associada à falha na preservação da massa muscular (atrofia), aumento da fibrose⁴ e fraqueza muscular⁵. Além disso, a retração da junção neuromuscular (JNM) e as alterações eletrofisiológicas também podem suportar disfunção muscular^{6,7,8} e sinais precoces de neuropatia diabética⁹. Por outro lado, a relação da alteração da JNM devido ao DM e ao desempenho neuromuscular não é totalmente compreendida. Por exemplo, mudanças na transmissão neuromuscular dos músculos posteriores não foram relacionadas ao desempenho de Rota Rod em camundongos com DM tipo 1⁸.

Muita atenção tem sido dada às deficiências dos membros inferiores devido ao DM na literatura, porém muita menos atenção tem sido dada ao desempenho do membro superior. As tarefas de alcançar e agarrar compreendem movimentos fundamentais para a função do membro superior e requerem de destreza³. Além disso, considerando que esses movimentos são preservados entre as espécies¹⁰, estudos translacionais podem trazer informações importantes sobre as alterações

precoces de DM na função. Portanto, a presente pesquisa estudou a plasticidade da JNM devido ao DM tipo 1 e sua relação com a função da pata dianteira em ratos. Hipotetizou-se que as retrações da JNM devido ao DM tipo 1 possam estar correlacionadas com um pior desempenho nos ratos.

MÉTODOS

O estudo foi conduzido de acordo com o padrão internacional de experimentação animal após a aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento seguiu as recomendações das diretrizes do ARRIVE e está de acordo com o guia do National Institutes of Health para o cuidado e uso de laboratórios de animais.

Animais e desenho experimental

Foram utilizados 12 ratos Wistar, machos, com 3 meses de idade, alojados em gaiolas no biotereio do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (DFisio/UFSCar). Um ciclo claro /escuro de 12/12 h foi realizado, com acesso à água ad libitum. Os animais foram manipulados diariamente 2 a 3 semanas antes do experimento, e todos os procedimentos comportamentais foram realizados na mesma sala. Antes do início dos métodos comportamentais, os animais foram colocados em alimentação programada de 15g de ração de rato dada uma vez por dia (para assegurar que os ratos não ficassem sem fome no momento do treinamento). O peso de cada animal foi monitorado durante todo o estudo.

Em poucas palavras, os animais foram submetidos à câmera de treinamento durante 2 dias consecutivos (período de habituação), e depois mais 2-8 dias de procedimentos de determinação da dominância na tarefa de alcance para determinar a preferência da pata dianteira. Depois

disso, os animais foram treinados na tarefa de alcance (para atingir a porcentagem de desempenho motor) por 10 dias. Após o treinamento, ao -1 dia (pré-DM), os animais foram submetidos à avaliação do desempenho motor pela realização do teste funcional (teste da tarefa de alcance) e, 24 horas depois, submetidos à indução de DM (grupo DM, n= 6). Um dia antes da eutanásia, os animais realizaram um segundo teste funcional para avaliar novamente a função da pata dianteira dominante. Os animais foram eutanasiados 5 semanas após a indução de DM. Os animais do grupo controle (C) (n = 6) realizaram também os mesmos procedimentos, exceto pela indução do DM. Da mesma forma, determinou-se o número de animais considerando a variável área de JNM como o desfecho principal.

Habituação e Shapping (determinação da dominancia da pata dianteira).

Todos os animais foram submetidos a um período de habituação (de 20 minutos/dia) por 2 dias consecutivos em uma câmara de plexiglas (30 cm de comprimento por 35 cm de altura por 15 cm de largura) com janela estreita alta (1 cm de largura e 3 cm de altura). No centro da parede de 15 cm de largura. Para fazer o processo de shapping (o para determinar a dominancia no uso da pata dianteira), os animais foram colocados na mesma câmara de alcance por 20 min. Alí, os animais tinham que atingir com a pata dianteira, através de uma pequena janela, um pequeno pedaço de cereal – ou “pellet” (Froot-loops de Kellogg’s), colocado na frente da janela da Caixa de treinamento, sobre um bloco de acrílico, de aproximadamente 3 cm de altura. Os poços (sobre a base de acrílico) foram centrados com as bordas esquerda e direita da janela a uma distância de 1 cm da janela. Uma pequena haste de Plexiglas com aproximadamente 2 mm de diâmetro aderida à base da janela de alcance criou uma barreira que impedia que os animais raspassem os pellets na câmara e também reduziu as tentativas de usar a língua ou outra parte do corpo para recuperar os pellets. Quando cada animal tivesse atingido 20 tentativas consecutivas de alcance, foram realizadas, com a pata dianteira dominante em uma sessão de

20 minutos, pelo menos 20 tentativas de pegar o pellet disposto na base. A pata dianteira usada nestas tentativas foi identificado como o membro anterior preferido. Quando cada um dos animais atingiram esses critérios, o processo de shapping foi interrompido e o treinamento na tarefa de alcance antes da cirurgia foi iniciado^{11,12}.

Treinamento na tarefa de alcance

O treinamento na tarefa de alcance (pegar os pellets) foi realizada na câmara de alcance. Durante o treinamento, uma parede de Plexiglas foi inserida na câmara de alcance ipsilateral ao membro treinado do animal e os pellets foram colocados de modo que o animal pudesse pegar o pellet com a pata dianteira dominante. Esta parede força efetivamente aos animais a usar a pata dianteira dominante durante a execução da tarefa de alcance. Na concepção inicial do aparelho, a parede interna da câmara foi colocada a uma distância de 1,5 cm da janela de alcance.

O treinamento com a pata dianteira dominante foi realizado em todos os grupos de animais 10 dias antes da avaliação do desempenho por meio do testes da tarefa de alcance. Os animais foram treinados para fazer ou 30 tentativas e 18 sucessos ou treinamento em um tempo de corte (20 min – o que seja primeiro). O teste da tarefa de alcance consistia em que cada animal pegasse o pellet com sucesso e trazê-lo diretamente para a boca (sucesso), soltando o pellet antes de trazê-lo à boca, não agarrar o pellet após cinco alcances ou arrancando o pellet do poço.

Ao final de cada tentativa de alcance, um pellet era jogado na frente ou na parte de trás da câmara de alcance para “reposicionar” os animais e para que um novo pellet fosse colocado em no poço apropriado (na base de acrílico). Após a indução/sham do diabetes, os indivíduos dos grupos DM e C foram submetidos a um novo conjunto de treinamento, com as mesmas

características previamente descritas. Este período de treinamento foi realizado até atingir 2 semanas consecutivas. Depois de realizar o segundo teste funcional (da tarefa de alcance), não foi mais realizado o treinamento da tarefa.

Teste da tarefa de alcance

O teste da tarefa de alcance foi realizado um dia antes da indução do DM e 5 semanas depois da mesma (um dia antes da eutanásia). O desempenho de alcance foi calculado dividindo-se o número total de alcances com sucesso pelo número total de tentativas de alcance com a pata dianteira dominante $[(\text{total de sucesso} / \text{total de tentativas de alcance}) \times 100]$, o que corresponde à porcentagem de alcances com sucesso. O teste foi realizado durante 20 minutos¹³.

Indução do Diabetes Mellitus e Avaliação da Glicemia

Os animais do grupo DM receberam Estreptozotocina (STZ, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, em uma quantidade de 50 mg/kg, intraperitoneal), dissolvido em veículo (citrato de sódio) intraperitonealmente. Os animais do grupo C receberam apenas veículo (citrato de sódio intraperitoneal) segundo Morrow¹⁴. Após uma semana de realizar o processo de indução do DM, os ratos com um nível de glicose no sangue acima de 250 mg/dL foram considerados diabéticos e foram usados nos experimentos. A massa corporal e a glicemia de jejum foram determinadas semanalmente. As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal (em cada animal) e os níveis de glicose no sangue foram medidos pelo medidor de glicose Accu-Chek (Roche Diagnostic, Indianapolis, EUA).

Análise das Fibras Musculares – (Área de secção transversa das fibras musculares – AST)

Cortes histológicos seriados do tecido muscular, foram obtidos dos músculos bíceps, tríceps, flexores dos dedos e extensores dos dedos usando para fazê-los, um micrótomo criostato (Leica,

CM1860, Alemanha). Uma secção histológica (10 μm) corada com azul de toluidina foi selecionada para medir a AST sob um microscópio de luz (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha) usando software de análise morfológica (software Image J, versão 1.43u, National Institutes de Saúde, EUA). A AST de cada músculo foi obtida medindo 100 fibras localizadas na região central de cada secção de músculo. A porcentagem de tecido conjuntivo em cada músculo, foi avaliada usando a análise do software Image J, fazendo uma grade em uma foto de cada músculo, para então contar o número de intersecções da grade que caíram no tecido conjuntivo, para calcular a porcentagem de pontos dentro do período conjuntivo versus o número de pontos que a grade traçada tinha (número de pontos ou intersecções dentro do tecido conectivo/pontos ou intersecções da quadrícula x100).

Fibra Muscular CSA

Análise da Fibra Muscular – Área de Secção Transversa (AST)

Cortes histológicos seriados foram obtidos dos músculos bíceps, tríceps, flexores dos dedos e extensores dos dedos em um micrótomo criostato (Leica, CM1860, Alemanha). Uma secção histológica (10 μm) corada com azul de toluidina foi selecionada para medir a CSA sob um microscópio de luz (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha) usando software de análise morfológica (software Image J, versão 1.43u, National Institutes de Saúde, EUA). A AST de cada músculo foi obtida medindo 100 fibras localizadas na região central da secção. A porcentagem de tecido conjuntivo em cada músculo foi avaliada usando a análise de software de imagem J, fazendo uma grade em uma foto de cada músculo, para então contar o número de intersecções da grade que caíram no tecido conjuntivo, para calcular a porcentagem de pontos dentro do período conjuntivo versus o número de pontos que a grade traçada tinha (número de pontos ou intersecções dentro do tecido conectivo/pontos ou intersecções da quadrícula x100).

Coleção das Amostras Musculares

Os músculos bíceps, tríceps, flexores e extensores dos dedos foram isolados, removidos e pesados. Cada músculo foi dividido em duas partes (uma parte proximal e uma distal). O fragmento proximal foi imerso em solução de glutaraldeído e em seguida, foi utilizado para a técnica da colinesterase inespecífica. O fragmento distal de cada músculo foi utilizado para a morfometria histológica, fixado em isopentano e pré-resfriado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C , utilizado para mensurar a Área de Secção Transversal (AST) das fibras musculares e porcentagem de tecido conjuntivo.

Análise da Junção Neuromuscular (JNM)

As porções proximais do bíceps, tríceps, flexores e extensores dos dedos foram cortadas longitudinalmente em várias fatias. O material resultante foi submetido à técnica da Colinesterase inespecífica (ou técnica de Lehrer) para caracterizar a JNM. A área total, o perímetro total e o feret foram medidos em 30 junções com um microscópio de luz (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha). A área planar relativa de cada placa motora também foi calculada considerando a razão entre a área total/diâmetro maior previamente avaliados. As medidas foram analisadas com o software Image J (versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA).

Análise Estatística

Todas as variáveis (peso corporal total, glicemia total, desempenho atingido (% de sucesso), morfometria da JNM e a morfometria dos componentes musculares, mais a AST e a porcentagem do tecido conjuntivo) apresentaram distribuição normal e homogênea segundo os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para variáveis de peso corporal total, glicemia total, morfometria da JNM e a morfometria histológica do tecido muscular, a

comparação dos promedios foi realizado pelo teste t de Student, comparando os momento pré-DM com o momento 5 semanas pós-DM (após 5s), intra e intergrupos. Para variável de desempenho motor (% de sucesso), a comparação do promedio foi feita pelo teste t de Student, comparando os momentos de realização do teste -1d (um dia de pré-indução) e -1d (um dia antes da eutanásia - este último momento correspondente à tarefa de atingir o teste realizado 5 semanas após ter realizado a indução do diabetes - após 5s), dentro e entre os grupos também. Da mesma forma, dois tipos de correlações foram estabelecidas (com o coeficiente de correlação de Tau Kendall), da seguinte forma: a) entre a área e perímetro e o feret de JNM em cada músculo avaliado, nos indivíduos do grupo DM, com o teste de desempenho motor (% sucesso) realizado após 5 semanas após a indução do DM (após 5s) e b) entre a área, perímetro, e feret da JNM, em cada músculo avaliado, nos indivíduos do grupo DM, com características histológicas morfométricas avaliadas (AST e porcentagem de tecido conjuntivo) de cada músculo avaliado em indivíduos do grupo DM. A magnitude das correlações foi baseada na classificação de Munro (baixa (0,26 a 0,49), moderada (0,50 a 0,69), alta (0,70 a 0,89) e muito alta (0,90 a 1,00).

RESULTADOS

Glicemia e peso corporal total

Os grupos C e DM apresentaram valores semelhantes de glicemia ($p= 0.198$) e peso corporal total ($p= 0.922$) no momento pré indução do DM. O grupo DM aumentou os valores de glicemia ($p= 0.001$) e teve uma diminuição do peso corporal total ($p= 0.001$) no final do experimento em comparação com o momento pré indução do DM comparado com o grupo C ($p= 0.001$ e $p= 0.001$, respectivamente; Figura 1).

Porcentagem de desempenho motor

No momento pré indução do DM, ambos grupos, DM e C, apresentaram percentual semelhante de sucesso ($p= 0.922$; ver Figura 2). No entanto, duas semanas após a indução de DM, o grupo DM diminuiu seu percentual de sucesso quando comparado com os valores de controle ($p= 0.04$; Figura 2). Em relação às características qualitativas do desempenho motor avaliado, observou-se uma tendência geral nos indivíduos do grupo DM para realizar tarefas de alcance não coordenadas, com discreta dismetria e tremor.

Junção Neuromuscular - JNM

Os animais do grupo DM apresentaram sinais morfológicos claros de dispersão das JNMs que ficaram diminuídas em comparação aos indivíduos do grupo C. Além disso, a JNM apresentou forma mais alongada e mais fina nos animais com DM em comparação com a aparência típica de “pretzel” dos controles (Figura 3). A análise morfométrica mostrou uma diminuição na área total da JNM, no perímetro, no feret e na área relativa planar, em todos os músculos analisados, quando comparados ao controle (para mais informações, ver figura 3 e tabela 1).

Peso muscular, área transversal da fibra muscular e porcentagem do tecido conjuntivo

O peso muscular dos flexores dos dedos reduziu seus valores nos indivíduos com DM em relação aos indivíduos do grupo C. A Redução da AST da fibras musculares e o aumento da porcentagem de tecido conjuntivo foram observados em todos os músculos do DM em relação ao grupo C (Tabela 1).

Correlação entre parâmetros morfométricos da JNM e o desempenho motor (grupo DM)

Uma alta correlação positiva foi observada para a área média da JNM, assim como no perímetro e no feret com o percentual de sucesso durante a tarefa de alcance para todos os músculos

avaliados (por exemplo, quanto maior a área, perímetro ou feret, melhor foi o percentual de desempenho motor) (Tabela 2).

Correlação entre os parâmetros morfométricos da JNM e parâmetros morfométricos musculares.

Correlações de moderadas a altas foram observadas para a área média da JNM, perímetro e feret versus a AST das fibras musculares ou com o a percentagem de tecido conjuntivo para os músculos analisados. Correlações inversas foram observadas entre os parâmetros morfométricos da JNM e a porcentagem de tecido conjuntivo em todos os músculos. Por outro lado, foram encontradas correlações positivas entre as medidas da AST e JNM das fibras musculares para os bíceps, tríceps e flexores dos dedos (Tabela 2).

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou, pela primeira vez, que o DM induz retração da JNM na pata dianteira dominante de ratos. Essas modificações estão correlacionadas com o alcance e o desempenho da preensão em ratos. A diminuição da JNM já foi relatada nas patas posteriores. Ramji et al⁹ mostraram que alterações moleculares como o aumento do estresse oxidativo dos motoneurônios, estão associadas à perda de terminais distalmente suportados, refletindo os aspectos iniciais da neurodegeneração observados no DM. Alterações metabólicas nos mecanismos de potencial de membrana em repouso dos axônios, tais como atividade deficiente da bomba Na^+/K^+ -ATPase, ou velocidade de condução nervosa motora lenta, também poderiam explicar os déficits na ativação muscular nas fases iniciais no DM. Além disso, alterações ultraestruturais da JNM no músculo diabético, como túbulos T quebrados, diminuição do número de vesículas sinápticas e mitocôndrias inchadas com cristas irregulares, foram relacionadas a déficits na transmissão e função neuromusculares^{6,15}

Síntese, transporte e recepção de acetilcolina (ACh) são cruciais para a estrutura e função dos componentes da JNM^{16,17} e Agrin, uma glicoproteína que, juntamente com a glicoproteína MuSK, é responsável pelo agrupamento ou dispersão das fibras musculares. receptores de acetilcolina (AChR) em locais ativos da JNM. No DM, os Recetores de Acetilcolina (AChRs) estão pouco agrupados nas zonas ativas do MNJ¹⁷⁻¹⁹. Além disso, a eficiência da JNM também está relacionada ao número de cristas com forma de "pretzel"^{20,21}. O presente estudo descreveu a perda da forma típica de "pretzel" nas JNMs em todos os músculos investigados, o que sugere uma diminuição de cristas ou zonas ativas de agrupamento de AChRs.

Mais recentemente, foi demonstrado em animais que as populações de neurônios motores gamma estão diminuídas em 22 e 33 semanas de evolução do DM, respectivamente. Além disso, o DM provocou denervação do fuso muscular^{22,23}. Todos juntos, esses estudos podem contribuir para entender a fraqueza muscular observada no DM. A redução da força muscular como complicação do DM também foi relatada em humanos. A diminuição dos picos concêntrico e isométrico dos músculos do joelho e tornozelo em indivíduos diabéticos ocorreu mesmo antes do início da neuropatia diabética²⁴.

A literatura mostrou que modificações morfológicas da JNM ou trofismo muscular devido ao DM não apresentaram déficits no desempenho animal na hora de realizar testes funcionais, como o teste de Rota Rod. Supõe-se que mecanismos compensatórios, como o brotamento axonal para fibras musculares desnervadas e reinervadas, acontece para manter a função⁷. Por outro lado, Sabadine et al (2018 em prensa) mostraram recentemente que o DM prejudicou a habilidade de caminhar em ratos. O presente estudo subestimou estudos que investigaram os membros posteriores e mostraram que o DM prejudica o desempenho, traduzindo o modelo de DM induzido para clínica.

Em relação aos efeitos do DM no desempenho do membro superior, foi descrito que a força de preensão tem redução na população diabética, refletindo uma fraqueza muscular geral²⁵. Além disso, mostrou-se que os indivíduos com DM apresentaram alteração da coordenação dinâmica dos músculos intrínsecos durante a realização da tarefa de alcance. Os autores atribuíram essas alterações ao remodelamento muscular, padrões de disparo das unidades motoras alteradas e déficits nos mecanismos de retroalimentação por déficits sensoriais²⁶. Outros aspectos clínicos relatados são que a contratura de Dupuytren e o comprometimento do sentido vibro-tátil nas polpas digitais nos dedos, podem ocorrer em pacientes com DM e a maior duração do DM foi associada a mais graves dificuldades de neuropatia e desenvolvimento do indivíduo nas atividades da vida diária (AVD)²⁷.

Além disso, os resultados obtidos no estudo apresentado mostraram que os grupos musculares avaliados apresentam sinais de atrofia muscular associados ao desenvolvimento de DM. Foram investigados quatro grupos principais de músculos relacionados aos movimentos do membro anterior, contrastando com a literatura, que investigou um ou dois músculos no membro posterior. A literatura sugere que o DM de tipo insulino-dependente gera alterações estruturais e histológicas do tecido muscular esquelético, reconhecido como miopatia diabética. As mudanças mais relevantes são: a) redução da área de secção transversa – AST das fibras musculares, b) deslocamento do tipo cadeia miosina-pesada (conversão de fibras I para II), c) alterações do tipo conformacional e organizacional do colágeno em a matriz extracelular - MEC do tecido muscular, e aumento da quantidade de tecido conjuntivo (ou fibrose)²⁸⁻³⁰.

Os estudos citados também confirmam que a característica das alterações musculares na miopatia diabética podem se derivar diretamente ao desenvolvimento do estresse oxidativo, que se caracteriza por uma diminuição da capacidade reparadora das células satélites, gerando

desequilíbrio no processo de reparação dos tecidos conjuntivos, diminuição de proteínas reguladoras do processo de reparo tecidual (MyoD, miogenina e JunD), bem como diminuição na síntese de agentes vasodilatadores locais (especificamente, óxido nítrico - NO). Da mesma forma, também é evidente que, na presença de hiperglicemia, típica de miopatia diabética, quantidades importantes de Espécies Reativas de Oxigênio - EROs, que levam à síntese de metaloproteinases, explicam a degradação e/ou catabolismo do colágeno na MEC. Todos estes fatores juntos, desencadeados pelo estresse oxidativo são responsáveis pelas alterações estruturais e histológicas do tecido muscular³⁰.

Este estudo apresenta algumas limitações, por exemplo, a ausência de pesquisas feitas na área da fisiologia dos nervos periféricos, que não permitiu quantificar possíveis efeitos da neuropatia diabética. Além disso, as análises moleculares podem trazer importantes informações sobre a fisiopatologia das modificações da JNM no modelo de DM induzido. No entanto, como descrito anteriormente, nas primeiras 5 semanas do DM induzida, a miopatia diabética é mais acentuada do que a neuropatia.

Por fim, a relevância clínica deste estudo resultou de importantes correlações observadas entre o JNM, a atrofia muscular e a formação de fibrose e a obtenção do desempenho motor. Avaliações mais precisas dos movimentos dos membros superiores, especialmente de agarrar (tarefas manipulativas), podem trazer indícios dos primeiros sinais de neurodegeneração e miopatia associada ao DM. Além disso, os treinamentos específicos de força podem ser uma estratégia terapêutica interessante para evitar alterações deletérias morfológicas e funcionais. Em conclusão, o DM induzido parece ser um bom modelo para modificações iniciais no estudo. O DM induzido traz retrações morfométricas da JNM, atrofia muscular e fibrose nos músculos da perna anterior que podem se relacionar com o desempenho motor na tarefa de alcance.

Agradecimentos: Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2013/21621-3). YC Estrada-Bonilla foi bolsista de doutorado de Colfuturo/Colciencias (52844219/2016) e apoio à bolsa de estudos da Universidade Santo Tomás. PA Souza-Tomé e BA Souza foram bolsistas da FAPESP (bolsas 2015/21718-2 e 2016/09750-0, respectivamente). GL Flóres-Luna foi bolsista de doutorado do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Referências

1. World Health Organization. Current topics about Diabetes Mellitus. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>. Accessed 21 June 2018.
2. Volpato, S. (2012). Role of muscle Mass and Muscle Quality in the Association Between diabetes and Gait Speed. *Diabetes Care*. 35(8):1672-1679.
3. Gundmi, A et al. (2018). Hand dysfunction in type 2 diabetes mellitus: systematic review with meta-analysis. *Annals of physical and rehabilitation Medicine*. 61(2):99-104.
4. Sala D, Zorzano A. (2015). Differential control of muscle mass in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Cell. Mol. Life Sci*. 72(20):3803-3817.
5. Andersen, H. (2005). Decreased isometric muscle strength after acute hyperglycaemia in type 1 diabetic patients. *Diabet Med*. 22(10):1401-1407.
6. Fahim, MA. (2000). Early morphological remodeling of neuromuscular junction in murine model of diabetes. *J Appl Physiol*. 89:2235-2240.
7. Souayah, A. (2009). Motor unit number estimate as a predictor of motor dysfunction in an animal model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. E602-E608.
8. Garcia, C. (2012). Acetylcholinesterase deficiency contributes to neuromuscular junction dysfunction in type 1 diabetic neuropathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 303(4): E551-561.
9. Ramji N, Toth C, Kennedy J, Zochodne DW. (2007). Does diabetes mellitus target motor neurons? *Neurobiol Dis*. 26: 301–311.

10. Jones, T. (2017). Motor compensation and its effects on neural reorganization after stroke. *Nat Rev Neurosci.* 18(5): 267-280
11. Allred RP, Jones T. (2008). Maladaptive effects of learning with the less-affected forelimb after focal cortical infarcts in rats. *Exp Neurol.* 210(1): 172-181.
12. Adkins D, Voorhies A, Jones T. (2004). Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. *Neuroscience.* 128(3): 473-486.
13. Adkins, DL, et al (2015). Combining multiple types of motor rehabilitation enhances skilled forelimb use following experimental traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil. Neural Repair.* 29(10): 989–1000.
14. Fahim MA. (1998). Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice. *Anat Rec.* 251(2): 240-244.
15. Morrow TJ. (2004). Animal models of painful diabetic neuropathy: the STZ rat model. *Curr Protoc Neurosci.* 9-18.
16. Brandon EP. (2003). Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J Neurosci.* 23(2): 539-549.
17. Witzemann, V. (2006). Development of neuromuscular junction. *Cell Tissue Res.* 326(2): 263–271.
18. Dimitropoulou A, Bixby JL. (2005). Motor neurite outgrowth is selectively inhibited by cell surface MuSK and agrin. *Mol Cell Neurosci.* 28(2): 292-302.
19. Arber S, Burden SJ, Harris AJ. (2002). Patterning lost skeletal muscle. *Curr Opin Neurobiol.* 12(1): 100-103.
20. DeChiara TM, et al (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell.* 85(4): 501-512.
21. Colquhoun D, Sakmann B. (1998). From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels. *Neuron.* 20(3): 381-387.
22. Muramatsu, K. (2012). The size of motoneurons of the gastrocnemius muscle in rats with diabetes. *Neurosci Lett.* 531(2): 109-113.
23. Muramatsu, K. (2017). Effect of streptozotocin-induced diabetes on motoneurons and muscle spindles in rats. *Neurosci Res.* 115: 21-28.

24. Ferreira JP. (2017). The effect of peripheral neuropathy on lower limb muscle strength in diabetic individuals. *Clin Biomech.* 43: 67-73.
25. Cichosz L. (2018). Muscle grip strength is associated to reduced pulmonary capacity in patients with diabetes. *Prim Care Diabetes.* 12(1): 66-70.
26. Li H. (2018). Dynamical coordination of hand intrinsic muscles for precision grip in diabetes mellitus. *Sci Rep.* 8(1): 4365.
27. Cederlun S. (2009). Hand disorders, hand function and activities of daily living in elderly men with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications.* 23(1): 32-39.
28. Nunes de Senna, P, et al (2015). Physical Exercise reverses spatial memory deficit and induces hippocampal astrocytes plasticity in diabetic rats. *Brain Res.* 1655: 242-251.
29. Nunes de Senna, P, et al (2015). Physical training improves non-spatial memory, locomotor skills and the blood brain barrier (BBB) in diabetic rat. *Brain Res.* 1618: 75-82.
30. Grzeda E. (2008). Differentiations of the effect of NDMA on the spatial learning of rats with 4 and 12 weeks diabetes mellitus. *Acta Neurobiol Exp.* 68(3): 398-40

Legendas figuras.

Figura 1. *** $p < 0,01$. Pre DM: 1d antes da indução do DM. Após 5s: 5 semanas após a indução de DM.

Figura 2. * $p < 0,05$. C: Grupo Controle. DM: grupo Diabetes Mellitus. Pre DM: 1d antes da indução do DM. Após 5s: 5 semanas após a indução de DM.

Figura 3. Morfologia representativa da junção neuromuscular - músculos bíceps. (A) grupo controle; (B) grupo Diabetes Mellitus.

Tabela 1. Análise morfométrica da JNM, peso muscular normalizado, fibra muscular da área transversal da fibra muscular e percentual de tecido conjuntivo dos músculos Bíceps, Tríceps, Flexores e Extensores dos Dedos nos indivíduos dos grupos Diabetes Mellitus (DM) e Controle (C).

Parâmetros Morfométricos	Controle (C)	Diabetes Mellitus (DM)	P
Bíceps			
Promedio Área JNM (μm^2)	243.57 \pm 81.07	96.1 \pm 5.75*	0.001
Promedio Perímetro JNM (μm)	65.94 \pm 10.5	41.36 \pm 15.12*	0.003
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	24.97 \pm 37.6	15.82 \pm 72.37*	0.003
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	8.89 \pm 1.77	6.05 \pm 0.165*	0.002
Peso normalizado del músculo (%)	0.0007 \pm 0.0001	0.0006 \pm 0.0001	0.915
AST fibra muscular (μm^2)	199.65 \pm 18.94	125.80 \pm 10.45*	0.002
Tecido conectivo (%)	6.36 \pm 0.62	40 \pm 5.76*	0.001
Tríceps			
Promedio Área JNM (μm^2)	275.52 \pm 96.83	98.59 \pm 7.18*	0.001
Promedio Perímetro JNM (μm)	70.83 \pm 13.49	43.60 \pm 21.14*	0.0001
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	27.47 \pm 5.17	17.06 \pm 1.01*	0.03
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	9.04 \pm 1.64	5.96 \pm 0.17*	0.02
Peso normalizado del músculo (%)	0.003 \pm 0.0005	0.003 \pm 0.0007	0.274
AST fibra muscular (μm^2)	253.65 \pm 23.66	57.97 \pm 1.43*	0.001
Tecido conectivo (%)	5.30 \pm 0.54	50.60 \pm 2.29*	0.002
Flexor dos dedos			
Promedio Área JNM (μm^2)	217.97 \pm 78.10	99.21 \pm 6.65*	0.0001
Promedio Perímetro JNM (μm)	62.79 \pm 12.18	43.69 \pm 12.23*	0.02
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	24.48 \pm 4.89	16.70 \pm 3.26*	0.0001
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	7.93 \pm 1.30	6.16 \pm 0.41*	0.002
Peso normalizado del músculo (%)	0.0015 \pm 0.0001	0.0012 \pm 0.0001*	0.004
AST fibra muscular (μm^2)	70.33 \pm 7.03	64.35 \pm 2.81*	0.002
Tecido conectivo (%)	5.75 \pm 0.92	42.72 \pm 2.32*	0.001
Extensor dos dedos			
Promedio Área JNM (μm^2)	205.13 \pm 68.85	95.39 \pm 8.76*	0.001
Promedio Perímetro JNM (μm)	59.98 \pm 10.06	42.05 \pm 13.59*	0.0001
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	22.83 \pm 3.89	16.34 \pm 4.64*	0.0001
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	8.69 \pm 1.27	5.92 \pm 0.41*	0.002
Peso normalizado del músculo (%)	0.0005 \pm 0.0002	0.0004 \pm 0.0002	0.249
AST fibra muscular (μm^2)	84.11 \pm 5.19	15.24 \pm 20.07*	0.002
Tecido conectivo (%)	5.30 \pm 0.54	50.60 \pm 2.29*	0.001

*p <0,05 quando DM é comparado a C. NMJ, NMJ; CSA, área da seção transversal Os dados

são expressos como média \pm desvio padrão. Número de animais: 6 por grupo.

Tabela 2. Correlações entre: a) características morfométricas da JNM e desempenho motor no grupo com DM e entre: b) características morfométricas da JNM e características morfométricas dos músculos avaliados (AST fibras musculares e porcentagem de tecido conjuntivo) em indivíduos grupo DM.

Variables correlacionadas	Nível de correlação Tau Kendall level (T)
Biceps	
Promedio Área total da JNM Biceps vs % de desempenho motor	0.914*
Promedio Perímetro total da JNM Biceps vs % de desempenho motor	0.878*
Promedio Diâmetro maior da JNM Biceps vs % de desempenho motor	0.909*
Promedio Área total da JNM Biceps vs AST Biceps	0.795*
Promedio Perímetro total da JNM Biceps vs AST Biceps	0.781
Promedio Diâmetro maior JNM Biceps vs AST fibra muscular - Biceps	0.899*
Promedio Área JNM Biceps vs % de tecido conectivo – Biceps	-0.940*
Promedio Perímetro JNM Biceps vs % de tecido conectivo - Biceps	-0.911*
Promedio de Diâmetro maior JNM Biceps vs % de tecido conectivo Biceps	-0.943*
Triceps	
Promedio Área total da JNM area Triceps vs % de desempenho motor	0.958*
Promedio Perímetro total da JNM Triceps vs % de desempenho motor	0.845*
Promedio Diâmetro maior da JNM Triceps vs % de desempenho motor	0.965*
Promedio Área total da JNM Triceps vs AST Biceps	0.924*
Promedio Perímetro total da JNM Triceps vs AST Biceps	0.840*
Promedio Diâmetro maior JNM Triceps vs AST fibra muscular – Triceps	0.871*
Promedio Área JNM Triceps vs % de tecido conectivo – Triceps	-0.880*
Promedio Perímetro JNM Triceps vs % de tecido conectivo - Triceps	-0.787
Promedio Diâmetro maior JNM Triceps vs % de tecido conectivo Triceps	-0.776
Flexor dos dedos	
Promedio Área total da JNM flexor dos dedos vs % de desempenho motor	0.926*
Promedio Perímetro total da JNM flexor dos dedos vs % de desempenho motor	0.930*
Promedio Diâmetro maior da JNM flexor dos dedos vs % de desempenho motor	0.955*
Promedio Área total da JNM flexor dos dedos vs AST flexor dos dedos	0.832*
Promedio Perímetro total da JNM flexor dos dedos vs AST flexor dos dedos	0.842*

Promedio Diâmetro maior JNM flexor dos dedos vs AST fibra muscular – Flexor dos dedos	0.808*
Promedio Área JNM Flexor dos dedos vs % de tecido conectivo – Flexor dos dedos	-0.862*
Promedio Perímetro JNM Flexor dos dedos vs % de tecido conectivo – Flexor dos dedos	-0.985*
Promedio de Diâmetro maior JNM Flexor dos dedos vs % de tecido conectivo Flexor dos dedos	-0.843*
Extensor dos dedos	
Promedio Área total da JNM Extensor dos dedos vs % de desempenho motor	0.876*
Promedio Perímetro total da JNM Extensor dos dedos vs % de desempenho motor	0.944*
Promedio Diâmetro maior da JNM Extensor dos dedos vs % de desempenho motor	0.850*
Promedio Área total da JNM Extensor dos dedos vs AST Extensor dos dedos	0.726
Promedio Perímetro total da JNM Extensor dos dedos vs AST Extensor dos dedos	0.755
Promedio Diâmetro maior JNM Extensor dos dedos vs AST fibra muscular – Extensor dos dedos	0.686
Promedio Área JNM Extensor dos dedos vs % de tecido conectivo – Extensor dos dedos	-0.949*
Promedio Perímetro JNM Extensor dos dedos vs % de tecido conectivo – Extensor dos dedos	-0.907*
Promedio de Diâmetro maior JNM Extensor dos dedos vs % de tecido conectivo Extensor dos dedos	-0.928*

*p <0,05 comparações realizadas entre duas características no mesmo grupo (DM). Os dados são expressos em nível de correlação de Tao de Kendall (T). Número de animais: 6 por grupo.

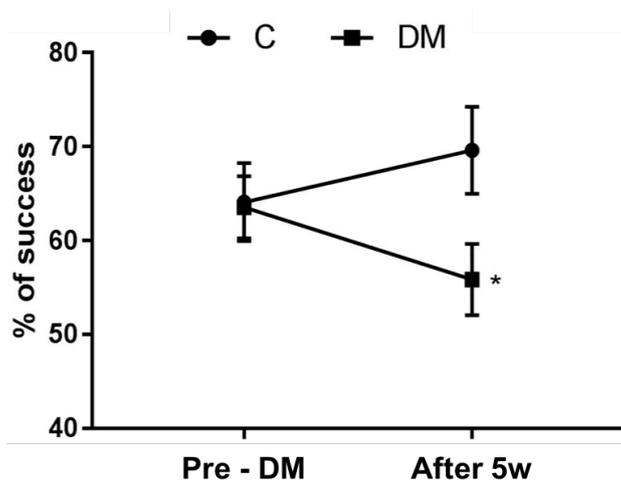


Figura 1. Porcentagem de sucesso na execução da tarefa de alcance. * $p < 0.05$ quando os resultados nos indivíduos do grupo DM são comparados com os resultados dos indivíduos do grupo C. Controle (C) e Diabetes Mellitus (DM); Pre-DM, momento antes da indução do DM; Após 5s: 5 semanas após indução do DM induction. Os dados são expressados levando em conta o promedio \pm desvio padrão. Número de animais: 6 por cada grupo.

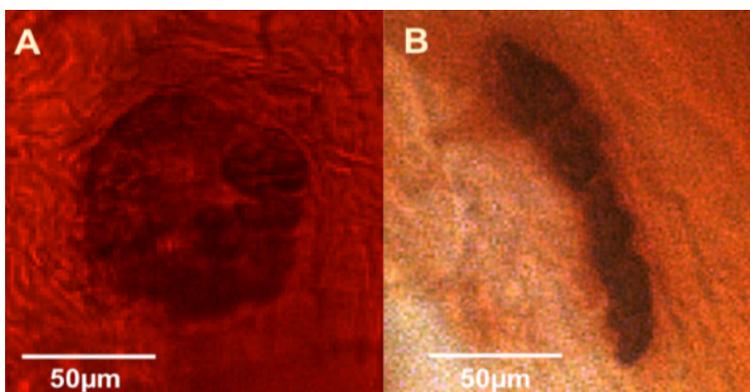


Figure 3. Morfologia Representativa da Junção Neuromuscular (JNM), com a técnica da colinesterase inespecífica (Músculo Biceps). (A) Grupo Controle; (B) Grupo Diabetes Mellitus. Escala da barra: 50 μ m.

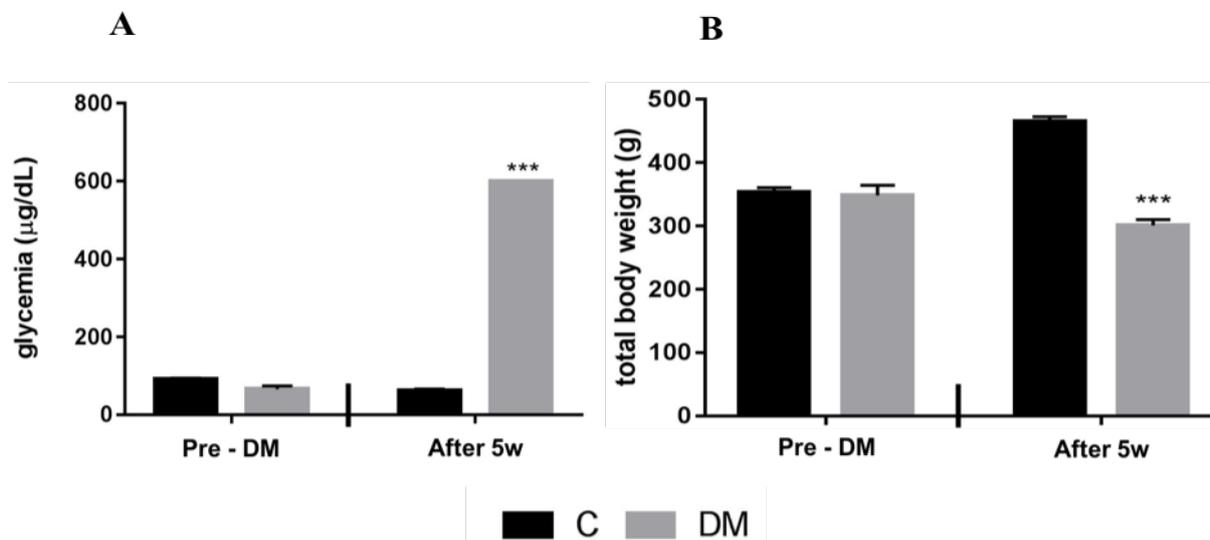


Figura 2. Valores promedio da glicemia total (A) e do peso corporal total (B) para os animais dos grupos Controle (C) e Diabetes Mellitus (DM). * $p < 0.05$ quando os resultados do grupo DM são comparados com os resultados do grupo C. Pre-DM: momento antes da indução do DM; após 5s: 5 semanas após indução do DM. Os dados são expressados como Promedio \pm Desvio padrão. Número de animais: 6 por grupo.

ESTUDO 2

Adaptações compensatórias da junção neuromuscular nos músculos da pata torácica dominante por isquemia focal cortical em ratos.

Yisel Carolina Estrada-Bonilla^{1,b}, Paula Aiello de Souza Tomé^a, Fernanda María Faturi^a, Rafaella Mendes Zambetta^a, Anna Carolyn Lepesteur-Gianlorenço^a, Gabrielle Crotti^a, Theresa A. Jones^c, Thiago Luiz Russo^a.

Acknowledgments:

O projeto teve suporte financeiro pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/21621-3). Y.C. Estrada-Bonilla teve bolsa de Doutorado pela Colfuturo/Colciencias, e comissão de estudos da Universidade Santo Tomás de Aquino (Bogotá, D.C – Colômbia). P.A.T Castro, R. M. Zambetta, and F. M. Faturi tiveram bolsa pela FAPESP (FAPESP 2015/21718-2, 2017/05499-4, and 2018/11537-9 respectivamente).

Resumo

Introdução: Os movimentos dos membros superiores são afetados em grande forma pela isquemia cerebral (IC). Mecanismos envolvidos na recuperação, mais os movimentos compensatórios podem se ver em vários estudos desenvolvidos tanto com modelos animais da isquemia como em estudos desenvolvidos com humanos.. No entanto, menos atenção é dada

¹Departamento de Fisioterapia – (DFisio)- Universidade Federal de São Carlos. Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Neurológica – LaFiN. São Carlos – Brasil.

^bCultura Física, Esporte e Lazer – Universidade Santo Tomás de Aquino. Grupo de pesquisa em Corpo, Sujeito e Educação. Bogotá, D.C., Colômbia.

^cDepartamento de Psicologia, Instituto de Neurociência, Universidade de Texas em Austin, Austin, TX, Estados Unidos de América.

ao tecido muscular esquelético, onde a junção neuromuscular (JNM) tem um papel importante no trofismo muscular e no desempenho funcional.

Métodos: Ratos Wistar Macho, de 3 meses de idade, foram divididos em dois grupos: Controle (C) e IC. Em seguida, foram capacitados para realizar a tarefa de recuperação de pellets individuais, seguindo procedimentos de habituação, shaping e tarefa de recuperação de pellet único. A IC foi induzida por meio de cirurgia estereotáxica para aplicação da endotelina-1 no córtex motor, representativo dos movimentos da pata dominante. O desempenho da tarefa de alcance foi avaliado pela tarefa de recuperação de pellets individuais um dia antes da indução da IC, e 4 e 15 dias após a indução da IC. Depois, os músculos bíceps, tríceps, flexores e extensores dos dedos foram extraídos. A JNM foi avaliada nas características morfométricas (área total, perímetro total e diâmetro máximo ou feret). A área transversal da fibra muscular - AST e a porcentagem de tecido conjuntivo também foram avaliadas para caracterização. O teste t de Student foi usado para comparações entre os grupos C e IC. A correlação de Tau Kendall foi aplicada entre as variáveis morfométricas musculares medidas no grupo IC.

Resultados: Um aumento em todos os parâmetros morfométricos da JNM, bem como aumento de atrofia e fibrose nos músculos analisados dos indivíduos do grupo IC comparado com C. Houve um alto nível de correlação direta entre o valor médio da morfometria da JNM com o percentual de sucesso na tarefa de alcance no grupo IC.

Conclusão: A IC induzida em ratos produz expansão compensatória da JNM, atrofia muscular e fibrose nos músculos analisados, envilvidos na execução da tarefa de alcance, relacionados ao desempenho motor.

Palavras-chave: Junção Neuromuscular, Isquemia Cerebral, Desempenho Motor, Isquemia Cerebral Induzida.

INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral - AVC é considerado a segunda causa de morte e a primeira causa de incapacidade em todo o mundo (OMS, 2016). Mais da metade dos indivíduos com AVC apresenta comprometimento da função dos membros superiores, afetando a independência nas atividades da vida diária (Jones, 2017). Déficits nos membros superiores observados em indivíduos pós-AVC podem estar relacionados à ruptura do controle sensório-motor que inclui, por exemplo, comprometimentos na força (Avila et al, 2013; Turner et al, 2012; Santos et al, 2016). Da mesma forma, a fraqueza muscular pos-AVC, tem sido associada a estratégias compensatórias de movimento devido à lesão do córtex motor e suas vias de projeção descendente, ativação muscular reduzida e incoordenação (Hattem et al, 2016; Niessen et al, 2008; Li et al, 2007), e as modificações anatômicas no músculo esquelético, como deslocamento do fenótipo da fibra muscular, fibrose e atrofia (Li et al, 2007; Raghavan, 2015; Lieber et al, 2002; Klein et al, 2010).

A Junção Neuromuscular (JNM), ou placa terminal motora, tem um importante papel na regulação da atividade contrátil dos músculos esqueléticos, pois transmite os potenciais de ação dos neurônios motores para as fibras musculares. Alterações na morfologia da JNM, assim como tamanho do terminal nervoso e número de zonas ativas, foram descritas em diferentes doenças (Tinginac et al, 2015). No entanto, não há informações disponíveis na literatura sobre como o AVC pode afetar a plasticidade da JNM.

Considerando que a lesão cerebral e a subsequente interrupção das vias que vão desde o músculo até os motoneurônios superiores causaram redução no número de unidades motoras nos membros superiores paréticos, a recuperação motora no pós-AVC está associada ao cruzamento das fibras do trato corticoespinhal (FTC), ou ao córtex motor intacto ao lado

denervado por acidente vascular cerebral da medula espinhal (Tinginac et al, 2015; Keisure et al, 2006). É razoável supor que a JNM pode ser alterada devido ao AVC. Além disso, demonstraram-se mecanismos compensatórios da JNM para manter a função e o desempenho durante o envelhecimento, como o aumento do comprimento da ramificação e da área total da membrana pós-sináptica (Walh et al, 2014).

Existem notáveis homologias nos padrões de movimento usados por roedores e humanos para realizar o alcance de tarefas de compreensão. Há também semelhança nas deficiências e nos padrões de movimentos compensatórios que resultam de danos unilaterais ao sistema motor, mostrando que modelos isquêmicos focais são importantes para estudos translacionais (Jones, 2017). Portanto, o objetivo deste estudo é descrever as modificações morfométricas da JNM, área de secção transversa do músculo – AST, e a proliferação do tecido conjuntivo em músculos que estão envolvidos em movimentos muito coordenados da extremidade anterior, como tarefa de alcance e apreensão, no modelo isquêmico cortical focal em ratos, bem como a associação dessas alterações morfométricas com o desempenho motor. As hipóteses levantadas neste estudo é que a isquemia cerebral pode gerar atrofia muscular, fibrose e expansão da JNM. Além disso, essas mudanças podem estar associadas com o sucesso na execução da tarefa de alcance e nas tarefas manipulativas.

METODOLOGÍA

O estudo foi conduzido de acordo com o padrão internacional de experimentação animal após a aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento seguiu as recomendações das diretrizes do ARRIVE e está de acordo com o guia do National Institutes of Health para o cuidado e uso de laboratórios de animais.

Animais e desenho experimental

Foram utilizados 12 ratos Wistar, machos, com 3 meses de idade, alojados em gaiolas do Biotereio do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Um ciclo claro/escuro de 12/12 h foi realizado com acesso dos animais à água ad libitum. Os animais foram manipulados diariamente 2 a 3 semanas antes do experimento, e todos os procedimentos comportamentais foram realizados na mesma sala. Antes do início dos métodos comportamentais, os animais foram colocados em alimentação programada de 15 g de ração de rato dada uma vez por dia (para assegurar que os ratos estivessem com fome no momento do treino). O peso corporal dos animais foi monitorizado durante todo o estudo.

Os animais foram submetidos à câmara de treinamento durante 2 dias consecutivos (período de habituação), e depois mais 2-8 dias de procedimentos de modelagem na tarefa de recuperação de pellet único para determinar a preferência do membro anterior (dominância). Depois, os animais foram treinados na tarefa de alcance por 10 dias. Após o treinamento, aos -1 dias (pré-indução da IC), os animais foram submetidos à avaliação do desempenho motor através da realização do teste funcional do membro anterior (teste de tarefa de alcance de pellet individualizado) e submetidos logo à cirurgia de indução da Isquemia Cerebral. Nos animais que não faziam parte do grupo Isquemia Cerebral (IC), foi realizado o processo de indução sham da Isquemia (com cirurgia estereotáxica), mas sem a aplicação da Endotelina 1. O teste funcional (teste de recolher pellet individualizado) foi realizado para cada um dos animais em mais dois momentos: três dias após a isquemia cerebral/sham IC, quatro dias após a indução/sham da IC (fase final da IC aguda) e um dia antes da eutanásia (correspondendo a 15 dias de isquemia cerebral/sham da IC).

Os grupos foram definidos da seguinte forma:

1) Grupo Isquemia Cerebral (Grupo IC) (n= 6): animais submetidos a todos os procedimentos, incluindo período de habituação, shaping (ou determinação de dominância) e período de treinamento e indução da IC.

2) Grupo controle (grupo C) (n= 6): animais submetidos aos procedimentos de habituação, shaping e período de treinamento da tarefa de alcance. Esses animais passaram por simulação de indução da IC. Todos os animais foram sacrificados 15 dias após a realização do segundo teste funcional da tarefa de alcance (recolher pellet individualizado).

Habituação e Determinação da dominância da pata torácica.

Todos os animais foram submetidos a um período de habituação (20 minutos/dia) por 2 dias consecutivos na câmara de treinamento, feita de plexiglas, com as seguintes dimensões: 30 cm de comprimento por 35 cm de altura e por 15 cm de largura, com janela estreita alta, de 1 cm de largura e 3 cm de altura; No centro da parede de 15 cm de largura. Para desenvolver o processo do shaping, os animais foram colocados na câmara antes descrita, realizando a tarefa de alcance por 20 min. Os animais deviam atingir com uma das duas patas dianteiras (ou torácicas) um pellet (FrootLoops – Kellog's®) através de uma pequena janela, colocados em um bloco na frente da janela da câmara de treinamento, com um tamanho de aproximadamente 3 cm de altura. O bloco tinha poços centrados, com as bordas esquerda e direita alinhadas da janela da câmara a uma distância de 1 cm da janela.

Uma pequena haste de Plexiglas com aproximadamente 2 mm de diâmetro aderida à base da janela (na câmara de treinamento) foi desenvolvida para criar uma barreira que impede a os animais de raspar os pellets dentro da câmara, reduzindo as tentativas do animal para usar a língua na recuperação dos pellets. Quando 20 tentativas consecutivas de alcance foram realizadas com uma das duas patas torácicas durante uma sessão de 20 minutos, a pata mais

usada (por 20 vezes consecutivas) na tentativa de pegar o pellet foi identificada como a pata dianteira dominante. Uma vez que os animais atingiam esses critérios, o processo de shaping pré-operatória era interrompida e o treinamento na execução na tarefa de alcance antes da cirurgia foi iniciado.

Treinamento na tarefa de alcance (o test de recuperação de pellets individualizado).

O treinamento na tarefa de recuperação de pellets individualizado foi realizado na câmara de treinamento. Durante o processo, uma parede de Plexiglas foi inserida na câmara, de forma ipsilateral ao membro treinado do animal (neste caso, a pata torácica dominante), e os pellets (FrootLoops – Kellog's®), foram colocados de forma que o animal pudesse pegar eles com a pata dianteira dominante. Este muro (a parede de Plexiglas) efetivamente força aos animais a usar a pata torácica dominante, escolhida pelo experimentador para a tarefa de alcance. Na concepção inicial do aparelho, a parede interna de Plexiglas da câmara foi colocada a uma distância de 1,5 cm da janela de alcance.

O treinamento com a pata torácica dominante foi realizado nos dois grupos de animais (C e IC) 10 dias antes da avaliação da tarefa de alcance por meio do teste de recuperação de pellet individualizado. Os animais foram treinados tanto para 30 tentativas ou um tempo de corte de 20 min, (o que aconteça primeiro). O teste de alcance consistiu em que o animal pudessem pegar o pellet com sucesso e trazê-lo diretamente para a boca (considerando isto como sucesso), soltando o pellet antes de trazê-lo à boca, não agarrar o pellet após cinco alcances ou arrancando o pellet do poço (considerando estes movimentos como tentativas). Ao final de cada tentativa de alcance, um pellet era jogado na frente na parte traseira da câmara de treinamento para “reposicionar” os animais e para que um novo pellet fosse colocado em seu poço apropriado. Após a indução/sham da IC, nenhum treinamento adicional, na tarefa de alcance, foi realizado.

Teste de recuperação de pellet individualizado.

O teste de recuperação de pellet individualizado foi realizado no dia -1 (antes da indução/sham da IC), 3 dias após a indução/sham da IC, quatro dias após a indução/sham da IC (final da fase aguda da IC) e 14 após a realização do terceiro teste de recuperação de pellet individualizado. O desempenho motor obtido na execução da tarefa de alcance foi calculado dividindo-se o número total de alcances com sucesso pelo número total de tentativas de alcance com a pata torácica dominante $[(\text{total de sucesso} / \text{total de tentativas de alcance}) \times 100]$, o que corresponde ao percentual de alcances com sucesso. O teste foi realizado durante 20 minutos segundo as recomendações dadas para a prova (Adkins et al, 2015).

Cirurgia - indução da IC.

Foi criada uma lesão unilateral focal na área de representação da pata torácica dominante no córtex sensório-motor (CME) contralateral à pata dianteira dominante. Os animais foram anestesiados utilizando injeção intraperitoneal de xilazina (12 mg/kg) e cetamina (95 mg/kg) e colocadas no aparelho de cirurgia estereotáxica. Uma incisão mediana mais craniotomia foram realizadas entre 2,5 mm anterior, 0,5 mm posterior e 3,0 a 4,5 mm lateral ao Bregma. A pia-máter foi exposta pela remoção da dura-máter na área subjacente à craniotomia. Endotelina-1 (ET-1, 80 mM, 0,2 mg/mL; 8 mL de volume total administrado), um peptídeo indutor de vasoespasmos, foi administrado topicamente com uma pipeta de volume de 10 µl por 10 minutos antes da pele ser suturada. Durante toda a cirurgia, a temperatura do animal foi controlada utilizando uma almofada de calor. Foi permitido aos ratos 4 dias de recuperação antes do início da manipulação comportamental no pós-operatório (Adkins et al, 2004).

Coleção de Amostras de Tecido Muscular.

Os músculos bíceps (B), Tríceps (T), Flexores dos dedos (FF) e Extensores dos dedos (FE) foram isolados, removidos e pesados. Cada músculo foi dividido em duas partes. O fragmento proximal de cada músculo foi imerso em solução de glutaraldeído e em seguida foi utilizado para a técnica da colinesterase inespecífica (técnica de Lehrer, 2007). O fragmento distal de cada músculo foi usado para morfometria histológica, pré-resfriado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C , e então, usado para medir tanto a área da seção transversal (AST) das fibras musculares e % de tecido conjuntivo.

Morfologia cerebral.

O cérebro foi removido de cada animal e logo foi colocado em solução fixadora de paraformaldeído por 24 horas, para logo ser colocado em uma solução de sacarose e mantido em refrigeração. Cortes histológicos (de $30\ \mu\text{m}$ de espessura) da área do córtex motor lesionado foram confeccionados e corados com corante Nissl (cresil violeta) sendo utilizados para confirmar a lesão isquêmica. Apenas os animais que apresentaram dano cortical focal na morfologia foram incluídos nos análises realizados no estudo. Cada uma das folhas de tecido cerebral obtidas após a aplicação da técnica de Nissl, foi digitalizada usando o dispositivo scanner histech 3D, usando software de visualização panorâmica para editar as imagens obtidas.

Área de Seção Transversa da Fibra Muscular – AST e percentagem de tecido conjuntivo.

Cortes histológicos seriados foram obtidos dos músculos Bíceps, Tríceps, Flexor e Extensor dos dedos usando um micrótomo criostato (Leica, CM1860, Alemanha). Uma seção histológica (de $10\ \mu\text{m}$ de espessura) corada com azul de toluidina foi selecionada para medir a AST sob um microscópio de luz (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha) usando análise morfométrica (software Image J, versão 1.43u, National Institutes of Saúde, EUA). A AST de

cada músculo foi obtida medindo 100 fibras localizadas na região central de cada fatia de músculo desenvolvida. A porcentagem de tecido conjuntivo em cada músculo analisado, foi avaliada usando a análise de software de imagem (Image J), fazendo uma grade para cada foto de cada músculo, para então contar o número de interseções da grade que caíram no tecido conjuntivo, calculando a porcentagem de pontos dentro do período conjuntivo versus o número de pontos que a grade traçada tinha (número de pontos ou interseções dentro do tecido conectivo/pontos ou interseções da quadrícula x100).

Análise da Junção Neuromuscular (JNM) - Técnica da Colinesterase Inespecífica.

As porções distais dos músculos Bíceps (B), Tríceps (T), Flexor dos dedos (FF) e Extensor dos dedos (FE), foram preparadas para a detecção da JNM, sendo cada porção distal (em cada músculo) cortada longitudinalmente em três ou quatro fatias. O material resultante foi submetido à técnica de Colinesterase inespecífica (técnica de Lehrer) para caracterizar a JNM.

Análise Morfométrica do tecido muscular

Os valores promedio da área e perímetro total e o diâmetro maior, foram medidos em 50 JNM com um microscópio de luz (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha). A área planar relativa de cada JNM, também foi calculada levando-se em consideração a razão entre a área total/ diâmetro maior previamente avaliada. As medidas foram analisadas com o software Image J (versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA) (Adkins et al, 2004; Allred et al, 2005).

Análise Estatística.

Todas as variáveis (peso corporal total, tarefa de alcance - % de sucesso, morfometria da JNM e morfometria muscular – AST, % de tecido conjuntivo), apresentaram normalidade e

distribuição de homogeneidade, segundo os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para as variáveis de peso corporal total, morfometria da JNM e a morfometria histológica do tecido muscular, a comparação de médias foi aplicada pelo teste t de Student, comparando momento pré IC/sham e 15 dias pós indução/sham IC (após 15d), de forma intra e intergrupar. Para a variável de desempenho motor (% de sucesso), a comparação de médias foi feita pelo teste t de Student, comparando momentos de desempenho motor -1d pré-indução IC) e 3 dias pós cirurgia de indução da IC (após 3d IC). Este último momento também foi comparado com o momento 15 dias após indução da IC (15d após IC), de forma intra e intergrupar, como já foi antes descrito. Também foram desenvolvidos dois tipos de correlações (usando o coeficiente de correlação de Tau Kendall): a) entre o promedio da área, do perímetro e do diâmetro maior em cada músculo avaliado (nos indivíduos do grupo IC, com o valor promedio do desempenho motor (% sucesso) obtido no teste da tarefa de alcance realizado após 15 dias pós-indução da IC (após 15d IC) e b) entre promedio da área, do perímetro e do diâmetro maior da JNM, em cada músculo avaliado (nos indivíduos do grupo IC) com as características histológicas morfométricas avaliadas (AST e % de tecido conjuntivo) de cada músculo avaliado, nos indivíduos do grupo IC. A magnitude das correlações foi baseada na classificação de Munro sendo uma correlação baixa de 0.26 a 0.49, moderada de 0.50 a 0.69, alta de 0.70 a 0.89 e muito alta de 0.90 a 1.00) (Munro, 2001).

RESULTADOS

Peso corporal total.

Os indivíduos dos grupos C e IC apresentaram valores semelhantes de peso corporal total comparando primeiro e segundo momento (pré e pós IC) de avaliação (3d após IC; $p=0,201$) e comparando segundo momento (3d após IC) com terceiro momento de avaliação (15d após IC; $p=0,198$; Fig. 1).

Cirurgia de indução da Isquemia Cerebral (dano cortical focal induzido).

Os animais do grupo IC foram submetidos à isquemia encefálica, com a aplicação de ET-1, apresentando dano cortical na morfologia cerebral (Fig. 3). A ET-1 produziu infartos focais confiáveis com morte neuronal no córtex motor primário (M1) e no secundário (M2), assim como também no córtex somatossensorial primário. Os animais do grupo C foram submetidos apenas à cirurgia estereotáxica sem aplicação de ET-1 (fazendo um sham de isquemia cerebral induzida) (Figura 2).

Desempenho Motor.

No momento da indução da IC (momento pré-IC) os indivíduos em ambos grupos (IC e C) apresentaram porcentagem semelhante de sucesso alcançado ($p=0,201$; Figura 4). No entanto, 3 dias após a indução da IC, no grupo IC diminuiu-se sua porcentagem de sucesso no desempenho motor, em comparação com os valores obtidos nos indivíduos do grupo controle ($p=0,0001$; Fig 3). Da mesma forma, quando comparamos o percentual de sucesso obtido pelo grupo IC no terceiro momento de avaliação da tarefa de alcance (15d após IC), embora uma leve melhora seja observada nos mesmos indivíduos, a porcentagem diminuiu mesmo em comparação ao grupo controle ($p=0,0001$; Fig 4). Fazendo uma breve descrição das características qualitativas da tarefa de alcance (nos indivíduos do grupo IC), observa-se principalmente no terceiro momento de avaliação, compensações como a tentativa de alcançar o pellet com a outra pata dianteira (a pata torácica não dominante) como trazer a cabeça e boca para a janela da caixa de treinamento, para tentar alcançar o pellet. O movimento de alcance exibido no grupo IC evidencia dismetria e bradicinesia.

Morfología da JNM.

Os animais do grupo IC apresentam sinais morfológicos claros de expansão das JNMs (ou JNMs aumentadas), comparado com os resultados observados nos indivíduos do grupo C. Além disso, as JNMs apresentaram formas mais robustas e maiores, com uma perda da forma típica de “pretzel” (comparado com as JNMs do grupo C) (Fig 3). A análise morfométrica mostrou um aumento na área total da JMM, perímetro, e o Diâmetro Maior ou total (feret) assim como a área relativa planar em todos os músculos avaliados quando comparados aos músculos avaliados nos indivíduos do grupo C (Tabela 1).

Peso muscular, área transversal da fibra muscular - AST e porcentagem de tecido conjuntivo.

O peso muscular dos flexores dos dedos reduziu seus valores no grupo IC em relação aos valores do mesmo músculo no grupo C (Tabela 1). Uma redução da AST da fibra muscular e o aumento da porcentagem de tecido conjuntivo foram observadas em todos os músculos dos indivíduos do grupo IC em relação aos valores avaliados nos indivíduos do grupo C (Tabela 1).

Correlação entre os parâmetros morfométricos da JNM e o desempenho motor no grupo IC.

Uma alta correlação positiva foi observada para os valores por meio de área, perímetro e o diâmetro maior (ou feret) da JNM com a porcentagem de sucesso durante a execução da tarefa de alcance para todos os músculos avaliados (Tabela 2). Por exemplo, quanto maior a área, perímetro ou feret, melhor o desempenho motor amostrado.

Correlação entre os parâmetros morfométricos da JNM e parâmetros morfométricos musculares.

Correlações inversas moderadas a altas foram observadas para os valores promedio de área perímetro e diâmetro maior (ou feret) da JNM versus a AST das fibras musculares em todos os músculos avaliados. Correlações positivas a moderadas a altas foram observadas para os valores promedio da área média, perímetro e diâmetro maior (ou feret) versus a porcentagem de tecido conjuntivo em cada músculo avaliado (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Uma questão importante observada neste estudo foi a expansão da JNM dos músculos da pata torácica dominante após o início da isquemia focal cortical induzida por ET-1. De forma importante, a área, perímetro e diâmetro maior (ou feret) da JNM apresentaram correlações positivas no desempenho de alcance e apreensão. Esses resultados forneceram insights sobre os mecanismos compensatórios neuromusculares que tem como função garantir o desempenho do membro anterior durante o desenvolvimentp de atividades que exigem coordenação.

Foi descrito que a agrina, uma glicoproteína importante para garantir a estabilidade, número e agrupamento de receptores de acetilcolina (AChR) na membrana pós-sináptica, aumenta na fase aguda e subaguda da isquemia cerebral (Carin-Levi et al, 2006; Scherbakov et al, 2011; Scherbakov et al, 2016). Este aumento foi interpretado como um mecanismo compensatório do sistema nervoso central (SNC), devido a reduções nos inputs do SNC, para garantir a atividade muscular. No entanto, essa tentativa de compensar distúrbios do SNC não é suficiente. Por exemplo, a proporção de AChRs ativados não foi distribuída regularmente nas cristas ativas da JNM, com lacunas de áreas não-ativas (Engel, 2004). Essa irregularidade na distribuição do AChR geraria perda de eficiência do drive neuronal; em outras palavras, apesar de ter mais

AChRs ancorados na membrana pós-sináptica, muitos deles são disfuncionais (Carin-Levy et al, 2006; Schebakov et al 2011).

Além disso, o aumento de AChRs em cristas ativas e não ativas foi associado à expansão da JNM (Carin-Levy et al., 2006; Engel e Alm, 2004). No entanto, uma maior JNM perde suas evaginações típicas de "pretzel" (Engel, 2004). Tais modificações observadas nos modelos pós-IC são muito semelhantes às dos modelos de envelhecimento (para revisão, ver Tintgnac). Portanto, considerando o aumento da JNM e as correlações com o status funcional observadas neste estudo, é possível supor que mecanismos compensatórios similares estão ocorrendo.

Outro importante resultado observado neste estudo está relacionado à atrofia muscular e aumento da proliferação de tecido conjuntivo nos músculos da pata torácica dominante, devido à isquemia focal cortical. Este é o primeiro estudo que leva em conta o relato das alterações musculares esqueléticas no membro anterior no final da isquemia cerebral devido à ET-1. Além disso, o aumento da atrofia e fibrose da fibra muscular, nos músculos avaliados associou-se a pior desempenho funcional na execução do teste de recolher o pellet individualizado. Um estudo recente descreveu atrofia muscular nas patas traseiras, 3 dias após isquemia cerebral (60 minutos da oclusão da artéria cerebral média, OACM) no membro parético em camundongos e déficits sensório-motores graves durante a execução da marcha dos animais (Chleboun et al, 2001). A atrofia dos músculos das patas traseiras também foi observada usando o mesmo modelo de isquemia cerebral aos 7 dias pós-lesão (Thompson, 2002). Os valores reduzidos da AST podem ser considerados o gatilho da atrofia muscular.

Mais recentemente, o conceito de sarcopenia relacionada à IC foi criado para diferenciar da sarcopenia observada no envelhecimento. Em resumo, há um rápido declínio da massa

muscular com alterações estruturais (atrofia, fibrose, deslocamento muscular em direção às fibras de contração rápida) e déficits funcionais devido à lesão cerebral (Schebakov et al, 2016). A atrofia do músculo esquelético ocorre como resultado do desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos, sendo a principal via de degradação das mioproteínas é a via da ubiquitina-proteassoma (Bonakdo et al, 2013; Sandri, 2008). Vias anabólicas e fatores neurotróficos também parecem estar comprometidos. Tanto os níveis séricos do fator de crescimento 1 (IGF-1) como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) estão diminuídos em pacientes pós-AVC crônicos (Santos et al, 2016; Silva-Couto et al, 2014).

Além disso, a fibrose é caracterizada pelo acúmulo anormal de elementos da matriz extracelular (MEC) do tecido (neste caso, do tecido muscular) e também pode interferir na função (Lieber et al, 2013). A citocina fator de crescimento transformador-alfa (TGF-alfa) tem sido considerada como a chave mestra para a indução de fibrose. O aumento na expressão de TGF-alfa 1 é seguido pelo aumento de colágeno nos músculos desnervados (Zhang et al, 2008). Além disso, a miostatina, membro da superfamília do TGF-alfa (Lieber et al, 2013; Costamagna et al, 2015; Snijders et al, 2015; Triandafilou et al, 2012) é capaz de regular o crescimento muscular esquelético e induzir a fibrose.

As adaptações do músculo esquelético em membros superiores de humanos com hemiparesia também foram descritas. A atrofia muscular pode se caracterizar segundo Ploutz-Snyder et al, 2012; Berenpas et al, 2017, por uma alta rigidez e aumento da quantidade de tecido fibroso e adiposo (Lee et al, 2015; Ploutz-Snyder et al, 2012). Considerando que a isquemia cortical focal induzida pela ET-1 foi capaz de induzir proliferação de tecido conjuntivo no endomísio e perimísio, atrofia muscular e comprometimento neuromuscular em tarefas coordenadas da pata torácica dominante, o modelo de ET-1 parece apresentar uma boa interface translacional. No

entanto, estudos futuros devem se concentrar em biomarcadores moleculares para entender a fisiopatologia do músculo esquelético neste modelo de doença.

Como limitações deste estudo, não foi realizada a identificação de processos de estabilidade de proteínas e regulação da JNM, o que poderia confirmar de forma biomolecular, a expansão (morfométrica) das junções neuromusculares avaliadas. Da mesma forma, a análise do tecido cerebral não foi realizada além da simples confirmação da isquemia cerebral induzida. Análises moleculares e neurofisiológicas também podem trazer informações importantes sobre os resultados atuais.

Em conclusão, a isquemia cerebral focal induziu um aumento no tamanho das JNMs, compensatoria aos processos de diminuição do desempenho motor, o pela aparição de movimentos compensatorios da pata torácica dominante na hora da execução da tarefa de alcance. A expansão da JNM vem acompanhada de atrofia das fibras musculares e fibrose nos músculos da pata dianteira parética. Essas alterações estão relacionadas ao desempenho neuromuscular em movimentos bem coordenados realizados pela pata torácica dominante. O presente estudo reforçou aspectos importantes para o entendimento dos mecanismos compensatórios para função da pata dianteira dominante frente à execução de tarefas manipulativas.

REFERÊNCIAS.

- Adkins D, Voorhies A, Jones TA. (2004). Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. *Neuroscience*. 128(3): 473-486.
- Adkins, DL, Ferguson L, Lance S, Pevtsov A, McDonough K, Stamschror J, Jones TA, Kozlowski DA (2015). Combining multiple types of motor rehabilitation enhances skilled forelimb use

following experimental traumatic brain injury in rats. *Neurorehabil. Neural Repair* 29(10): 989–1000.

- Avila, M.A., Romaguera, F., Oliveira, A.B., Camargo, P.R., Salvini, T.F. (2013) Bilateral impairments of shoulder abduction in chronic hemiparesis: electromyographic patterns and isokinetic muscle performance. *J. Electromyogr. Kinesiol: Official J. Int. Soc. Electrophysiol. Kinesiol.* 23: 712–720.
- Berenpas, F., Martens, A.M., Weerdesteyn, V.G.M., Geurts, A.C.H., Alfen, N. (2017). Bilateral changes in muscle architecture of physically active people with chronic stroke: A quantitative muscle ultrasound study. *Clin Neurophysiol.* 128(1): 115-122. 2008.
- Bonaldo, P., Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms.* 6(1): 25-39.
- Carin-Levy, G., Greig, C., Young, A., Lewis, S., Hannah, J., Mead, G (2006). Longitudinal Changes in Muscle Strength and Mass after Acute Stroke. *Cerebrovasc Dis.* 21: 201-207.
- Chleboun, G., France A, Crill M., K Braddock H, Howell J (2001). In vivo measurement of fascicle length and pennation angle of the human biceps femoris muscle. *Cells Tissues Organs.* 169: 401-409.
- Costamagna, D., Costelli, P., Sampaolesi, M., Pennsa, F (2015). Role of inflammation in muscle homeostasis and myogenesis. *Mediators of inflammation.* 1-14.
- Engel, A (2004). The Neuromuscular Junction. In: *Myology.* 2nd edition. McGraw Hill. New York. 209-255.
- Hatem SM, Saussez G, Della Faille M, et al. (2016). Rehabilitation of motor function after stroke: a multiple systematic review focused on techniques to stimulate upper extremity recovery. *Front Hum Neurosci.* 10: 442.
- Jones, T. (2017). Motor compensation and its effects on neural reorganization after stroke. *Nat Rev Neurosci.* 18(5): 267-280.

- Keisure, A., Osamu, I., Yasumitsu, I., Toru, M., Ichiro, S., Akira, H., Ryosuke, U (2006). Reduction in the motor unit number estimate (MUNE) after cerebral infarction. *J Neurol Sci.* 1;250(1-2): 27-32.
- Klein CS, Brooks D, Richardson D, McIlroy WE, Bayley MT (2010). Voluntary activation failure contributes more to plantar flexor weakness than antagonist coactivation and muscle atrophy in chronic stroke survivors. *J Appl Physiol.* 109: 1337–1346.
- Lee SM, Spear S, Rymer WZ (2015). Quantifying changes in material properties of stroke-impaired muscle. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 30(3): 269-275.
- Li L, Tong KY, Hu, X (2007). The effect of poststroke impairments on brachialis muscle architecture as measured by ultrasound. *Arch Phys Med Rehabil.* 88: 243-250.
- Lieber RL, Fridén J (2004). Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture. *Muscle Nerve.* 23: 1647-1666.
- Lieber, R.L., and Ward, S.R (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis - Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *Am J Physiol* 305 - C241-C252.
- Munro, B.H. Correlation. (2001). In: Munro BH. *Statistical methods for health care research.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott. 223-243.
- Niessen M, Janssen T, Meskers C, Koppe P, Konijnenbelt M, Veeger D (2008). Kinematics of the contralateral and ipsilateral shoulder: a possible relationship with post-stroke shoulder pain. *J [7] Rehabil Med.* 40(6): 482-486.
- Ploutz-Snyder, L.L., Clark, B.C., Logan, L, Turk, M (2012). Evaluation of spastic muscle in stroke survivors using magnetic resonance imaging and resistance to passive motion. *Arch Phys Med Rehabil.* 87(12): 1636–1642.
- Raghavan P (2015). Upper limb motor impairment post stroke. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 26(4): 599–610.
- Ryan AS, Dobrovolny CL, Smith GV, Silver KH, Macko RF (2012). Hemiparetic muscle atrophy and increased intramuscular fat in stroke patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 83(12): 1703–1707.
- Sandri, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy (2008). *Physiology.* 23(3): 60-170.

- Santos, G., García-Salazar, L.F., Bragança-Souza, M., Oliveira, A.B., Camargo, P., Russo, T.L (2016). Torque steadiness and muscle activation are bilaterally impaired during shoulder abduction and flexion in chronic post-stroke subjects. *J Electromyogr Kinesiol.* 30: 151-160.
- Scherbakov, N., Knops, M., Ebner, N., Valentova, M., Sadek, A., Gritter, U., Dahinden, P., Hettwer, S., Schefold, J.C., Von Haehling, S., Anker, S.D., Joebges, M., Doehner, W (2016). Evaluation of C-terminal Agrin fragment as a marker of muscle wasting in patients after acute stroke during early rehabilitation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 7(1): 60-67.
- Scherbakov, N., Doehner, W (2011). Sarcopenia in stroke facts and numbers on muscle loss accounting for disability after stroke. *J cachexia Sarcopenia muscle.* 2(1): 5-8.
- Silva-Couto M.A., Prado-Medeiros, C.L., Oliveira, A.B (2014). Muscle Atrophy, Voluntary Activation Disturbances, and Low Serum Concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 Are Associated With Weakness in People With Chronic Stroke. *Phys Ther.* 94(7): 957-967.
- Snijders, T., Nederveen, J.P., McKay, B.R., Joannisse, S., Verdijk, L.B., van Loon, L.J.C., Parise G (2015). Satellite cells in human skeletal muscle plasticity *Front. Physiol.* 6: 283.
- Thompson LDV (2002). Skeletal muscle adaptations with age, inactivity, and therapeutic exercise. *J Orthop Sports Phys Ther.* 32(2): 44-57.
- Tinginac L.A., Brenner H.R., Ruegg, M.A (2015). Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscular Wasting. *Physiol Rev.* 95(3): 809-852.
- Triandafilou, K.M., Kamper, D.G (2012). Investigation of hand muscle atrophy in stroke survivors. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 27(3): 238-272.
- Turner, D.L., Tang, X., Winterbotham, W., Kmetova, M (2012). Recovery of submaximal upper limb force production is correlated with better arm position control and motor impairment early after a stroke. *Clin. Neurophysiol: Official J. Int. Federat. Clin. Neurophysiol.* 123: 183–192.
- Walh, A.S., Omlor, W., Rubio, J.C., Chen, J.L., Zheng, H., Schroter, A., Gullo, M., Weinmann, O., Kobayashi, K., Helmchem, F., Ommer, B., Schwab, M.E (2014). Neuronal repair. Asynchronous

therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract stroke. *Science*. 13;334(6189): 1250 – 1255.

- World Health Organization – WHO (2016). http://www.who.int/topics/cerebrovascular_accident/en/, - accessed 30 June 2018..
- Zhang, X., Zheng, H., Chen, S., and Chen, D (2008). The morphological alteration in myofibers fibrosis and expression in TGF-beta1 in long-term denervated posterior cricoarytenoid muscles. *Lin Chung Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 22: 742-746.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Valores promedio do peso corporal total em animais dos grupos Controle (C) e Isquemia Cerebral (IC). Não foram encontradas diferenças no peso dos animais do grupo IC em comparação com o peso dos animais do grupo C. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Número de animais: 6 por grupo.

Figura 2. Lesão de Isquemia Cerebral no Córtex Motor: Área do Córtex Motor 1 (M1), Área 2 do Cortex Motor (M2), Área Complementar do Córtex Motor (S1). Em A: Placa 10 (Bregma 3,24 mm); Em B: Placa 14 (Bregma 2,28mm). Em C: Placa 17 (Bregma 1,92mm).

Figura 3. Porcentagem de sucesso no desempenho motor. * $p < 0,001$ quando o IC é comparado aos grupos C. Controle (C) e Isquemia Cerebral (IC); Pré-IC, o momento antes da indução de IC; Após indução 3d (fase aguda final da IC), e Após 15d IC (fase crônica do IC). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Número de animais: 6 por grupo.

Figura 4. Morfologia representativa da JNM corado com técnica da colinesterase inespecífica a partir do músculo Bíceps. (A) grupo Controle; (B) grupo de isquemia cerebral. Barra de escala: 50 μm .

Tabela 1. Análise morfométrica da JNM, peso muscular normalizado, AST da fibra muscular e percentual de tecido conjuntivo dos músculos Bíceps, Tríceps, Flexores e Extensores dos Dedos nos indivíduos dos grupos Isquemia Cerebral (IC) e Controle (C).

Parâmetros Morfométricos	Controle (C)	Isquemia Cerebral (IC)	P
Biceps			
Promedio Área JNM (μm^2)	243.7 \pm 81.7	439.5 \pm 37.4***	0.0001
Promedio Perímetro JNM (μm)	65.9 \pm 10.5	92 \pm 9.5***	0.0001
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	24.9 \pm 37.6	25 \pm 9.2	0.992
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	8.8 \pm 1.7	13.0 \pm 1.7*	0.05
Peso normalizado del músculo (%)	0.0007 \pm 0.0001	0.0007 \pm 0.0004	0.713
AST fibra muscular (μm^2)	199.6 \pm 18.9	122.7 \pm 11.9***	0.0001
Tecido conectivo (%)	6.3 \pm 0.6	7.2 \pm 0.5	0.330
Triceps			
Promedio Área JNM (μm^2)	275.5 \pm 96.8	437 \pm 39.3***	0.0001
Promedio Perímetro JNM (μm)	70.8 \pm 13.4	141 \pm 0.8***	0.0001
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	27.4 \pm 5.1	51.5 \pm 7.5*	0.01
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	9.04 \pm 1.6	11.3 \pm 1.3	0.14
Peso normalizado del músculo (%)	0.003 \pm 0.0005	0.003 \pm 0,003	0.659
AST fibra muscular (μm^2)	253.6 \pm 23.6	208.6 \pm 20.6***	0.0001
Tecido conectivo (%)	5.3 \pm 0.5	6.3 \pm 0.8	0.304
Flexor dos dedos			
Promedio Área JNM (μm^2)	217.9 \pm 78.1	443 \pm 65.2***	0.0001
Promedio Perímetro JNM (μm)	62.7 \pm 12.2	64.6 \pm 9.9	0.856
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	24.4 \pm 4.9	24.3 \pm 3.3	0.962
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	7.9 \pm 1.3	8.3 \pm 1.2	0.730
Peso normalizado del músculo (%)	0.0015 \pm 0.0001	0.0013 \pm 0.0005**	0.01
AST fibra muscular (μm^2)	70.3 \pm 7.0	52.3 \pm 2.3***	0.0001
Tecido conectivo (%)	5.7 \pm 0.9	13 \pm 0.6**	0.01
Extensor dos dedos			
Promedio Área JNM (μm^2)	205.1 \pm 68.8	551.2 \pm 45.3***	0.0001
Promedio Perímetro JNM (μm)	59.9 \pm 10.1	75.6 \pm 16.9*	0.04
Promedio Diâmetro maior (feret) JNM (μm)	22.8 \pm 3.8	28.1 \pm 2.6	0.07
Promedio área relativa planar JNM (area/perímetro maior)	8.6 \pm 1.3	11.2 \pm 1.8**	0.01
Peso normalizado del músculo (%)	0.0005 \pm 0.0002	0.0004 \pm 0.0002	0.212
AST fibra muscular (μm^2)	84.1 \pm 5.2	76.3 \pm 5.3*	0.01
Tecido conectivo (%)	5.3 \pm 0.5	9.5 \pm 1.0*	0.02

* p < 0,05 - p < 0,01 e *** p < 0,0001, quando o IC é comparado a C. JNM: Junção Neuromuscular;

AST: Área da Seção Transversa da Fibra muscular. Os dados são expressos como média \pm

Desvio Padrão. Número de animais: 6 por grupo.

Tabela 2. Correlações entre: a) características morfométricas da JNM (área, perímetro e diâmetro maior) e desempenho motor no grupo IC 15 dias após a indução, e Entre: b) características morfométricas da JNM (área, perímetro e diâmetro maior) e características morfométricas dos músculos analisados (AST fibra muscular e percentagem de tecido conjuntivo) no grupo IC.

Variables correlacionadas	Nível de correlação Tau Kendall level (T)	T
Biceps		
Promedio Área total da JNM Biceps vs % de desempenho motor	0.838	0.037*
Promedio Perímetro total da JNM Biceps vs % de desempenho motor	0.838	0.037*
Promedio Diâmetro maior da JNM Biceps vs % de desempenho motor	0.856	0.030*
Promedio Área total da JNM Biceps vs AST Biceps	-0.971	0.0001**
Promedio Perímetro total da JNM Biceps vs AST Biceps	-0.972	0.0001**
Promedio Diâmetro maior JNM Biceps vs AST fibra muscular - Biceps	-0.911	0.01*
Promedio Área JNM Biceps vs % de tecido conectivo – Biceps	0.854	0.03*
Promedio Perímetro JNM Biceps vs % de tecido conectivo - Biceps	0.855	0.03*
Promedio de Diâmetro maior JNM Biceps vs % de tecido conectivo Biceps	0.980	0.0001**
Triceps		
Promedio Área total da JNM area Triceps vs % de desempenho motor	0.838	0.037*
Promedio Perímetro total da JNM Triceps vs % de desempenho motor	0.799	0.057*
Promedio Diâmetro maior da JNM Triceps vs % de desempenho motor	0.846	0.034*
Promedio Área total da JNM Triceps vs AST Biceps	-0.921	0.01*
Promedio Perímetro total da JNM Triceps vs AST Biceps	-0.993	0.0001**
Promedio Diâmetro maior JNM Triceps vs AST fibra muscular – Triceps	-0.992	0.0001**
Promedio Área JNM Triceps vs % de tecido conectivo – Triceps	0.898	0.01*
Promedio Perímetro JNM Triceps vs % de tecido conectivo - Triceps	0.841	0.03*
Promedio Diâmetro maior JNM Triceps vs % de tecido conectivo Triceps.	0.837	0.03*

Flexor dos dedos		
Promédio Área total da JNM flexor dos dedos vs % de desempenho motor	0.838	0.037*
Promedio Perímetro total da JNM flexor dos dedos vs % de desempenho motor	0.837	0.037*
Promedio Diâmetro maior da JNM flexor dos dedos vs % de desempenho motor	0.839	0.037*
Promedio Área total da JNM flexor dos dedos vs AST flexor dos dedos	-0.728	0.101*
Promedio Perímetro total da JNM flexor dos dedos vs AST flexor dos dedos	-0.729	0.101*
Promedio Diâmetro maior JNM flexor dos dedos vs AST fibra muscular – Flexor dos dedos	-0.729	0.100*
Promedio Área JNM Flexor dos dedos vs % de tecido conectivo – Flexor dos dedos	0.894	0.01*
Promedio Perímetro JNM Flexor dos dedos vs % de tecido conectivo – Flexor dos dedos	0.895	0.01*
Promedio de Diâmetro maior JNM Flexor dos dedos vs % de tecido conectivo Flexor dos dedos	0.980	0.0001**
Extensor dos dedos		
Promedio Área total da JNM Extensor dos dedos vs % de desempenho motor	0.837	0.037*
Promedio Perímetro total da JNM Extensor dos dedos vs % de desempenho motor	0.838	0.037*
Promedio Diâmetro maior da JNM Extensor dos dedos vs % de desempenho motor	0.838	0.037*
Promedio Área total da JNM Extensor dos dedos vs AST Extensor dos dedos	-0.999	0.0001**
Promedio Perímetro total da JNM Extensor dos dedos vs AST Extensor dos dedos	-0.999	0.0001**
Promedio Diâmetro maior JNM Extensor dos dedos vs AST fibra muscular – Extensor dos dedos	-0.998	0.0001**
Promedio Área JNM Extensor dos dedos vs % de tecido conectivo – Extensor dos dedos	0.867	0.02*
Promedio Perímetro JNM Extensor dos dedos vs % de tecido conectivo – Extensor dos dedos	0.867	0.02*
Promedio de Diâmetro maior JNM Extensor dos dedos vs % de tecido conectivo Extensor dos dedos	0.980	0.0001**

* p <0,05 - p <0,01 e ** p <0,0001, quando o IC é comparado ao C. NMJ, NMJ; CSA, área da

seção transversal Os dados são expressos como média ± SEM. Número de animais: 6 por grupo.

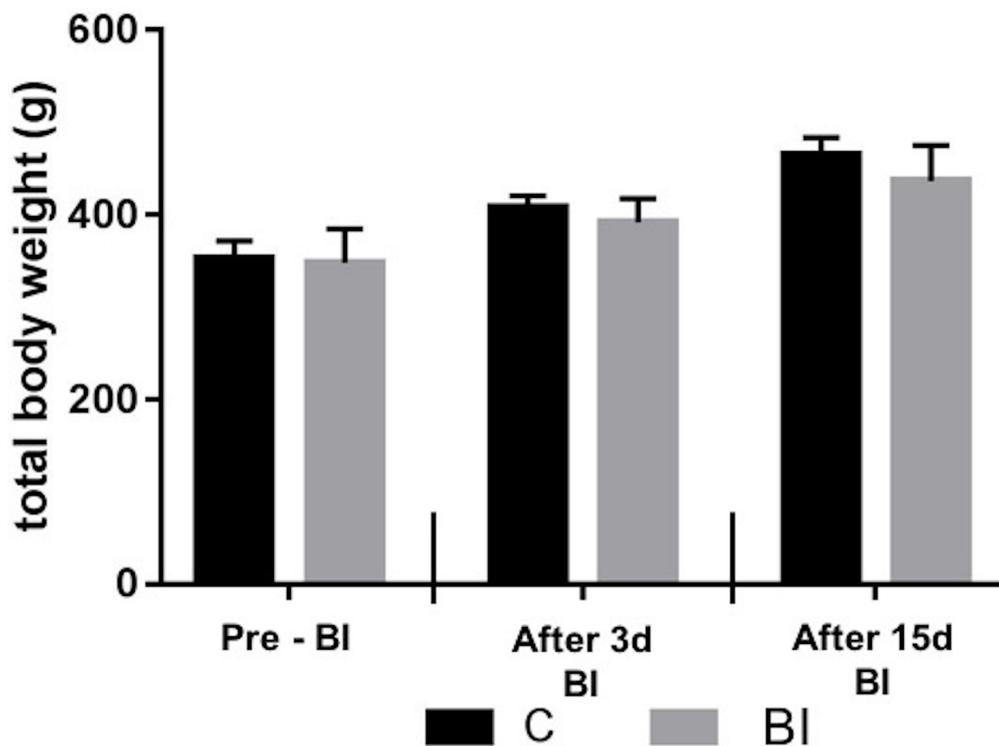
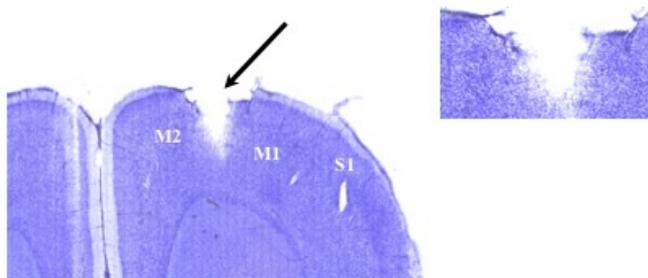
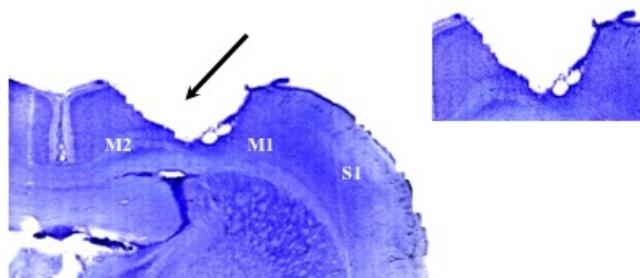


Figura 1. Valores promedio do peso corporal total em animais do grupo Controle (C), e do grupo IC (Na figura BI das siglas em inglês Brain Ischemia – BI). Não foram encontradas diferenças no peso corporal total dos animais quando foram comparados os valores dos dois grupos. Os dados são expressados como Promedio \pm Desvio Padrão. Número de animais: 6 por grupo.

A. PLATE 10. BREGMA 3,24 mm



B. PLATE 14. BREGMA 2,28 mm



C. PLATE 17. BREGMA 1,92 mm

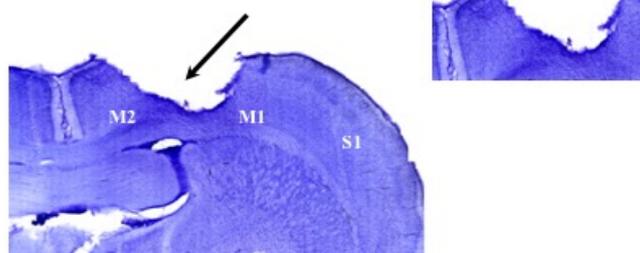


Figura 2. Injúria isquêmica no córtex motor: Área 1 em córtex motor (M1), Área 2 em córtex motor (M2), Área suplementaria do córtex motor (S1). Em A: Plate 10 (Bregma 3,24mm); Em B: Plate 14 (Bregma 2,28mm). Em C: Plate 17 (Bregma 1,92mm).

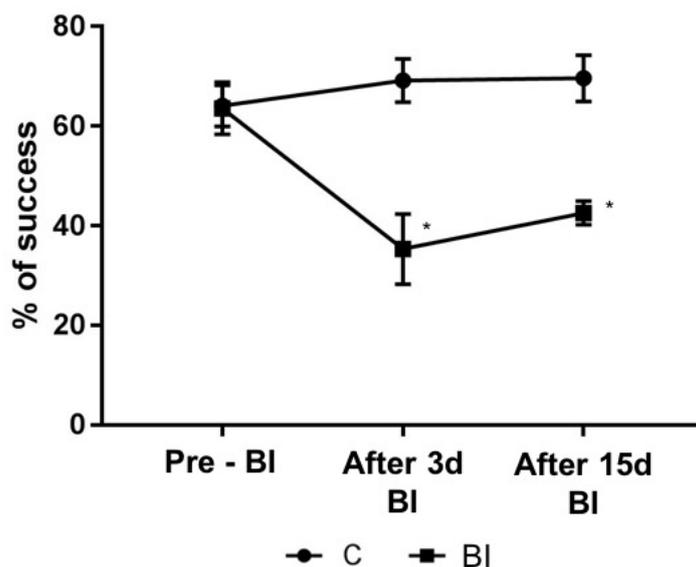


Figura 3. Porcentagem de sucesso na execução da tarefa de alcance. * $p < 0.001$ quando os resultados do grupo IC são comparados com os resultados do grupo C. Grupos Controle (C) e Isquemia Cerebral (IC); Pre-IC: momento antes da isquemia cerebral (IC); Após 3d da indução da IC (Final da fase aguda da IC) e após 15d IC (Fase crônica da IC). Os dados são expressados como promedio \pm Desvio Padrão. Número de animais: 6 por grupo.

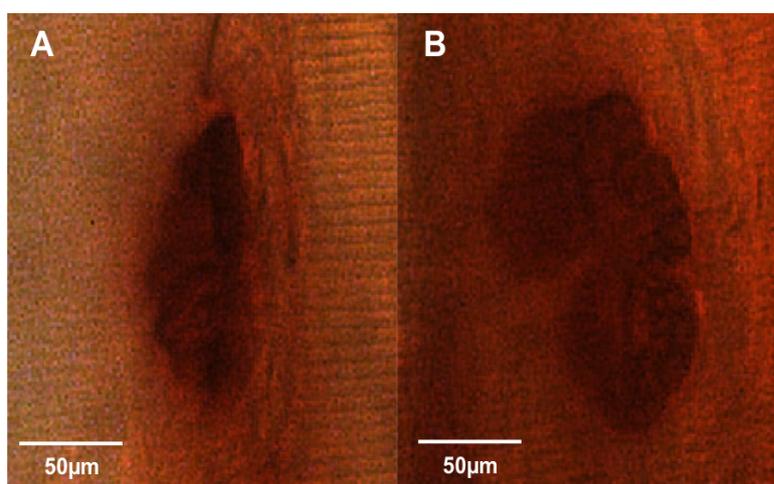


Figura 4. Morfologia representativa da JNM com a técnica da Colinesterase Inespecífica (no músculo Biceps). (A) Grupo controle; (B) Grupo Isquemia Cerebral. Escala barra: 50 μm .

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos apresentados nesta tese de Doutorado abordaram o estudo da Plasticidade da JNM em decorrência de dois tipos de DCNT tais como o DM e o IC em modelos animais (ratos Wistar), assim como a relação com o desempenho motor na tarefa de alcance. De modo geral, os resultados obtidos nos dois estudos, mostram as adaptações morfométricas da JNM dos músculos avaliados. Confirma-se que a JNM modifica sua plasticidade, permitindo adaptações desta estrutura, que por sua vez podem ser associadas com o desempenho motor da pata dianteira. Da mesma forma, as adaptações desenvolvidas na morfometria da JNM têm uma forte associação com as características de desenvolvimento tanto do DM como da IC.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

Durante o Doutorado, participei em atividades de pesquisa, ensino e de ações na comunidade, concomitantes ao desenvolvimento dos estudos que deram origem a esta tese.

De pesquisa:

- a) Participei em atividades de pesquisa no projeto da doutoranda Fernanda María Faturi, intitulado: “adaptações neuromusculares e funcionais em decorrência da isquemia cerebral e o não uso aprendido em ratos”.
- b) Participei do projeto de pesquisa da estudante de iniciação científica, Rafaella Mendes Zambetta, intitulado: “efeito do treinamento de alcance na fase aguda pós-isquemia cerebral sobre a recuperação da função da pata dianteira em ratos.
- c) Participei dos diferentes seminários feitos no nosso laboratório LaFiN, tendo em conta as revisões dos avanços dos diferentes projetos desenvolvidos pelos colegas do laboratório, assim como na revisão de diferentes temáticas relacionadas com os nossos projetos.

De ensino:

Coorientação dos projetos de TCC, intitulados: “Alterações da placa motora em decorrência do Diabetes Mellitus em ratos”, e “Alterações da placa motora em decorrência de Isquemia Cerebral em ratos” realizados respectivamente pelas estudantes de Fisioterapia Gracielle Santos e Gabrielle Croti.

De ações junto com a comunidade:

- a) Participei no XI Congresso Nacional/XII Simpósio Internacional de Neurociências, organizado pelo Colégio Colombiano de Neurociência – COLNE, realizado nos dias 26 à 28 de Abril de 2018 na cidade de Bogotá, D.C., Colômbia. Neste evento fiz a exposição de dois pôsters relacionados com o projeto de pesquisa desenvolvido e descrito nesta dissertação. Este projeto foi feito no marco de um convênio entre a USTA e a

UFSCar/DFisio, pelo que se encontra registrado na unidade de pesquisa da USTA. Os dois resumos foram publicados nos anais do evento (apêndices 3 e 4).

- b) Participação em capítulo do livro intitulado: “Fisioterapia Gerontológica”, com o professor Gilberto Eiji Shinguemoto e o Doutorando em Fisioterapia, Elie Fogbié.

APÊNDICES

Nº de sucesos										
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

3. AVALIAÇÃO GLICEMIA PRÉ SHAM STZ.

1º AVALIAÇÃO (7 DIAS PROCESSO SHAPPING)	2º AVALIAÇÃO (3º DIA TREINAMENTO)	3º AVALIAÇÃO (10º DIA TREINAMENTO)

4. TESTE (MOMENTO 1) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

5. SHAM DM (INJEÇÃO DE SOLUÇÃO SALINA)

DATA DE REALIZAÇÃO DO SHAM (SOLUÇÃO SALINA)	QUANTIDADE

6. AVALIAÇÃO DA GLICEMIA (7 E 14 DIAS APÓS SHAM DIABETES):

DATA REALIZAÇÃO (APÓS 7 DIAS PÓS SHAM)	QUANTIDADE AVALIADA	DATA REALIZAÇÃO (APÓS 14 DIAS PÓS SHAM)	QUANTIDADE AVALIADA

7. TESTE (MOMENTO 2) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (UM DIA PRÉ CIRURGIA INDUÇÃO – ET1)

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

8. CIRURGIA (ET – 1).

Data realização cirurgia ET1	
Lado lesão	
Anestesia	
Bregma	
Lateral	
Anterior	
Posterior	
Lateral	
Observações	

9. CIRURGIA (Controle do peso e da glicemia):

(CIRURGIA) REPOUSO	1º dia	2º dia	3º dia

Peso			
Glicemia (valores)			

10. TESTE (MOMENTO 3) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (4 DIAS APÓS CIRURGIA ET1):

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

11. AVALIAÇÃO GLICEMIA SEMANAL (PÓS CIRURGIA ET1 – 10 DIAS)

DATA REALIZAÇÃO (APÓS 3 DIAS PÓS TESTE MOMENTO 3)	QUANTIDADE AVALIADA	DATA REALIZAÇÃO (APÓS 7 DIAS PÓS TESTE MOMENTO 3)	QUANTIDADE AVALIADA

12. TESTE (MOMENTO 4) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (UM DIA ANTES DO SACRIFÍCIO):

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

OBSERVAÇÕES:

--



FOLHA PARA REGISTRO DE DADOS SHAPING E TREINO DOS RATOS – PROJETO DOUTORADO GRUPOS DE ANIMAIS (STZ)

- A) NÚMERO DO RATO:
 B) LATERALIDADE:
 C) GRUPO:

1. HABITUAÇÃO (DIA 1 E 2) E SHAPING PRÉ – LESÃO (DIAS 3 A 11):

Pré-lesão	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia	11º dia
Peso											
Shaping											

2. TREINAMENTO PRÉ – LESÃO:

Treinamento	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia
Peso										
Nº de tentativas										
Nº de sucesos										

3. AVALIAÇÃO GLICEMIA PRÉ INDUÇÃO STZ.

1º AVALIAÇÃO (7 DIAS PROCESSO SHAPPING)	2º AVALIAÇÃO (3º DIA TREINAMENTO)	3º AVALIAÇÃO (10º DIA TREINAMENTO)

4. TESTE (MOMENTO 1) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

5. INDUÇÃO STZ (INJEÇÃO DE ESTREPTOZOTOCINA - STZ)

DATA DA REALIZAÇÃO INDUÇÃO STZ	QUANTIDADE APLICADA

6. AVALIAÇÃO DA GLICEMIA (7 E 14 DIAS APÓS INDUÇÃO DIABETES - STZ):

DATA REALIZAÇÃO (APÓS 7 DIAS PÓS INDUÇÃO STZ)	QUANTIDADE AVALIADA	DATA REALIZAÇÃO (APÓS 14 DIAS PÓS INDUÇÃO STZ)	QUANTIDADE AVALIADA

7. TESTE (MOMENTO 2) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (UM DÍA PRÉ SHAM CIRUGIA ET1)

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

--	--	--

8. SHAM CIRURGIA (ET – 1).

DATA REALIZAÇÃO CIRURGIA ET1	
ANESTESIA	
OBSERVAÇÕES	

9. PÓS SHAM CIRURGIA (Controle do peso e da glicemia):

(CIRURGIA) REPOUSO	1º dia	2º dia	3º dia
Peso			
Glicemia (valores)			

10. TESTE (MOMENTO 3) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (4 DIAS APÓS SHAM CIRURGIA ET1):

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

11. AVALIAÇÃO GLICEMIA SEMANAL (PÓS SHAM CIRURGIA ET1 – 1 DIAS)

DATA REALIZAÇÃO (APÓS 3 DIAS PÓS TESTE MOMENTO 3)	QUANTIDADE AVALIADA	DATA REALIZAÇÃO (APÓS 7 DIAS PÓS TESTE MOMENTO 3)	QUANTIDADE AVALIADA

12. TESTE (MOMENTO 4) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (UM DIA ANTES DO SACRIFÍCIO):

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

8. OBSERVAÇÕES:

--



FOLHA PARA REGISTRO DE DADOS SHAPING E TREINO DOS RATOS
- PROJETO DOUTORADO
GRUPOS DE ANIMAIS (CONTROLE)

- A) NÚMERO DO RATO:
 B) LATERALIDADE:
 C) GRUPO:

1. HABITUAÇÃO (DIA 1 E 2) E SHAPING PRÉ – LESÃO (DIAS 3 A 11):

Pré-lesão	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia	11º dia
Peso											
Shaping											

2. TREINAMENTO PRÉ – LESÃO:

Treinamento	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia	9º dia	10º dia
Peso										
Nº de tentativas										
Nº de sucesos										

3. AVALIAÇÃO GLICEMIA PRÉ SHAM DM (SOLUÇÃO SALINA).

1º AVALIAÇÃO (7 DIAS PROCESSO SHAPPING)	2º AVALIAÇÃO (3º DIA TREINAMENTO)	3º AVALIAÇÃO (10º DIA TREINAMENTO)

4. TESTE (MOMENTO 1) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

5. SHAM DM (INJEÇÃO DE SOLUÇÃO SALINA)

DATA DE REALIZAÇÃO DA INDUÇÃO DO DM)	QUANTIDADE DE STZ APLICADA

6. AVALIAÇÃO DA GLICEMIA (7 E 14 DIAS APÓS SHAM DO DM):

DATA REALIZAÇÃO (APÓS 7 DIAS PÓS SHAM INDUÇÃO DM)	QUANTIDADE AVALIADA	DATA REALIZAÇÃO (APÓS 14 DIAS PÓS SHAM INDUÇÃO DM)	QUANTIDADE AVALIADA

7. TESTE (MOMENTO 2) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (UM DIA PRÉ SHAM CIRUGIA – ET1)

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

--	--	--

8. CIRURGIA SHAM (ET – 1).

DATA REALIZAÇÃO CIRURGIA ET1	
ANESTESIA	
OBSERVAÇÕES	

9. SHAM PÓS CIRURGIA (Controle do peso e da glicemia):

(CIRURGIA) REPOUSO	1º dia	2º dia	3º dia
Peso			
Glicemia (valores)			

10. TESTE (MOMENTO 3) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (4 DIAS APÓS SHAM CIRURGIA ET1):

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

11. AVALIAÇÃO GLICEMIA SEMANAL (PÓS SHAM CIRURGIA ET1 – 10 DIAS)

DATA REALIZAÇÃO (APÓS 3 DIAS PÓS TESTE MOMENTO 3)	QUANTIDADE AVALIADA	DATA REALIZAÇÃO (APÓS 7 DIAS PÓS TESTE MOMENTO 3)	QUANTIDADE AVALIADA

12. TESTE (MOMENTO 4) DE AVALIAÇÃO DA TAREFA MANUAL (UM DIA ANTES DO SACRIFÍCIO):

DATA REALIZAÇÃO TESTE	Nº DE TENTATIVAS	Nº SUCESSOS

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE 2.

Conceito comitê de ética em pesquisa com animais CEUA/UFSCar.

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ADAPTAÇÕES NEUROMUSCULARES EM DECORRÊNCIA DE DIABETES MELLITUS E ISQUEMIA CEREBRAL EM RATOS", protocolada sob o CEUA nº 4364131216, sob a responsabilidade de **Thiago Luiz de Russo e equipe; Yisel Carolina Estrada Bonilla; Ana Carolina Lepeteur Gianlorenço; Fernanda Maria Faturi Gibi; Genoveva Lourdes Flores Luna; Paula Aiello Tomé de Souza Castro; Rafaella Mendes Zambetta; Tânia de Fatima Salvini ; Ângela Merice de Oliveira Leal** - 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 27/06/2017.

We certify that the proposal "NEUROMUSCULAR ADJUSTMENTS IN DIABETES MELLITUS AND ISCHEMIC STROKE IN RATS", utilizing 52 Heterogenics rats (52 males), protocol number CEUA 4364131216, under the responsibility of **Thiago Luiz de Russo and team; Yisel Carolina Estrada Bonilla; Ana Carolina Lepeteur Gianlorenço; Fernanda Maria Faturi Gibi; Genoveva Lourdes Flores Luna; Paula Aiello Tomé de Souza Castro; Rafaella Mendes Zambetta; Tânia de Fatima Salvini ; Ângela Merice de Oliveira Leal** - 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 06/27/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2017](#) a [12/2017](#)

Área: [Fisioterapia](#)

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [52](#)

Linhagem: [Wistar](#)

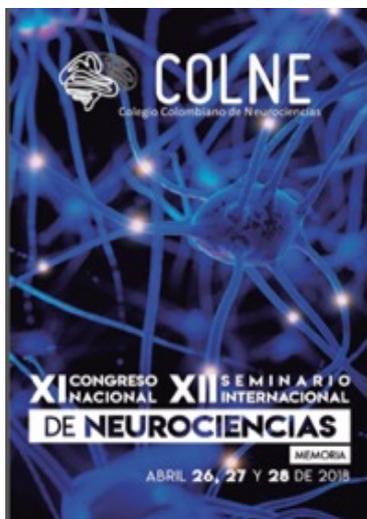
Peso: [200 a 250 g](#)

Resumo: O estudo sobre os efeitos do Acidente Vascular Cerebral (AVC) no desempenho neuromuscular já foram descritos na literatura e seu impacto sobre a função e a realização de tarefas é bem estabelecido em diferentes espécies. Contudo, a associação entre o AVC e fatores de comorbidade, como o Diabetes mellitus (DM), ainda merece atenção. Há evidência que os processos de recuperação funcional são afetados em animais e em seres humanos quando há associação entre AVC e DM. Este prejuízo na performance de tarefas foi relacionado a alterações do sistema nervoso central, mas o papel de tecidos periféricos, como o músculo esquelético ainda não foi estabelecido. O objetivo deste projeto será identificar as alterações comportamentais, funcionais e neuromusculares que envolvam a pata dianteira de ratos com isquemia cerebral associada a DM. Ratos Wistar serão divididos em 4 grupos: controle, DM, AVC e DM+AVC. O DM e a isquemia cerebral serão induzidos por estreptozotocina e endotelina-1, respectivamente. O desempenho neuromuscular da pata dianteira será avaliado em tarefas comportamentais (teste do cilindro) e funcionais (recolher peletes). O trofismo muscular será avaliado nos músculos bíceps e tríceps braquial, considerando a mensuração da área de secção transversa da fibra. Os dados serão submetidos a testes de normalidade e homogeneidade. O teste Anova one-way será usado para a avaliação das fibras musculares e o two-way de medidas repetidas (com os fatores grupo e tempo) para os testes de comportamento e função da pata. Um nível de significância de 5% será considerado.

Local do experimento: O Experimento será realizado em dois locais: a) Biotério do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, que tem todos os itens para trabalhar com os animais (alimentação, luz, água, caixas com maravalha, etc), A maravalha será trocada cada dois dias, e a água do bebedouro será trocada todos os dias. A água do bebedouro será filtrada. O biotério está a uma temperatura de 24°C, e tem como fazer o ciclo claro-escuro de 12h/12h, através de um timer programado com o ciclo 12h acesso e 12h desligado. b) O Laboratório de Pesquisa em Fisioterapia Neurológica do Departamento de Fisioterapia - LaFIN, que tem todas as condições para fazer os experimentos de treinamento e shaping para tarefas funcionais, assim como para fazer as cirurgia de indução de isquemia cerebral e para fazer o processo de indução do DM com STZ.

São Carlos, 27 de junho de 2017

APÊNDICE 3. Resumos apresentados no XI Congresso Nacional/XII Simpósio Internacional de Neurociências do COLNE – Bogotá, D.C., Colômbia



Memoria
XI Congreso Nacional
XII Seminario Internacional de Neurociencias
Colegio Colombiano de Neurociencias

Memoria XI Congreso Nacional XII Seminario Internacional de Neurociencias (XI Congreso Nacional XII Seminario Internacional de Neurociencias del 26 al 28 de abril en la ciudad de Bogotá D.C., editó Jorge Martínez Cortés - Bogotá Colegio Colombiano de Neurociencias - CCNE - Universidad Nacional de Colombia / Pontificia Universidad Javeriana / Universidad Estadal de Colombia / Universidad de Antioquia 2018
344 páginas - 3 cm.
Nueva Edición
ISBN: 978-95-773-0140-1
1. Neurociencia - Aspectos generales - Congresos, conferencias en 2. Neurociencias - Aspectos generales - Congresos, conferencias en 3. Neurociencia integrativa - Aspectos generales - Congresos, conferencias en 4. Neurociencia integrativa - Aspectos generales - Congresos, conferencias en 5. Neurociencia - Aspectos generales - Congresos, conferencias en 1. Bogotá Colombia, Jorge Martínez Cortés Universidad Nacional de Colombia (U.N.)
3401 NCE/10
Contenido en línea - Universidad Nacional de Colombia, Biblioteca, EAF, abril de 2018

ISBN 978-95-773-0140-1
© 2018, Colegio Colombiano de Neurociencias - COLNE
http://colne.org.co/
© 2018, Universidad Estadal de Colombia
Calle 127 No. 17-100, Bogotá
Teléfono: (57) 312 42 0188
publicaciones@unestatal.edu.co
www.unestatal.edu.co

Primera edición: abril de 2018
Diseño de cubierta: Departamento de Publicaciones
Comité de estilo: Javier Correa Correa
Composición: Alvaro Alexander Rodríguez Plata
Impreso en Colombia
Printed in Colombia

Prohibida la reproducción o cita impresa o electrónica total o parcial de esta obra, sin autorización expresa y por escrito del Departamento de Publicaciones de la Universidad Estadal de Colombia. Los derechos reservados en esta obra son responsabilidad de los autores.

Contenido	19
NEUROGENERACIÓN E	305
B01 Administración cerebral vía oral de glicetina: efecto preventivo en un modelo animal de Enfermedad de Alzheimer	307
B01 Desarrollo neural y presencia de grupo social en ratas entre 3-11 años. La neurogénesis neural está al rango de presencia de grupo en ratas	308
B02 Diferencias entre hombres y mujeres en la asociación entre inteligencia durante la niñez y problemas de conducta en la adolescencia	311
B03 Efecto de la lesión neurotóxica del núcleo pedunculoposterior sobre la expresión del ARNis de la proteína hidrofóbica, el transportador neuronal de monoaminas y el transportador de dopamina en el tejido nigroestriatal de ratas	313
B04 El contexto social como modulador de la percepción del error en la toma de decisiones de usuarios de comercio electrónico	315
B05 Evaluación de potenciales cambios de ionización entre 100% de melitona y 100% de melitona en regiones hipocámpicas de ratas asociadas con la Enfermedad de Alzheimer	317
B06 Nuevos agentes (X)Bios derivados de plantas anticancerígenas con potencial terapéutico en la Enfermedad de Alzheimer	319
NEUROCIENCIA DEL COMPORTAMIENTO E	321
B07 Alteraciones en el desempeño de la tarea de alcance en ratas Wistar con diabetes mellitus inducida	323
B08 Alteraciones en el desempeño de la tarea de alcance en ratas Wistar con isquemia cerebral cortical inducida	325
B09 Análisis del comportamiento de agresividad y ansiedad en por cebra posterior a la exposición a estrés y miedo	327

B07 ALTERACIONES EN EL DESEMPEÑO DE LA TAREA DE ALCANCE EN RATAS WISTAR CON DIABETES MELLITUS INDUCIDA

EBRADA, Y^{1,2}, SANTOS, G.¹, FLORES, G.¹ Y RUSO, T.¹

Introducción: La diabetes mellitus es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades que afectan al sistema nervioso, comprometiendo al desempeño motor. Estudios realizados por Ergul et al. (2014), que inducen diabetes mellitus en ratas, observan compromiso en la realización de tareas motoras que involucran el uso de las patas delanteras. **Objetivo:** Identificar alteraciones en la realización de tareas de alcance en ratas Wistar con diabetes mellitus inducida. **Materiales y métodos:** 6 ratas Wistar macho fueron entrenadas en tareas de alcance - caja de entrenamiento (Jones et al., 2011). Posteriormente al entrenamiento, se induce diabetes mellitus (modelo Streptozotocina - STZ). Se ejecuta test de tareas de alcance (Jones et al., 2011) en 4 momentos: 1) preinducción diabetes, 2) 14 días pos inducción diabetes, 3) 17 días pos inducción diabetes y 4) 27 días pos inducción diabetes, usando número de intentos y de aciertos realizados. 6 ratas Wistar de las mismas

1 Universidad Estadal de San Carlos, SE Brasil.
2 Universidad Juan Tesate, sede Bogotá, Colombia.

B08 ALTERACIONES EN EL DESEMPEÑO DE LA TAREA DE ALCANCE EN RATAS WISTAR CON ISQUEMIA CEREBRAL CORTICAL INDUCIDA

EBRADA, Y^{1,2}, PATRIL, P.¹, MENDES, R.¹ Y RUSO, T.¹

Introducción: La isquemia cerebral es uno de los principales enfermedades que afectan al sistema nervioso, comprometiendo el desempeño motor. Estudios realizados por Jones (2011 y 2017), que inducen isquemia cerebral en ratas, muestran compromiso en la realización de tareas motoras que involucran el uso de las patas delanteras. **Objetivo:** Identificar alteraciones presentadas en la realización de la tarea de alcance en ratas Wistar con isquemia cerebral inducida. **Materiales y métodos:** 6 ratas Wistar macho fueron entrenadas en tareas de alcance - caja de entrenamiento (Jones et al., 2011). Posteriormente al entrenamiento, se induce isquemia cerebral (cirugía coronaria), aplicación de Endotelina 1). Se ejecuta test de tareas de alcance (Jones et al., 2011) en 4 momentos: 1) preinducción isquemia, 2) 14 días pos inducción isquemia, 3) 17 días pos inducción isquemia y 4) 27 días pos inducción isquemia, usando número de intentos y de aciertos realizados. 6 ratas Wistar de las

1 Universidad Estadal de San Carlos, SE Brasil.
2 Universidad Juan Tesate, sede Bogotá, Colombia.