ADRIANO POLICAN CIENA

Características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos

São Paulo

2013

ADRIANO POLICAN CIENA

Características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Ii-sei Watanabe

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2923
FMVZ

Ciena, Adriano Polican

Características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos / Adriano Polican Ciena. -- 2013.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Ii-sei Watanabe.

1. Junção miotendínea. 2. Músculo esternomastóideo. 3. Envelhecimento. 4. Microscopia eletrônica de varredura. 5. Microscopia eletrônica de transmissão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos", protocolado sob o nº 2772/2012, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe (ICB), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Structural and ultrastructural characteristics of the myotendinous junction of the sternomastoid muscle of newborns, adults and olds Wistar rats", protocol number 2772/2012, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe (ICB), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CIENA, Adriano Polican

Título: Características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data:_____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Julgamento:_____

"Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar, para atravessar o rio da vida – ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, pontes e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria vida; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o".

FRIEDRICH WILHELM NIETZSCHE

"O caráter de um homem é o seu destino".

(Heráclito)

"Só há um templo no mundo e é o corpo humano. Nada é mais sagrado que esta forma sublime. Inclinar-se diante de um homem é fazer homenagem a esta revelação na carne. Toca-se o céu quando se toca um corpo humano".

Friedrich Von Hardenberg Novalis

Dedicatórias

Aos meus amados pais, João Carlos Alves Ciena e Rosi Polican Ciena, meus ídolos, a quem devo tudo, sempre me apoiaram e souberam, pacientemente, compreender os caminhos da minha jornada.

Com amor e profundo agradecimento:

A minha amada Cristina de Sousa Bolina, os dias foram longos e as noites curtas entre objetivos, artigos, pesquisas e os nossos sonhos, agradeço imensamente pela companhia diária durante esses anos. Acompanhou e incentivou cada etapa da confecção da Tese e dos projetos paralelos, sempre paciente e pronta para ajudar. Iremos continuar seguindo adiante, neste caminho, lado a lado e sempre de mãos dadas.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À Prof. Dra. **Maria Angélica Miglino**, pelas palavras determinadas de incentivo e a oportunidade única, aceitando-me como aluno no Programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, não qual desempenha importante papel de Coordenadora.

Ao Prof. Dr. **Ii-sei Watanabe**, orientador, mestre e espelho. Pela confiança depositada, neste caminho que tens me guiado, transmitindo os conhecimentos, na pesquisa científica e como cidadão. Que mais uma vez, doando de seu solicitado e precioso tempo, de seu sólido conhecimento e experiência, com segura e objetiva orientação, levou-nos à realização deste trabalho.

Aos Professores Dra. **Mamie Mizusaki Iyomasa** e Dr. **João Paulo Madergan Issa** obrigado pelos direcionamentos nos desafios da escrita científica na área da morfologia durante os anos de pós-graduação.

Aos meus irmãos, **Fabiana Polican Ciena** e **Juliano Polican Ciena**, obrigado por toda a ajuda e incentivo. Tenho muito orgulho de participar desta linda família e desfrutar cada momento em grupo. Espelhei-me muito em ambos para superar os desafios que enfrentei e gostaria de dizer que amo vocês.

Ao meu amigo e irmão, **Jaques Jean Junqueira Oliveira** vulgo "Baiano", que a vida me proporcionou conhecer, admirar e apadrinhar em seu matrimônio. Sou agraciado por todos esses anos, desde as monitorias, os estudos de madrugada para as provas da graduação, nas disciplinas,

A Sra. **Maria Cristina dos Santos Faustino**, obrigado pelos incentivos e momentos prazerosos no Museu de Anatomia.

Ao amigo **Edson Rocha de Oliveira**, obrigado pelas inúmeras horas com os microscópios do setor de Microscopia Eletrônica do ICB-I.

Aos colegas pós-graduandos do Departamento de Anatomia, em especial **Daniella Sabino Batagello** "pdf" e **Marcus Paulo Ribeiro Machado**, muito obrigado por tudo.

Aos colegas pós-graduandos do Departamento de Cirurgia, em especial **Ciro Alexandre Teixeira Cruvinel**, **Amilton Cesar dos Santos**, **Bruno Gomes Vasconcelos**, muito obrigado.

Aos Prof. Dr. **Antônio Chaves de Assis Neto**, **Alan Peres Ferraz de Melo**, sempre atenciosos e prestativos, muito obrigado por tudo.

Aos Srs. **Adevair Urenha Alves** "Tim", **Edson Dantas da Silva** "Edinho", **Everton Luís Pavan Torres**, **José Adão Mendes**, **Giovaldo Serafim Correia** "Gil", obrigado pelos dias prazerosos que proporcionaram no prédio didático durante os estudos anatômicos.

Aos "Srs" **Sonia Regina Yokomizo de Almeida**, **Marta Maria da Silva Righetti**, **Sebastião Aparecido Boleta** e **Kelly Patrícia Nery Borges**. Todas as palavras neste momento formariam frases incompletas para descrevê-los. São verdadeiros "anjos" que tive o privilégio de conhecer e conviver ao longo destes anos. Muito obrigado por tudo! "Cómo se disse: Mi Madres y padres".

Aos queridos amigos **Paulo Henrique de Matos Alves** e **Regina de Sousa Bolina Matos**, momentos maravilhosos tive ao lado de vocês. Obrigado pelo presente.

Ao "irmão" Prof. Dr. **Luciano Gonçalves** pela inestimável amizade. Foi um prazer estudar e aprender anatomia ao longo destes anos.

Aos vigias e zeladoras do Departamento de Anatomia, em especial, ao **Smith, Juscelino “JK”** e a senhora **Francisca “Tia Fran”**, obrigado pelas inúmeras conversas prazerosas, à extrema disposição em ajudar e ao transmitir alegria em seus sorrisos.

Agradeço aos componentes da Banca de exame de Qualificação de Doutorado, Prof. Dr. **Ii-sei Watanabe**, Prof. Dr. **Marcelo Cavenaghi Pereira da Silva** e a Dra. **Rose Eli Grassi Rici**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

Aos **Alunos**, não aqueles os quais “passaram por mim”, mas sim aos que contribuíram diariamente no aprendizado e aperfeiçoamento por determinados períodos nas salas de aula e laboratórios, dos diversos Cursos de Graduação e Pós-graduação, das Universidades por onde “andei”. Agradeço profundamente por todos os ensinamentos, desafios, lições e objetivos alcançados diante das aulas de Anatomia Humana. .

E aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

CIENA, A. P. **Características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos.** [Structural and ultrastructural features of myotendinous junction of the sternomastoid muscle of newborns, adults and aged Wistar rats]. 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A junção miotendínea (JMT) é a principal área de transmissão de força e de lesões do sistema muscular esquelético, atuando no posicionamento e estabilização articular. O estudo morfológico das estruturas e ultraestruturas da JMT do músculo esternomastóideo (EM) demonstrará as características desde o nascimento, ao revelar os esboços iniciais do desenvolvimento, sua completa formação na fase adulta e possíveis alterações e comprometimentos morfofuncionais em decorrência do processo fisiológico do envelhecimento. O objetivo do presente estudo consiste em descrever as características estruturais e ultraestruturais da JMT do músculo EM de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos empregando os métodos de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Foram utilizados 45 ratos Wistar, em três grupos (n=15): Grupo Recém-nascido: animais com 5 dias de vida; Grupo Adulto: animais com 4 meses de idade; Grupo Idoso: animais com 24 meses de idade. Os animais, após anestesia, foram dissecados os músculos EM e as JMT destes foram processadas de acordo com os métodos empregados. As características morfológicas da JMT do Grupo Recém-nascido revelaram o seu esboço durante o desenvolvimento, através da interação das células musculares e elementos da matriz extracelular, destacando delgadas dobras no sarcolema e elevada atividade celular através de inúmeras tenoblastos e mitocôndrias ovais aglomeradas. No Grupo Adulto revelaram características clássicas da JMT em destaque às dobras do sarcolema formando longas projeções denominadas de evaginações e invaginações sarcoplasmáticas. No Grupo Idoso foram observadas alterações na JMT, com espessamento em ambos os níveis das invaginações sarcoplasmáticas e nas comunicações centrais com as junções laterais, além de espessamento de feixes de fibras colágenas e redução celular nesta área. Conclui-se que a JMT desde os estágios iniciais de desenvolvimento ao envelhecimento apresentam intenso processo de formação, remodelamento e alterações em decorrência do processo fisiológico do envelhecimento.

Palavras-chave: Junção miotendínea. Músculo esternomastóideo. Envelhecimento. Microscopia eletrônica de varredura. Microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

CIENA, A. P. **Structural and ultrastructural features of myotendinous junction of the sternomastoid muscle of newborns, adults and aged Wistar rats.** [Características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos]. 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The myotendinous junction (MTJ) is the main area of power transmission and injuries of the musculoskeletal system, working on positioning and joint stabilization. The morphological study of the structures and ultrastructures of JMT muscle esternomastóideo (EM) demonstrated characteristics from birth, to reveal initial development, its complete training in adulthood and possible changes and compromises morphofunctional due to the physiological process of aging. The aim of this study is to describe the structural and ultrastructural features of JMT muscle EM Wistar rat newborns, adults and the elderly employing the methods of light microscopy, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. We used 45 Wistar rats into three groups (n = 15): Newborn Group: animals with 5 days of life; Adult Group: animals with 4 months of age; Group Aged: animals 24 months of age. The animals, after anesthesia, the muscles were dissected and the MTJ these were processed in accordance with the methods employed. The morphological characteristics of the JMT Group Newborn revealed his sketch during development, through the interaction of muscle cells and extracellular matrix elements, highlighting the slender folds sarcolemma and high cellular activity through numerous mitochondria oval crowded and tenoblastos. In Adult Group revealed classic features of JMT with highlight the folds of the sarcolemma forming long projections denominated evaginations and invaginations of the sarcoplasmic membrane. In Aged Group changes were observed in the MTJ with thickening at both levels of sarcoplasmic invaginations and in communications with the central lateral junctions, and thickening of collagen fibers and reduced cell in this area. We conclude that the JMT since the early stages of development to aging have intense training process, remodeling and changes due to the physiological process of aging.

Keywords: myotendinous junction. Muscle esternomastóideo. Aged. Scanning electron microscopy. Transmission electron microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação da organização da região da JMT.....	24
Figura 2 -	Fotomicrografia eletrônica de transmissão da JMT de ratos Wistar adultos.....	26
Figura 3 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	37
Figura 4 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	37
Figura 5 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	38
Figura 6 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	38
Figura 7 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte muscular da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	40
Figura 8 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	40
Figura 9 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	41
Figura 10 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	41
Figura 11 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	43
Figura 12 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	43
Figura 13 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	44
Figura 14 -	Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	44
Figura 15 -	Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	46
Figura 16 -	Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	46
Figura 17 -	Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	48
Figura 18 -	Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT	

	do músculo EM do Grupo Adulto.....	48
Figura 19 -	Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	50
Figura 20 -	Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	50
Figura 21 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	52
Figura 22 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	52
Figura 23 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	53
Figura 24 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	53
Figura 25 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT lateral do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	54
Figura 26 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido.....	54
Figura 27 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	56
Figura 28 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	56
Figura 29 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	57
Figura 30 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	57
Figura 31 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	58
Figura 32 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto.....	58
Figura 33 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	60
Figura 34 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	60
Figura 35 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	61
Figura 36 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da	

	JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	61
Figura 37 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	62
Figura 38 -	Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da JMT do músculo EM do Grupo Idoso.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EM	Esternomastóideo
°C	graus Celsius
JMT	Junção miotendínea
%	Porcentagem
µm	Micrômetros
mm	Milímetros
nm	Nanômetros

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Tecido muscular.....	23
2.2	Tecido tendíneo.....	29
2.3	Junção miotendínea.....	33
3	OBJETIVO GERAL.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	Animais.....	41
4.2	Microscopia de Luz.....	41
4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
4.4	Microscopia Eletrônica de transmissão.....	43
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Microscopia de Luz.....	46
5.1.1	Grupo Recém-Nascido.....	46
5.1.2	Grupo Adulto.....	49
5.1.3	Grupo Idoso.....	52
5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	55
5.2.1	Grupo Recém-Nascido.....	55
5.2.2	Grupo Adulto.....	57
5.2.3	Grupo Idoso.....	59
5.3	Microscopia Eletrônica de transmissão.....	61
5.3.1	Grupo Recém-Nascido.....	61
5.3.2	Grupo Adulto.....	65
5.3.3	Grupo Idoso.....	69
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS.....	86
	APENDICE.....	95

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os músculos esqueléticos representam cerca de 50% da massa corpórea e, portanto, é o tecido mais abundante do corpo humano. Os músculos esqueléticos proporcionam variados movimentos corporais coordenados, de suaves à vigorosos, através de sua fixação no esqueleto. Para desempenhar suas funções, os músculos esqueléticos são amplamente vascularizados e innervados (GREFTE et al., 2007).

O músculo esternocleidomastóideo em humanos está situado na região cervical, constituído por dois ventres musculares e com inserção no processo mastóide. Possui amplas funções na movimentação das articulações crânio-vertebrais e na inspiração através da musculatura acessória (SOBOTKA; MU, 2010).

Em mamíferos roedores como o *Rattus norvegicus*, os músculos homólogos ao esternocleidomastóideo são separados e delimitados por uma delgada membrana de tecido conjuntivo, sendo o esternomastóideo (EM) disposto medialmente e o cleidomastóideo póstero-lateralmente (DIOGO et al., 2008).

Na região da inserção proximal, o músculo EM, em ratos, apresenta-se com uma estreita faixa de fibras colágenas que formam o tendão próximo à interface músculo-tendão, região esta denominada de junção miotendínea (JMT).

Assim, a JMT é uma região de transição altamente especializada e complexa entre o tecido muscular e tendíneo, delimitada pelas dobras no sarcolema (TIDBALL, 1991). Sua primordial função é a transmissão de força gerada pelas proteínas contráteis intracelulares, para as proteínas do tecido conjuntivo extracelular presentes no tecido tendíneo (KANNUS et al., 1992).

O desenvolvimento da JMT sofre influência direta através da interação entre os mioblastos e os elementos da matriz extracelular, bem como, pode ser regulado pela sinalização local através da distribuição heterogênea do ácido retinóico (RODRIGUEZ-GUZMAN et al., 2007).

As habilidades especializadas das células musculares de contrair e de produzir força são desempenhadas, inicialmente, durante as últimas semanas de vida uterina e as primeiras semanas do período neonatal. Estas são fundamentais para o desenvolvimento e formação do complexo ultraestrutural, altamente especializado da JMT na fase adulta (KOSTROMINOVA et al., 2009). O estudo

morfológico das características estruturais e ultraestruturais da JMT do músculo EM demonstrará as características, desde o nascimento, revelando os detalhes através de seus esboços iniciais em desenvolvimento, sua completa formação na fase adulta e, possíveis alterações e comprometimentos morfofuncionais em decorrência do processo fisiológico do envelhecimento.

A literatura revela alta incidência de lesões na JMT, nas variadas faixas etárias, decorrentes desde lesões desportivas à inatividade física como o sedentarismo, no entanto, com escassez de descrições morfológicas. Portanto, os resultados deste estudo têm por finalidade acrescentar descrições evolutivas morfológicas dos elementos estruturais e ultraestruturais desde o nascimento ao envelhecimento e, contribuir futuramente com a prevenção de lesões e intervenções terapêuticas na região da JMT.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo dedica-se à descrição da literatura pertinente sobre o tema aqui apresentado, a qual forneceu aspectos de relevância e suporte científico para a condução deste estudo e está subdividida em tópicos como se segue:

2.1 Tecido Muscular

O músculo estriado esquelético dos vertebrados tem origem nas células do mesoderma, a partir dos somitos do embrião e da lâmina mesodérmica precordial, com diferenciação terminal associada ao ciclo celular, sendo este, um processo dinâmico que envolve diversas proteínas reguladoras (ZACKSENHAUS et al., 1996; MOORE; PERSAUD, 2008).

Em humanos os músculos esqueléticos, dispostos na região cervical, apresentam ampla evolução relatada através da anatomia comparada (BEMIS; LAUDER, 1986). As diversas evidências à homologia em favor da teoria da evolução sugerem ancestralidade comum aos organismos distintos que apresentam estruturas musculares semelhantes, tais descrições foram realizadas após dissecações em peixes até o homem moderno (DIOGO et al., 2008).

Em humanos, o músculo esternocleidomastóideo recebe esta nomenclatura em virtude de suas origens musculares e sua inserção no processo mastóideo do osso temporal (ULLAH et al., 2007), exercendo amplas funções, como nos movimentos das articulações crânio-vertebrais (MISSAGHI, 2004), posturais e na inspiração profunda (PARTHASARATHY et al., 2007; PINTO; CARVALHO, 2008). É constituído por dois ventres: esternal (porção longa) e clavicular (porção curta), e sua inervação é proveniente do nervo acessório, XI par craniano (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011).

Os músculos homólogos ao esternocleidomastóideo de humanos em mamíferos roedores (*Rattus norvegicus*), ou seja, esternomastóideo e cleidomastóideo estão delimitados por uma delgada membrana de tecido conjuntivo

denso. Estes músculos são distintos e localizados paralelamente, sendo o esternomastóideo anterior ao cleidomastóideo (DIOGO, 2009).

No tecido muscular, a fibra muscular é denominada como a unidade funcional, que é composta de feixes de miofibrilas. Cada unidade funcional, derivada da fusão de mioblastos, apresenta-se alongada e multinucleada, com diâmetros que variam de 10 a 100 micrômetros em distintos músculos esqueléticos de mamíferos, com o citoplasma contendo feixes de miofibrilas (GREFTE et al., 2007).

As fibras musculares estão organizadas em grupos paralelos e envolvidas por feixes de fibras de colágeno. A disposição destes feixes possibilita certo grau de alteração no comprimento das fibras musculares durante a contração e relaxamento muscular (ISHIKAWA; SAWADA; YAMADA, 1982).

A organização muscular apresenta-se em diversas disposições como: longitudinal, transversal ou oblíqua. Histologicamente, uma fibra muscular está envolvida por uma camada de tecido conjuntivo, denominada endomísio. O conjunto de fibras organizadas em fascículo é envolvido pelo perimísio. Além disso, as fibras musculares equivalentes encontram-se agrupadas, como um todo, formando o músculo. Este é envolvido pelo epimísio, constituído por uma camada espessa de tecido conjuntivo (MACCONNACHIE; ENESCO; LEBLOND, 1964; LIGHT; CHAMPION, 1984; NISHIMURA; HATTORI; TAKASHI, 1994).

Na organização espacial do endomísio, observam-se três tipos de estruturas de colágenos: o tipo I consiste de uma densa rede de fibras colágenas onduladas na superfície da fibra muscular; o tipo II, composto de feixes de fibras colágenas transversalmente entre as fibras musculares e a miofibrilas, ligando-as entre si, constituindo um retículo sarcoplasmático frouxo; e o tipo III composto por fibras delgadas, também conhecidas como fibras reticulares, e adjacentes aos vasos sanguíneos (VASILEV; ANDREEV; KÜHNEL, 1995).

O perimísio possui várias camadas de lâminas onduladas de fibras colágenas formadas por feixes compactos de fibras. O epimísio contém duas camadas, uma sendo interna, com numerosas fibras colágenas dispostas em um padrão ondulado paralelo à fibra muscular, e outra externa, composta de várias lâminas onduladas constituídas por feixes de fibras colágenas correndo transversalmente ao eixo da fibra muscular (NISHIMURA; HATTORI; TAKASHI, 1994).

Estruturalmente, o sarcolema da fibra muscular é uma membrana contínua à porção terminal da fibra muscular. A membrana é voltada internamente ao sarcoplasma, formando uma série de fendas e invaginações, e a face externa da lâmina basal do sarcolema possui fibras colágenas do tendão muscular. Existem evidências de formação de miofilamentos na porção terminal do sarcoplasma em forma de ribossomos livres e filamentos delgados, sendo considerados como local de possível crescimento longitudinal da fibra muscular (MACKAY; HARROP; MUIR, 1969).

As características das estriações claras e escuras das miofibrilas dos músculos esqueléticos são devido às disposições destes miofilamentos. As bandas escuras são chamadas banda A, e as bandas claras chamadas de banda I. Através do método de microscopia eletrônica de transmissão, podem ser observadas linhas escuras finas na região central das bandas I, estas chamadas de linhas Z. A disposição dos filamentos espessos, miosina, e finos, actina, entre um par de linhas Z, formam um padrão estrutural repetitivo representando a unidade estrutural do músculo esquelético, denominada de sarcômero (WATANABE, 1998; MOTOYAMA et al., 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TAJSHARGHI, 2008).

As miofibrilas são formadas por miofilamentos com espessura, comprimento e composição químicas diferentes. Na banda A, os filamentos de actina e miosina estão interposto, sendo que os filamentos de miosina chegam até o limite da banda A, e os de actina partem de cada linha Z, estendendo-se por 1 micrometro em cada direção para formar a banda I e, também parte da banda A. A porção média da banda A constitui a banda H, que apresenta apenas filamentos espessos. A linha M corresponde a uma estrutura transversal de união no meio da banda H, constituída por uma proteína fixadora de miosina que é envolta por seis filamentos de actina (GENESER, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TAJSHARGHI, 2008; MOTOYAMA et al., 2009).

Os sarcômeros das fibras musculares podem apresentar tamanhos e quantidades variadas da disposição em série entre fibras do mesmo grupamento muscular (VAN EIJDEN; KORFAGE; BRUGMAN, 1997).

A lâmina interna das fibras musculares apresenta filamentos de actina com distanciamento central de 12 nanômetros e orientação paralela à membrana plasmática. A lâmina interna apresenta-se conectada, morfológicamente, à lâmina

externa (lâmina densa) por uma grande quantidade de filamentos orientados com aproximadamente 2 a 8 nanômetros de diâmetro (TROTTER; EBERHARD; SAMORA, 1983).

O retículo sarcoplasmático liso consiste de uma rede de vesículas achatadas, esféricas e tubulares que se intercomunicam apresentando uma parede composta por membranas que delimita cavidades, estas formam as cisternas que constituem um sistema de túneis (CLARK et al., 2002).

Na fibra muscular esquelética, o retículo sarcoplasmático liso, forma o retículo denso de sarcotúbulos que circundam cada miofibrila. A maior parte destes sarcotúbulos seguem em sentido longitudinal em relação às bandas e se anastomosam entre si. Dois destes tubos circundam a miofibrila de ambos os lados de um tubo mais delgado, o túbulo transverso ou túbulo T denominado de tríade. Os túbulos T comunicam-se com o espaço extracelular, uma vez que são invaginações do sarcolema (GENESER, 1999).

O potencial de ação (estímulo neuromuscular) sobre o sarcolema das fibras musculares é, imediatamente, conduzido às miofibrilas através do sistema do túbulo T, que por sua vez, transmite o impulso para outro sistema, o retículo sarcoplasmático envolto pelos miofilamentos (SAWADA; ISHIKAWA; YAMADA, 1978). O potencial de ação propaga-se, através do túbulo T, com rapidez desde a superfície da fibra até o interior, onde favorece a liberação de íons de cálcio, à partir do retículo até o sarcoplasma circundante, produzindo a contração da fibra muscular (GENESER, 1999).

Os mecanismos de fornecimento de energia, necessários para as contrações de fibras musculares, são funcionalmente obtidos através da liberação de energia gradual das moléculas de ácidos graxos e glicose, produzindo calor e moléculas de ATP. A energia armazenada é utilizada pelas células musculares para a sua contração (CLARK et al., 2002).

As estruturas que constituem o músculo esquelético, por muitos anos, vêm sendo alvos de pesquisas para o conhecimento do amplo processo fisiológico do envelhecimento. Durante o envelhecimento ocorre perda progressiva da massa muscular esquelética e diminuição paralela da força e resistência muscular. Esta condição é denominada de sarcopenia, que implica em importantes investimentos e possível comprometimento sócio-cultural, uma vez que contribui para fragilidade,

perda funcional, dependências, deficiências, gastos elevados com a saúde e morte prematura (LANG et al., 2009).

O músculo esquelético é constituído por três diferentes tipos de fibras, sendo que as fibras do tipo I são de contração lenta e resistentes à fadiga, as fibras tipo IIA são de contração rápida e moderadamente resistentes à fadiga e, por sua vez, as fibras do tipo IIB são de contração rápida e não resistentes à fadiga. A densidade e a proporção desses tipos de miofibrilas são dinâmicas, variando entre grupamentos musculares simétricos, superficial e/ou em profundidade, em um determinado músculo e com alterações e/ou reversões na força muscular (GREFTE et al., 2007).

A força muscular diminui, principalmente, em indivíduos sedentários que se potencializa quando associada à sarcopenia. Uma grande proporção dessa atenuação ocorre pela diminuição da área de secção transversa e das fibras de contração rápida (tipo II), conseqüentemente, aumentando a incidência e propensão a quedas. Na literatura vigente há uma escassez de informações sobre a síntese protéica muscular e sua degradação com o envelhecimento presente em sarcopênicos, sendo estes determinantes para o equilíbrio e manutenção da massa muscular (LAMBERT; EVANS, 2002).

A composição do tipo de fibra muscular pode sofrer influência por diversos fatores, como predisposição genética, gênero e idade (ENGLISH et al., 1999). Numerosos estudos demonstram que os músculos esqueléticos de humanos sofrem alterações relacionadas com a idade, o tipo de fibra e a composição estrutural da cadeia pesada da miosina (ANDERSEN, 2003). Com envelhecimento ocorre aumento das fibras do tipo I e, concomitantemente, diminuição das fibras tipo II nos músculos dos membros inferiores e do tronco (MONEMI et al., 1999). Nos músculos cervicais, as alterações morfológicas que ocorrem com o envelhecimento são semelhantes aos músculos de outras regiões, conforme observações através de reação histoquímica, para localização mitocondrial de enzimas oxidativas do músculo esternomastóideo de ratos (CIENA et al., 2011).

Os mecanismos celulares e moleculares que causam a sarcopenia são múltiplos, sendo atribuído ao estresse oxidativo, inflamação, alterações endócrinas, inatividade e desnutrição (MENG; YU, 2010). Estes fatores continuam a ser pesquisados para futuras elucidações e associações entre outras patologias (THOMPSON, 2009).

Recentemente, foi sugerido que o estresse oxidativo, inflamações crônicas e disfunção mitocondrial desempenham participação importante na atrofia muscular relacionada ao envelhecimento. A interação desses fatores interfere em várias vias de sinalização intracelular, comprometendo o equilíbrio entre a síntese protéica e degradação, acarretando em apoptose celular (MENG; YU, 2010).

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre níveis oxidantes e anti-oxidantes. Durante o envelhecimento, tem sido demonstrada a predisposição do músculo esquelético a níveis maiores de estresse oxidativo, perante o repouso e durante a atrofia pelo desuso. Sugere-se que sua participação e mediação seja induzida pelo desuso e atrofia muscular observada na patogenia da sarcopenia (MENG; YU, 2010).

Quando verificados fatores isolados, observam-se alterações endócrinas presentes na sarcopenia, como a diminuição da secreção do hormônio de crescimento (GH) associada à diminuição da massa muscular com alterações na quantidade e diferenciação das células satélites (SHIBATA et al., 2010).

Uma das possíveis causas da diminuição progressiva da massa muscular associada ao declínio na eficiência regenerativa do músculo esquelético em indivíduos idosos, é a diminuição da quantidade e diferenciação das células satélites (VERDIJK et al., 2007), possivelmente em decorrência da morte celular por apoptose. Também tem sido sugerido que a ativação da proliferação e/ou diferenciação das células satélites podem sofrer alterações na sarcopenia (MALATESTA et al., 2010).

A senescência, a nível celular, é o crescimento irreversível e individual das células mitóticas, apresentando consequentes alterações em seu fenótipo. O comprometimento da função celular predispõe o tecido à progressão de patologias e/ou evolução gradual da senescência celular. No entanto, no passado, pesquisas no âmbito de elucidar os múltiplos mecanismos do envelhecimento empregaram e abordaram, separadamente, estudos do desenvolvimento de patologias (MENG; YU, 2010).

Recentemente, descobertas sobre os fenótipos relacionados à senescência e a capacidade de detectar estas células em seres humanos têm contribuído com avanços de novas descobertas referentes à fisiologia do envelhecimento, fator este

que contribuirá com estudos do desenvolvimento e progressão de diversas patologias (BURTON, 2009).

2.2 Tecido Tendíneo

Os tendões são estruturas anatômicas macroscópicas, presentes entre os músculos e os ossos, atuam transmitindo a força gerada pelas fibras musculares para o osso, sendo que assim possibilitam os movimentos articulares (KANNUS, 2000). Atuam na homeostasia dos organismos através das funções biomecânicas e biológicas críticas. Essas funções são desempenhadas através de uma relação recíproca entre os elementos celulares tendíneos e os extracelulares (BUTLER; JUNCOSA; DRESSLER, 2004).

Os músculos situados no esqueleto apendicular, geralmente, apresentam dois tendões presentes nas regiões distal e proximal. A região de união com o músculo é denominada de JMT e, a região de fixação com o osso é a osteotendínea. A inserção do tendão proximal ao osso é chamada de ponto fixo (fixação proximal), e a parte distal é denominada de ponto móvel (fixação distal) (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011).

As fibras tendíneas do músculo esquelético são estruturas constituídas por fibras colágenas paralelas distribuídas a partir da matriz extracelular (LIN; CARDENAS; SOSLOWSKY, 2004), permitindo aos tendões resistir e transmitir grandes forças entre os músculos e os ossos (TOZER; DUPREZ, 2005), possibilitando amplitudes de movimentos das articulações (VIDAL, 2003).

Os tendões apresentam-se com coloração branca, brilhante e textura fibro-elástico, revelando grande resistência para cargas mecânicas. Podem variar no formato e disposição, como são fixados aos ossos, como também, na largura e espessura de tendões cilíndricos, em forma de “leque” e “fita” (KJAER, 2004).

Músculos que realizam contrações vigorosas e elevadas forças de resistência, como o quadríceps e bíceps braquial, apresentam tendões planos e curtos, enquanto que aqueles que realizam movimentos delicados com elevada

destreza, como os flexores dos dedos, apresentam delgados e longos tendões (MOORE; DALLEY; AGUR, 2011).

Em comparação com os músculos, os tendões apresentam relativamente, limitados suprimento vascular, que corresponde a 2% de vasos sanguíneos na matriz extracelular. Estes vasos percorrem o epitendão e, longitudinalmente, dirigem-se para o endotendão, sendo que, o fornecimento proveniente de artérias e arteríolas percorre o perímio na região da JMT e dos demais vasos sanguíneos na junção osteotendínea (KJAER, 2004).

Estruturas adjacentes, também denominadas de extratendíneas, relacionam-se direta ou indiretamente com os tendões, atuam no controle dos movimentos, na estabilização articular e na prevenção de atritos dos tendões (KANNUS, 2000).

As bainhas fibrosas ou retináculos são constituídas por feixes delgados de tecido conjuntivo fibroso, com aspecto de faixas. Estas faixas formam canais, geralmente longos, através do qual, os tendões deslizam sendo que os exemplos clássicos são os retináculos dos extensores e flexores da mão e do pé (WATANABE, 2009).

As bainhas sinoviais são estruturas que envolvem os tendões em superfícies ósseas ou saliências anatômicas que podem causar atritos. São frequentemente encontradas ao redor dos tendões das mãos e dos pés. Sobre as camadas fibrosas, estas são constituídas por duas finas e serosas camadas denominadas visceral e parietal, visto que estas camadas formam uma estrutura fechada, incluindo o fluido peritendíneo para lubrificação. Em alguns tendões, como aqueles que não apresentam uma verdadeira bainha sinovial, podem apresentar uma camada peritendínea ("paratenon"), disposta externamente para reduzir atritos entre o fluido peritendíneo e o epitendão, sendo que este envolve o tendão (MAFFULLI; BARRASS; EWEN, 2000).

A camada peritendínea é constituída de tecido fibrilar frouxo que atua como envoltório elástico, permitindo livres movimentos do tendão contra tecidos adjacentes. O tendão calcâneo apresenta uma destacada camada peritendínea com delgadas membranas deslizantes (KANNUS, 2000).

As bursas tendíneas representam uma das principais estruturas extratendíneas que desempenham papel importante na redução dos atritos. As bursas estão localizadas em regiões anatômicas, onde proeminências ósseas

podem comprometer o deslizamento do tendão, e os exemplos clássicos de bursas são a subacromial, trocantérica, infrapatelar e retrocalcânea (KANNUS, 2000).

Ao nível microscópico, as células tendíneas, os tenoblastos e os tenócitos, representam cerca de 90-95% dos elementos celulares do tendão. Os demais elementos celulares presentes no tecido tendíneo são os condrócitos, presentes principalmente na região de inserção muscular, também conhecida como enteses e as células sinoviais provenientes das bainhas tendíneas (DORAL et al., 2010).

Em recém-nascidos, os tendões apresentam elevada proporção de células progenitoras. Os tenoblastos estão distribuídos ao longo do tendão e em disposições paralelas, apresentado tamanho e formatos variados. Alguns são alongados, outros ovais, e também, apresentam-se com formato poligonal (fusiforme). Em jovens, a diminuição gradual na proporção de células por matriz, pode ocorrer, e os tenoblastos assemelham-se, apresentando apenas o formato fusiforme (IPPOLITO et al., 1980; CHUEN et al., 2004).

O tamanho dos tenoblastos varia em seu comprimento, de 20µm para 70µm e de 8 µm para 20 µm sua largura. Os formatos dos núcleos variam de ovóides para alongados, com aspecto fusiforme. Os retículos endoplasmáticos rugosos e os complexos de Golgi são bem desenvolvidos, com poucas mitocôndrias observadas em seu citoplasma. Nos tenoblastos, as vesículas pinocíticas e os poucos lisossomos podem ser observados perifericamente em seu citoplasma. São evidenciados vários processos citoplasmáticos delgados e longos, que se estendem pela matriz. Os tenoblastos contêm um notável número de organelas citoplasmáticas e, estabelecem comunicações intercelulares com outros tenoblastos através de junções desmossomiais ou do tipo “gap” (WAGGETT; BENJAMIN; RALPHS, 2006).

As fibras elásticas imaturas estão adjacentes aos núcleos centrais amorfos bem desenvolvidos, e quando presentes podem ser notadas em proximidade com a membrana plasmática. Ao redor dos tenoblastos, estruturas eletrodensas granulares também podem ser encontradas com semelhança aos proteoglicanas da matriz (IPPOLITO et al., 1980).

Todas estas características morfológicas dos tenoblastos suportam o conceito da atividade metabólica elevada dessas células como, por exemplo, a intensa síntese dos elementos da matriz (STANLEY et al., 2007).

Com o envelhecimento, a proporção de células por matriz diminui gradualmente e, diversas outras alterações ocorrem com as células tendíneas. Em adultos, a proporção de células por matriz diminui progressivamente e, estas células, passam a serem denominadas de tenócitos, sendo que estes apresentam formatos mais alongados (IPPOLITO et al., 1980).

Os tenoblastos transformam-se em tenócitos e, ocasionalmente podem ocorrer o inverso, tornando-se alongados com cerca de 80 a 300 µm de diâmetro. A proporção do núcleo aumenta em relação ao citoplasma e, os processos celulares (2-10 µm de diâmetro) tornam-se extensões longas e delgadas a partir do corpo celular. Em secções transversas, o aspecto morfológico dos tenócitos e suas projeções assemelham-se com uma aranha. Os processos celulares longos são necessários para manter o estreito contato entre as células, e os componentes da matriz, para compensar a diminuição das células e aumento expressivo da matriz tendínea durante o envelhecimento (MOORE; DE BEAUX, 1987).

Os tenócitos também são conhecidos por células tendíneas fusiformes, que são os tipos celulares primárias encontradas no tendão. Estas células são supridas por uma intrincada rede microvascular que lhes permite manter em seu ambiente extracelular (AMIEL et al., 1984; KNOBLOCK, 2008).

Na região de inserção tendínea observam-se, por variações existentes no fenótipo celular, células com formato mais arredondadas do que fusiformes (RUFAL; RALPHS; BENJAMIN, 1995). Nas áreas de fibrocartilagem de contato, onde o tecido tendíneo é envolvido pelo tecido ósseo, há o predomínio de tenócitos com formatos ovóides (FALLON et al., 2002).

Os núcleos dos tenócitos são alongados e suas proporções volumosas, ocupando quase que por completo o comprimento celular. A cromatina condensada nuclear está disposta à margem da membrana nuclear. Os filamentos de actina e miosina intracitoplasmáticos juntamente às vesículas pinocitóticas podem ainda ser detectadas nos tenócitos, embora esses elementos sejam mais característicos dos tenoblastos (JÓZSA et al., 1979).

Os tenócitos sintetizam uma grande variedade de proteínas na matriz extracelular. Entre os mais prolíficos dessas proteínas é o colágeno, que é organizado em um arranjo paralelo. No nível macroestrutural, o tecido colágeno do tendão consiste em paralelos e frisados feixes primários e secundários (fascículos),

sendo que, este diminui drasticamente próximo à região de inserção tendínea (BUTLER et al., 1990).

Os componentes bioquímicos da matriz extracelular do tendão revelam principalmente colágeno tipo I, juntamente com as glicoproteínas. O colágeno tipo I representa aproximadamente 95 % de todos os colágenos presentes, 65-80% da massa seca do tendão (AMIEL et al., 1984).

Os outros diversos tipos de colágenos presentes no tecido tendíneo são menos comuns, porém desempenham papéis fundamentais, como por exemplo, o colágeno tipo V que copolimeriza com o colágeno tipo I para regular o diâmetro da fibrila durante sua formação, desenvolvimento (LINSENMAYER et al., 1993) e envelhecimento (DRESSLER et al., 2002). O tipo III aumenta a síntese de colágeno durante a reparação precoce, mas acredita-se que, em seguida, diminui à medida que o novo colágeno tipo I é sintetizado e organizado (NIYIBIZI et al., 2000).

O envelhecimento resulta na perda progressiva de mobilidade com comprometimento na qualidade de vida. Um componente importante desta perda de mobilidade é devido à fraqueza muscular progressiva, maior susceptibilidade à lesões e à longos períodos de recuperação. Recentemente, foi reconhecido que com o envelhecimento, além das alterações músculo esqueléticas, ocorre o comprometimento nas propriedades mecânicas dos tendões, que contribuem com a fraqueza e perda de mobilidade em idosos. Além disso, os mecanismos moleculares e celulares que implicam nessas alterações, não estão compreendidos por completo (NARICI et al., 2008).

2.3 Junção Miotendínea

As descrições morfológicas iniciais da região da JMT relataram que as fibras musculares geralmente apresentam, nas suas extremidades, uma estrutura pontiaguda, ou melhor, uma espécie de cone com vértice de “espuma”. Observam-se, em alguns casos, a extremidade com formato arredondada em forma de solidéu, com base alargada e com a extremidade bifurcada ou dividida em múltiplos pontos,

mas estas disposições são excepcionais (TESTUT, 1911). A figura 1 ilustra as descrições morfológicas macroscópicas da região da JMT.

Figura 1- Representação da organização da região da JMT

Fonte: (TESTUT, L., 1911).

Legenda: Na extremidade da fibra muscular e sua interação com o tendão revela o formato cônico e a presença de bifurcações.

A região de interface entre os tecidos muscular e o tendão é denominada de JMT. Esta é uma região de transição, altamente especializada e complexa do sistema músculo-esquelético, que apresenta delimitações ao revelar dobras no sarcolema (TIDBALL, 1991).

As extremidades das fibras musculares que se relacionam com o tecido tendíneo são caracterizadas por apresentarem profundas invaginações nas membranas das células musculares, pelo qual, a área de superfície da extremidade da fibra muscular apresenta-se extremamente alargada (AJIRI et al., 1978).

A principal função da JMT é a transmissão de força, gerada nas contrações musculares pelas proteínas contráteis intracelulares, para as proteínas do tecido conjuntivo extracelular presentes no tecido tendíneo (KANNUS et al., 1992).

Além de apresentar funções como no controle de movimentos, posicionamento e estabilização articular, atua com ações na força motriz, sinérgicos ou antagonistas, e no armazenamento e liberação de energia elástica (TROTTER, 2002).

As JMT são funcionalmente especializadas na medida em que nessa região da fibra muscular são adicionados ou excluídos os sarcômeros durante o crescimento ou após a atividade física (WILLIAMS; GOLDSPINK, 1973). É a principal região do músculo esquelético, predisposto à lesões durante esforços excessivos e em contrações excêntrica (TIDBALL; SALEM; ZERNICKE, 1993).

Durante seu desenvolvimento, a JMT sofre influência direta através da interação entre os mioblastos e os elementos da matriz extracelular, bem como, a regularização pela sinalização local através da distribuição heterogênea do ácido retinóico. Durante a miogênese dos músculos dos membros de aves a taxa relativa de tecido tendíneo e muscular é regulada pela síntese, equilíbrio e degradação do ácido retinóico. Este ácido retinóico desempenha o sinal apoptótico para o tecido muscular e é também necessário para a manutenção do tendão, de modo que, o desenvolvimento da JMT ocorre através de interações entre células do músculo esquelético precursoras e os elementos da matriz extracelular (RODRIGUEZ-GUZMAN et al., 2007).

A formação da JMT sofre influência através da tensão gerada pelas contrações musculares durante os estágios embrionários finais e neonatais iniciais, com evolução gradual e contínua (BENJAMIN; RALPHS, 2000; YAMASHITA et al., 2007; KOSTROMINOVA et al., 2009).

Os aspectos morfológicos clássicos, que constituem a JMT são caracterizados por apresentar inúmeras projeções sarcoplasmáticas, na extremidade da fibra muscular, direcionadas para a região da matriz extracelular (ABOU SALEM et al., 1993). Estas projeções proporcionam aumento na área de superfície para fixação das fibras musculares para o tecido conjuntivo do tendão (DECONINCK et al., 1997; HUIJING, 1999).

Estudos recentes têm demonstrado e destacado outras características morfológicas na região da JMT, como estruturas adjacentes às projeções, denominadas de invaginações sarcoplasmáticas que também são conhecidas como “interdigitações”, observadas no músculo pterigóideo medial. As invaginações sarcoplasmáticas são longas e delgadas estruturas provenientes da matriz extracelular, constituída de tecido conjuntivo que aumentam a área de superfície de fixação do tecido tendíneo para o muscular (CIENA et al., 2010).

A região da JMT apresenta áreas com sub-especialidades de invaginações sarcoplasmáticas em vários níveis, em direção ao ventre muscular. Longas ramificações destas invaginações, dispostas obliquamente comunicam-se nas regiões centrais da fibra muscular. Invaginações sarcoplasmáticas são observadas, também, nas margens laterais da extremidade da fibra muscular, estruturas estas, denominadas de junções laterais. Além dos grupamentos mitocôndrias intermiofibrilar e subsarcolemal, observaram-se grupamentos entre feixes de fibras colágenas (microtendões) e volumosos núcleos dos tenócitos dispostos paralelamente.

As características descritas recentemente sobre a região da JMT revelaram adaptações e/ou evoluções presentes nos diversos músculos esqueléticos conforme sua topografia, sintopia, funções, disposições e composição histoquímica das fibras do músculo em questão (CIENA et al., 2011).

As características morfológicas ultraestruturais da JMT entre o ventre anterior do músculo digástrico e o tendão intermediário de ratos Wistar adultos, são observados na figura 2.

Figura 2 - Fotomicrografia eletrônica de transmissão da JMT de ratos Wistar adultos

Fonte: (CIENA et al. 2012 – Micron, v. 43, p. 258–262).

Legenda: Região da JMT do ventre anterior do músculo digástrico de ratos Wistar adultos evidenciando as características clássicas da interface, desde a extremidade cônica da fibra muscular, grupamentos mitocondriais e, em destaque, os vários níveis das invaginações sarcoplasmáticas.

As alterações morfológicas ultraestruturais nos componentes da JMT do músculo sóleo foram reportadas, após sofrerem abruptamente ausência na tensão após tenotomia total do tendão calcâneo. Na extremidade das fibras musculares, a região de JMT sofreu alterações morfológicas extensas, com semelhanças das adaptações que ocorrem no ventre muscular após tenotomia, provavelmente, em decorrência da diminuição do tônus muscular e ausência de transmissão de forças (ABOU SALEM; FUJIMAKI; ISHIKAWA, 1993).

A JMT dos músculos extensor digital longo e gastrocnêmio, músculos situados nos membros inferiores, foram analisadas em ratos treinados por períodos prolongados e apresentaram amplas adaptações significativas com espessamento e aumento das invaginações sarcoplasmáticas (CURZI et al., 2012).

Recentemente, estudos têm demonstrado interesse nesta estrutura especializada do sistema muscular esquelético, por apresentar elevado nível de plasticidade tecidual, ou seja, adaptações morfológicas foram observadas na região da JMT dos músculos tibial anterior e gastrocnêmio, após a indução ao treinamento aeróbico em esteiras por períodos prolongados, nestes músculos que apresentam funções e composições bioquímicas miofibrilares diferentes. As adaptações iniciais, encontradas nas JMT após exercícios físicos, são referentes ao aumento expressivo da quantidade das invaginações sarcoplasmáticas e profundidade dos seus respectivos níveis (KOJIMA et al., 2008).

A JMT apresenta constante atividade e predisposição à incidência de lesões, nas variadas faixas etárias, decorrentes desde lesões desportivas à inatividade física, no entanto, com escassez de descrições morfológicas. Portanto, os resultados deste estudo têm por finalidade acrescentar descrições morfológicas dos elementos estruturais e ultraestruturais desde o nascimento ao envelhecimento e, contribuir futuramente com a prevenção de lesões e intervenções terapêuticas na região da JMT.

OBJETIVO GERAL

3 OBJETIVO GERAL

O presente estudo consiste em descrever as características morfológicas da junção miotendínea do músculo esternomastóideo de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos.

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Descrever os aspectos estruturais da JMT, empregando os métodos de microscopia de luz, através da coloração de azul de Toluidina 1% e Picro-sírius;
- ✓ Descrever as características tridimensionais da JMT, empregando o método de Microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Descrever as características ultraestruturais da JMT, empregando o método de microscopia eletrônica de transmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos adultos da linhagem *Wistar*, alocados em três diferentes grupos:

- ✓ **Grupo Recém-nascido** (n=10): animais com 5 dias de vida;
- ✓ **Grupo Adulto** (n=10): animais com 4 meses de idade;
- ✓ **Grupo Idoso** (n=10): animais com 24 meses de idade.

Todos os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais permaneceram alojados em gaiolas de contenção de polipropileno, agrupados em números de quatro, com água e ração “*ad libitum*”, mantidos em períodos claro/escuro de 12 horas, à temperatura média de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos os procedimentos adotados neste estudo foram previamente submetidos e aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP), protocolo nº 083 e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, protocolo nº 2772.

4.2 Microscopia de Luz

Foram utilizados 4 animais de cada grupo experimental, submetidos à anestesia com Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal. Os músculos EM, bilateralmente, foram dissecados e fixados em formol 10% durante 48h. Após este período as amostras da região da JMT foram submetidas à desidratação em séries crescentes de álcoois (70% ao absoluto) e incluídas em

parafina histológica. Foram realizados cortes longitudinais de 6 μ m de espessura e corados com a técnica de Picro-sírius para identificação do tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os cortes corados com Azul de Toluidina 1% foram obtidos mediante aos blocos de Resina Spurr processados para microscopia eletrônica descrita em detalhes a seguir. A aquisição das imagens foi obtida através do microscópio de luz (Carl Zeiss Microimaging, Axiokop 40, Göttingen, Germany).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram utilizados 2 animais de cada grupo experimental, anestesiados com Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, perfundidos com a solução de *Karnovsky* modificada contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em solução Tampão Fosfato de sódio a 0,1M pH 7,4 durante 24h, à 4°C de acordo com o método relatado por Watanabe e Yamada (1983). Os músculos EM, bilateralmente, foram dissecados e as amostras da JMT foram fixadas na mesma solução durante 3 horas à temperatura de 4°C. As amostras foram submetidas à técnica de criofratura, mediante ao congelamento em nitrogênio líquido (WATANABE, OGAWA; YAMANDA, 1989). As amostras criofraturadas foram lavadas de 12 a 24 horas em solução tampão fosfato de sódio e, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio, sendo desidratadas em série crescente de álcool (60% ao absoluto), seguida de imersão em solução de acetato de isoamila 3h à 4°C, e secas em aparelho ponto crítico Balzers CPD-30, utilizando CO₂ líquido. As amostras foram montadas em bases metálicas apropriadas e cobertas com íons de ouro em aparelho Balzers SCD-040, e examinadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram utilizados 4 animais de cada grupo experimental, sendo estes submetidos à anestesia com Ketamina (50 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal, seguida de perfusão transcardíaca com solução fixadora de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em solução Tampão Fosfato de sódio a 0,1M pH 7,4).

Os músculos EM, bilateralmente, foram dissecados e a região da JMT imersa em solução fixadora durante 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram, por três vezes, lavadas com solução de tampão fosfato de sódio e pós-fixadas com a solução de tetróxido de ósmio a 1%, durante 2 horas, à 4º C. Novamente, as peças foram lavadas em solução de tampão fosfato de sódio e contrastadas com a solução aquosa de acetato de uranila à 0,5%, durante 12 horas, à temperatura ambiente e na ausência de luminosidade. Em seguida, as amostras foram submetidas à desidratação em série crescente de álcoois, a partir do 70%, 80% 90% e 95% (1x), álcool etílico absoluto (4x) com banhos de 15 minutos cada, e óxido de propileno (2x) por 15 minutos.

Após a desidratação as amostras permaneceram por 4 horas em uma mistura de resina (Low Viscosity Embedding Média Spurr's Kit, Electron Microscopy Sciences, USA) e óxido de propileno na proporção de 1:1, sob agitação, em temperatura ambiente para gradativa infiltração de resina no material. Em seguida, a mistura foi trocada por resina pura, permanecendo por 12 a 18 horas, sob agitação, em temperatura ambiente. Após esse período, a resina foi novamente trocada por resina pura, juntamente com as amostras, e aquecidas por 1 hora em estufa a 37°C, com frasco aberto para total evaporação de líquidos do material.

Para o procedimento de inclusão das amostras em moldes retangulares de silicone, estes foram preenchidos por resina pura e, mantidos por 5 dias em estufa a 60°C, a fim de concretizar-se a polimerização do bloco.

Obtidos os blocos de resina, estes foram trimados para a realização de cortes semifinos (300 micrometros) em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Germany), e corados pelo método de azul de toluidina 1%. As imagens

histológicas foram obtidas por meio do fotomicroscópio Carl Zeiss Microimaging (Axiokop 40, Göttingen, Alemanha).

Posteriormente, selecionada a área de interesse, foi realizado cortes ultrafinos (60 nanômetros) em ultramicrotomo, que foram coletados em telas de cobre de 200 “mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uranila à 4%, por 3 minutos (WATSON, 1958; WATANABE; YAMADA, 1983), lavados em água destilada, contrastados com a solução aquosa de citrato de chumbo à 0,4%, por 3 minutos e lavando em seguida com água destilada (REYNOLDS, 1963; WATANABE; YAMADA, 1983). As telas foram examinadas aos microscópios eletrônicos de transmissão FEI-Morgagni 268D e JEOL 1010, Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP e Instituto de Ciências Biomédicas respectivamente.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados das análises microscópicas das junções miotendíneas do músculo EM dos animais dos grupos Recém-nascido, Adulto e Idoso, serão apresentados na seguinte ordem: microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

5.1 Microscopia de Luz

As características morfológicas da região da JMT do músculo EM foram descritas através da técnica rotineira de histologia das amostras embebidas em resina, coradas em solução de Azul de toluidina 1%, e em parafina, coradas com Picro-sírius.

5.1.1 Grupo Recém-nascido

Os cortes histológicos longitudinais revelaram a região de interface da JMT entre as fibras musculares e os elementos da matriz extracelular do tecido tendíneo. Nota-se o desenvolvimento das células musculares com seus núcleos volumosos, dispostos na região central e perifericamente, e no interstício a presença de inúmeros fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 3). No tecido tendíneo observam-se a presença de tenoblastos e tenócitos com seus núcleos volumosos e as comunicações intercelulares, provenientes das projeções citoplasmáticas do corpo celular (Figuras 3 e 4). Em maior aumento, notam-se, na região proximal da JMT, a disposição das células tendíneas com destaque aos núcleos ovais dos tenoblastos e com formatos variados dos núcleos dos tenócitos (Figura 4). Na figura 5, observam-se a disposição longitudinal de delgadas fibras musculares e de fibras colágenas associadas interpostas e adjacentes na região da JMT. Sob luz polarizada, notam-se em esverdeado fibras colágenas (Tipo III) no tecido tendíneo (Figura 6).

Figura 3 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se, entre as células musculares (M) no interstício, a presença de fibroblastos e vasos sanguíneos (*). No tecido tendíneo (T), notam-se a disposição dos tenoblastos (setas) com seus núcleos volumosos. Coloração: Azul de Toluidina 1%. Barra: 10 μm.

Figura 4 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: No tecido tendíneo (T), notam-se os tenoblastos (setas) com núcleos ovais e os tenócitos (cabeças de setas) com formatos variados. Coloração: Azul de Toluidina 1%. Barra: 10 μm.

Figura 5 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se a disposição das células musculares (setas) e fibras colágenas do tendão (T). Coloração: Picro-sírius. Barra: 10 μ m.

Figura 6 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Sob luz polarizada, notam-se a disposição das fibras musculares (setas) e das fibras colágenas do tendão (T). Coloração: Picro-sírius. Barra: 10 μ m.

5.1.2 Grupo Adulto

Os cortes histológicos longitudinais revelaram na região de interface da JMT, a organização e a disposição paralela das fibras musculares na fase adulta. Notam-se a completa formação das células musculares através do arranjo das estriações transversais organizadas em séries e, em suas extremidades, as fibras musculares apresentam-se com formatos cônicos. No interstício, notam-se a presença de um fibroblasto e de vasos sanguíneos (Figura 7).

Na JMT, notam-se a região de interface, ao evidenciar as extremidades das fibras musculares com disposição oblíqua em relação ao tecido tendíneo. No tecido tendíneo, observam-se ampla área de tecido conjuntivo denso, e a disposição paralela dos tenócitos, com longas projeções citoplasmáticas (Figura 8).

Entre as fibras e feixes do tecido muscular notam-se os envoltórios musculares constituídos de tecido conjuntivo, adjacentes à ampla faixa de fibras colágenas do tendão (Figura 9).

Sob luz polarizada observam-se em vermelho as fibras colágenas que constituem os envoltórios do tecido muscular, principalmente, o endomísio e perimísio. Na extremidade da fibra muscular notam-se ampla faixa de tecido conjuntivo fibroso que constitui o tendão em tonalidades esverdeado (Tipo III) e alaranjado (Tipo I) (Figura 10).

Figura 7 – Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte muscular da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se a organização e disposição paralela das fibras musculares (M) e, no interstício, a presença do fibroblasto (seta) e de vasos sanguíneos (*). Coloração: Azul de Toluidina 1%. Barra: 10 μm.

Figura 8 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se a organização das junções miotendíneas (*) e, no tecido tendíneo (T), a disposição dos tenócitos (setas) e suas longas projeções citoplasmáticas (cabeças de setas). Coloração: Azul de Toluidina 1%. Barra: 10 μm.

Figura 9 – Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte muscular da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se as fibras musculares (M), fibras colágenas do perimísio (setas), endomísio (cabeça de seta) e ampla área de tecido conjuntivo do tendão (T). Coloração: Picro-sírius. Barra: 100 μ m

Figura 10 – Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte muscular da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Sob luz polarizada, notam-se as fibras musculares (M), fibras colágenas do perimísio (setas), endomísio (cabeça de seta) e ampla área de tecido conjuntivo do tendão (T). Coloração: Picro-sírius. Barra: 100 μ m

5.1.3 Grupo Idoso

Os cortes histológicos longitudinais revelam a região de interface da JMT entre a fibra muscular e os elementos da matriz extracelular do tecido tendíneo. Em destaque, notam-se alterações morfológicas na fibra muscular com desorganização e espessamento das projeções do tecido tendíneo, no nível da JMT. Na extremidade da parte tendínea da JMT, notam-se a presença de tenócitos com núcleos volumosos (Figura 11).

No tecido tendíneo, observam-se o seu espessamento através da ampla área de tecido conjuntivo denso e a diminuição da quantidade e alterações nos formatos dos tenócitos (Figura 12).

Na interface da JMT, entre as fibras e feixes do tecido muscular, notam-se os envoltórios musculares constituídos de tecido conjuntivo, adjacentes à ampla faixa de fibras colágenas do tendão (Figura 13).

Sob luz polarizada observam-se em vermelho as fibras colágenas que constituem os envoltórios do tecido muscular, principalmente, o perimísio. Na extremidade da fibra muscular notam-se ampla faixa de tecido conjuntivo fibroso que constitui o tendão, em tonalidade alaranjado (colágeno Tipo I) (Figura 14).

Figura 11 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se na interface, entre a fibra muscular (M) e o tecido tendíneo (T), desorganização da JMT (*) com destaque aos tenócitos (setas) com formatos variados. Coloração: Azul de Toluidina 1%. Barra: 10 μm.

Figura 12 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se ampla área de tecido conjuntivo denso do tecido tendíneo (T) e alterações nos formatos dos tenócitos (setas). Coloração: Azul de Toluidina 1%. Barra: 10 μm.

Figura 13 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se as fibras musculares (M), fibras colágenas do perímio (setas) e ampla área de tecido conjuntivo do tendão (T). Coloração: Picro-sírius. Barra: 100 µm

Figura 14 - Microscopia de luz. Corte histológico longitudinal da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Sob luz polarizada observam-se os feixes de fibras colágenas (setas) entre as fibras musculares (M) e a ampla área de tecido conjuntivo do tendão (T). Coloração: Picro-sírius. Barra: 100 µm

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As características estruturais através dos aspectos tridimensionais da superfície da região da JMT de ambos os grupos foram evidenciados.

5.2.1 Grupo Recém-nascido

Os aspectos tridimensionais da região da JMT do músculo EM, do Grupo Recém-nascido, foram obtidos mediante a técnica de criofratura, que possibilitou evidenciar as características morfológicas estruturais, ao revelar a disposição longitudinal das delgadas fibras musculares do fascículo, dispostas em direção ao tecido tendíneo (Figura 15).

Em maior aumento, notam-se os aspectos e a organização paralela das fibras musculares no fascículo próximo à região de interface da JMT. (Figura 16).

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se a disposição longitudinal das fibras musculares (M) adjacentes às fibras colágenas do tendão (T). Barra: 300 μm.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se a disposição longitudinal das fibras musculares (M) adjacentes às fibras colágenas do tendão (T). Barra: 100 μm.

5.2.2 Grupo Adulto

Os aspectos tridimensionais da região da JMT do músculo EM, do Grupo Adulto, foram obtidos mediante a técnica de criofratura, que possibilitou evidenciar as características morfológicas estruturais, ao revelar a disposição transversal das fibras musculares, organizadas em fascículos. Estes fascículos de fibras musculares são envolvidos por feixes de fibras colágenas que constituem o perímio (Figura 17).

Em maior aumento, notam-se os aspectos tridimensionais das fibras musculares e adjacentes a estas, o arranjo das fibras colágenas que constituem o tecido tendíneo (Figura 18).

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se os fascículos musculares (M) adjacentes às fibras colágenas do tendão (T). Barra: 200 µm.

Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se fibras colágenas do tecido tendíneo (T) e a organização das fibras musculares no fascículo (M). Barra: 100 µm.

5.2.3 Grupo Idoso

Os aspectos tridimensionais da região da JMT do músculo EM, do Grupo Idoso, foram obtidos mediante a técnica de criofratura, que possibilitou evidenciar as características morfológicas estruturais, ao revelar em disposição longitudinal das fibras musculares e a ampla área de tecido conjuntivo denso do tecido tendíneo (Figura 19).

Em maior aumento, notam-se os aspectos tridimensionais das fibras musculares, em disposição oblíqua ao espesso feixe do tecido tendíneo, e superficialmente, o arranjo das fibras colágenas (Figura 20).

Figura 19 – Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se as fibras musculares (M), dispostas longitudinalmente em direção à ampla área de tecido conjuntivo denso do tecido tendíneo (T). Barra: 1mm.

Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura. Aspecto tridimensional da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se as fibras musculares (M) em disposição oblíqua ao espesso feixe do tecido tendíneo (T). Barra: 300 µm.

5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As características ultraestruturais da região da JMT de ambos os grupos foram evidenciados.

5.3.1 Grupo Recém-nascido

Ao examinar as secções ultrafinas, da região da JMT dos músculos EM revelaram os primórdios do desenvolvimento pós-termo e a organização tecidual ao observar células musculares em elevada atividade celular, com numerosas mitocôndrias ovais aglomeradas, sendo delimitadas pela membrana sarcoplasmática sem distinção entre grupamentos. Na matriz extracelular, foi possível evidenciar entre as células musculares, capilares sanguíneos com os núcleos das células endoteliais (Figura 21). Em maior aumento, observaram-se mitocôndrias ovais, evidenciando suas cristas de dupla membrana (Figura 22).

Na matriz extracelular, notam-se a presença do tenoblasto, com seu núcleo oval, mitocôndrias ovais e o retículo endoplasmáticos rugoso no citoplasma celular (Figura 23). Em maior aumento, adjacente ao núcleo do tenoblasto, notam-se o proeminente complexo de Golgi, presença de vesículas e filamentos de actina e miosina intracitoplasmáticos (Figura 24).

Na extremidade lateral da célula muscular, observam-se dobras na membrana sarcoplasmáticas formando junções laterais (Figura 25).

Na extremidade distal da célula muscular, notam-se a disposição longitudinal dos feixes de miofibrilas, com pequenas mitocôndrias ovais, dispersas na região do desenvolvimento da JMT. Nesta interface, observam-se curtas e delgadas dobras na membrana sarcoplasmática, formando invaginações e evaginações (Figura 26).

Figura 21 - Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se, na extremidade das fibras musculares, aglomerados de mitocôndrias (M) e, no interstício, a presença de vasos sanguíneos evidenciando os núcleos (N) das células endoteliais. Barra: 5 µm.

Figura 22 - Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se, em destaque, mitocôndrias ovais evidenciando suas cristas de dupla membrana (setas). Barra: 0,5 µm.

Figura 23 - Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Observam-se no citoplasma do tenoblasto, o núcleo (N), as mitocôndrias (setas) e o retículo endoplasmático rugoso (RER). Barra: 2 µm.

Figura 24 - Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se, adjacente ao núcleo (N) do tenoblasto, a presença de vesículas (setas), complexo de Golgi (CG) e filamentos de actina e miosina intracitoplasmáticos (*). Barra: 0,5 µm.

Figura 25 - Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT lateral do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se, na extremidade lateral da célula muscular (M), delgadas dobras (setas) no sarcolema. Barra: 2 µm.

Figura 26 - Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Recém-nascido

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se, na extremidade da célula muscular (M), invaginações (setas) e, evaginações (cabeças de setas) no sarcolema. Barra: 1 µm.

5.3.2 Grupo Adulto

Ao analisar a região da JMT dos músculos EM, do Grupo Adulto, observaram a disposição longitudinal dos feixes de miofibrilas, os sarcômeros em séries, alinhados com mitocôndrias ovais aos pares, adjacentes à linha Z. Na extremidade celular notam-se, na interface músculo-tendão, longas invaginações, evaginações sarcoplasmáticas e, grupamentos de mitocôndrias entre feixes de fibras colágenas (Figura 27).

Entre os feixes de miofibrilas, foi possível evidenciar vários níveis de invaginações sarcoplasmáticas, que caracterizam subespecializações, em algumas ocasiões, apresentaram-se mais longas em relação aos sarcômeros e, delimitados por feixes de fibras colágenas grupamentos de mitocôndrias (Figura 28).

No tecido tendíneo, notam-se a organização das fibras colágenas e a disposição dos tenócitos comunicando-se através de projeções citoplasmáticas (Figura 29). Em maior aumento, observaram-se entre feixes de fibras colágenas, o núcleo alongado do tenócito, as mitocôndrias (Figura 30), as vesículas e o complexo de Golgi, presentes no citoplasma celular (Figura 31).

Na JMT, observam-se longas evaginações sarcoplasmáticas, entremeados pelas invaginações, formadas por fibras colágenas provenientes da matriz extracelular (Figura 32).

Figura 27 - Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se fibras colágenas (C) na interface entre o tecido tendíneo e os sarcômeros em série (*). Entre feixes de fibras colágenas, observam-se agrupamentos de mitocôndrias (M). Barra: 5 µm.

Figura 28 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se os níveis das invaginações sarcoplasmáticas (setas) adjacentes aos agrupamentos de mitocôndrias (M). Barra: 2 µm.

Figura 29 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se a disposição dos tenócitos, com seus núcleos alongados (N), comunicando-se através de projeções citoplasmáticas (seta), entre feixes de fibras colágenas (C) do tecido tendíneo. Barra: 2 µm.

Figura 30 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se entre fibras colágenas (C), a presença do tenócito evidenciando no citoplasma mitocôndria (seta) e o núcleo (N). Barra: 2 µm.

Figura 31 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se parte citoplasmática do tenócito, entre fibras de colágeno (C), observando, em destaque, a presença de vesículas (seta) e o Complexo de Golgi (CG). Barra: 1 µm.

Figura 32 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Adulto

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se as longas evaginações (cabeças de setas), entremeados pelas invaginações sarcoplasmáticas (setas). Barra: 1 µm.

5.3.3 Grupo Idoso

Ao analisar a região da JMT do músculo EM, do Grupo Idoso observaram-se o aspecto geral, ao revelar diminuição dos tenócitos e ampla área de depósito de colágeno do tecido tendíneo e espessamento da JMT lateral (Figura 33).

Na extremidade da celular muscular, notam-se estreitamento com formato cônico, aumento expressivo de depósito de colágeno adjacente e, alterações morfológicas no formato da JMT. Apresentaram formatos variados com as invaginações e evaginações sarcoplasmáticas curtas e espessas. Na ampla área de depósito de colágeno, observaram-se os núcleos dos tenócitos, com disposições e comprimentos variados dos níveis de invaginações sarcoplasmáticas, estes apresentando ramificações (Figura 34).

As JMT laterais apresentam comunicações centrais, provenientes das invaginações sarcoplasmáticas com formatos variados. Estas foram observadas, lateralmente, através de feixes espessos de fibras colágenas nas extremidades das células musculares e, adjacente a estas, notou-se ampla área de depósito de colágeno (Figura 35).

Na região central da célula muscular, em direção ao ventre muscular, evidenciaram-se vários níveis de invaginações s formando comunicações espessas latero-laterais, angulares e comunicando-se com as junções laterais (Figura 36).

Em destaque, nota-se no tecido tendíneo, ampla área de depósito de colágeno com a presença de parte citoplasmática do tenócito (Figura 37).

Em maior aumento, revelaram espessamento das invaginações sarcoplasmáticas com formatos irregulares, constituídas por feixes de fibras colágenas, dispostas transversalmente e longitudinalmente, provenientes da matriz extracelular e as evaginações sarcoplasmáticas, com formatos irregulares, constituídos por feixes de miofibrilas delimitados pela membrana sarcoplasmática (Figura 38).

Figura 33 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se ampla área de depósito de colágeno (C), com espessamento na JMT lateral (setas), na extremidade das células musculares (M). Barra: 10 µm.

Figura 34 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Notam-se os núcleos (N) dos tenócitos, na ampla área de depósito de colágeno (*), com alterações nos formatos das invaginações (setas) e evaginações sarcoplasmáticas (cabeça de seta). Barra: 2 µm.

Figura 35 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2012).

Legenda: Notam-se ampla área de depósito de colágeno (*), comunicações centrais (cabeças de setas) e invaginações sarcoplasmáticas (setas) com formatos variados. Barra: 2 µm.

Figura 36 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da região da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2012).

Legenda: Notam-se a longa extensão das JMT laterais (cabeças de setas) com espessamento, formando comunicações centrais (setas) em direção ao ventre muscular, adjacente à ampla área de depósito de colágeno (C). Barra: 2 µm.

Figura 37 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da parte tendínea da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A. P., 2013).

Legenda: Na ampla área de depósito de colágeno (C), observou-se parte citoplasmática (seta) do tenócito. Barra: 2 µm.

Figura 38 – Microscopia eletrônica de transmissão. Aspecto ultraestrutural da JMT do músculo EM do Grupo Idoso

Fonte: (CIENA, A.P., 2013).

Legenda: Observam-se espessamento das fibras colágenas (C) com alterações nas invaginações (cabeças de setas) e evaginações sarcoplasmáticas (setas). Barra: 1 µm.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram as características morfológicas, em destaque, os aspectos estruturais e ultraestruturais da região da JMT do músculo EM de ratos Wistar recém-nascidos, adultos e idosos.

Sabe-se que o músculo esternocleidomastóideo em humanos está disposto na região cervical, é constituído por dois ventres musculares e inserção no processo mastóide, com amplas funções na movimentação das articulações crânio-vertebrais e na inspiração como musculatura acessória (SOBOTKA; MU, 2010). No entanto, de acordo com Diogo et al., (2008), em mamíferos roedores como os ratos Wistar, os músculos homólogos ao esternocleidomastóideo são separados por uma delgada membrana de tecido conjuntivo, dispostos paralelamente sendo o EM disposto antero-medial e o cleidomastóideo póstero-lateralmente.

Na região da inserção, ponto móvel, o músculo EM apresenta uma estreita faixa de fibras colágenas que formam um estreito tendão próximo à interface músculo-tendão, região esta denominada de junção miotendínea (JMT).

A JMT é a região de transição do sistema muscular altamente especializada e complexa localizada entre os tecidos musculares e tendíneos, com ampla interface através de dobras no sarcolema (TIDBALL, 1991). Sua primordial função é a transmissão de força gerada pelas proteínas contráteis intracelulares para as proteínas do tecido conjuntivo da matriz extracelular presentes no tecido tendíneo proporcionando os movimentos articulares (KANNUS et al., 1992).

A região da JMT podem ser observadas macroscopicamente na região de interface, das extremidades dos músculos ou grupamentos musculares. Estão situadas nas partes distais em relação ao ventre muscular, e em geral podem ser evidenciadas conforme a classificação muscular, como por exemplo: entre músculos com disposições oblíquas em relação ao tendão, principalmente na extremidade distal próximo ao ponto móvel (inserção tendínea).

Os nossos resultados o grupo recém-nascido observou-se na região da JMT, o arranjo das fibras colágenas do tecido tendíneo, na extremidade de delgadas fibras musculares, revelando a íntima relação destas estruturas. Na parte tendínea

notaram-se a presença de inúmeros tenoblastos com formatos variados. Ultraestruturalmente, revelaram na região da JMT elevado agrupamento de mitocôndrias ovais, a presença de capilares sanguíneos adjacentes, citoplasma volumosos dos tenoblastos e delgadas dobras no sarcolema na extremidade das células musculares. Segundo Rodriguez-Gusman et al. (2007), o desenvolvimento da JMT sofre influência direta através da interação entre os mioblastos e os elementos da matriz extracelular, bem como provável ser regulado pela sinalização local através da distribuição heterogênea do ácido retinóico. Por outro lado, Tozer e Duprez (2005) relataram que o desenvolvimento da JMT é influenciado pela intensa interação dinâmica entre os tecidos muscular e tendíneo. As habilidades especializadas das células musculares de contrair e de produzir força são desempenhadas durante as últimas semanas de vida uterina e as primeiras do período neonatal. Apresentam elevada atividade celular na região de interface, sendo estas, fundamentais para o desenvolvimento, formação do complexo ultraestrutural altamente especializado da JMT na fase adulta e suas possíveis alterações no envelhecimento.

Em relação ao desempenho funcional da JMT, que foram analisadas e descritas por Kostrominova et al. (2009), que a capacidade contráctil do músculo esquelético de gerar força, durante estágios embrionários finais e iniciais do neonato são fundamentais para o pleno e contínuo desenvolvimento funcional da JMT até a fase adulta.

Os resultados demonstraram que na parte tendínea da JMT, a presença de inúmeros tenoblastos com citoplasmas volumosos ao revelar as diversas organelas citoplasmáticas como mitocôndrias ovais, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso. Os núcleos eucromáticos ovóides e filamentos de actina e miosina intracitoplasmáticos forma observados em proximidades às vesículas pinocitóticas. Segundo Chuen et al. (2004), o tecido tendíneo durante o desenvolvimento apresenta elevada quantidade de células progenitoras. Estes tenoblastos estão situados em proximidade entre fibras colágenas na matriz extracelular.

Além disso, Waggett, Benjamin e Ralphs (2006) mostraram as dimensões dos tenoblastos, com formatos dos seus núcleos variando entre ovais e alongados e o notável número de organelas citoplasmáticas bem desenvolvidas.

As características morfológicas observados nos tenoblastos e suas organelas citoplasmáticas, próximos à JMT suportam o conceito da atividade metabólica elevada dessas células como, por exemplo, a intensa síntese dos elementos da matriz de acordo com os relatos de Stanley et al. (2007).

Os aspectos notados, sob luz polarizada, na região da JMT foram identificados fibras colágenas em tonalidade esverdeada (Tipo III), adjacentes às fibras musculares. De acordo com Niyibizi et al. (2000), o colágeno tipo III aumenta a síntese de colágeno durante os estágios iniciais de formação do tendão, e diminui à medida que o novo colágeno Tipo I é sintetizado e organizado, conforme foi observado nesse estudo.

Pode-se frisar que as estruturas presentes na JMT tem sido alvo de diversos estudos nos mais variados músculos esqueléticos, através de estudos experimentais que demonstraram as características da JMT relacionadas com o período embrionário (SINN et al., 2002), na fase adulta (ST PIERRE; TIDBALL, 1994), associada ao envelhecimento (CIENA et al., 2010), com atividade física (KOJIMA et al., 2008), hipoatividade (modelo antigravitacional) (ROFFINO et al., 1998 e 2006), engenharia “em vitro” (KOSTROMINOVA et al., 2009) e em modelos de distrofia muscular (BANKS et al., 2008; CONTI et al., 2009; VELSER et al., 2009). No entanto, algumas arbitrariedades factícias sobre as descrições desta dinâmica estrutura ocorrem atualmente, sendo assim, a extrema importância os estudos morfológicos desta região.

No grupo adulto, os resultados demonstraram a completa formação dos elementos da JMT nesta fase. Na parte muscular da JMT, observaram-se na disposição longitudinal das fibras musculares a unidade estrutural do músculo estriado esquelético, o sarcômero, disposto em séries através da organização das faixas escuras, que são denominadas de Banda A (anisotrópicas), e as faixas claras, Banda I (isotrópicas). Na região central da Banda A, observou-se uma fina faixa mais clara, a zona H, formada apenas por filamentos espessos. Na região central da zona H, observa-se a linha M, formada por um arranjo hexagonal de proteínas que unem filamentos espessos adjacentes. A banda I é constituída pelos filamentos delgados (actina), que se estendem até o início da zona H, sendo dividida na região central por uma linha escura fina, linha Z. Os principais componentes da Banda A são os filamentos espessos (miosina), localizados na região central do sarcômero.

Estas características das propriedades das fibras musculares foram descritas anteriormente por Clark et al. (2002) e Motoyama et al. (2009).

Os grupamentos mitocondriais foram observados em abundância, desde mitocôndrias ovais aos pares próximo à linha Z, em aglomerados intermiofibrilares, subsarcolemal e envoltos por feixes de fibras colágenas na extremidade da JMT. A presença abundante de grupamentos mitocondriais subsarcolemal e intermiofibrilar, delimitados entre o sarcolema e os microtendões demonstraram elevada atividade celular nesta região. Acreditamos que, em conjunto, estas características pouco exploradas da JMT, sejam decorrentes desde a morfologia à distintas funções músculo EM, entretanto, resultados semelhantes foram relatados em outros músculos, por esse grupo de pesquisa, sobre as descrições da JMT na fase adulta entre o ventre anterior e tendão intermediário do músculo digástrico (CIENA et al., 2012).

Além disso, conforme os relatos de Huang et al. (2010) as mitocôndrias exercem funções vitais como na respiração celular, no metabolismo de substratos e ao contribuir na homeostasia do íon cálcio nas células musculares.

Os relatos sobre a morfologia e topografia mitocondrial no músculo esquelético adulto também foram reportados por Bazan et al. (2008) ao descreverem semelhanças na disposição e formato das mitocôndrias, ao analisarem o músculo pterigóideo medial de cobaias. Na estrutura interna da fibra muscular, observaram a disposição em pares de mitocôndrias esféricas, formando colunas finas alinhadas próximo da junção da Banda A-I. Estes dados corroboram com Boncompagni et al. (2009), que descreveram a topografia regional das mitocôndrias e estruturas adjacentes em músculos de camundongos durante o desenvolvimento, no período entre 2 semanas a 4 meses, destacando a distribuição aos pares de mitocôndrias próximo a junção da Banda A-I e a relação com as estruturas do retículo sarcoplasmático.

Na extremidade da JMT, notaram-se a disposição longitudinal dos feixes de miofibrilas com estreitamento das fibras musculares revelando seus formato cônico. As terminações dos feixes de miofibrilas, intrafusais periféricos, revelaram íntima relação ao apresentar comunicações entre as Z-bands com o endomísio de fibras musculares adjacentes. Além disso, Patel e Lieber (1997) enfatizam as

características de músculos com disposição paralela das fibras, podem apresentar fibras com comprimento menor, reveladas através das terminações intrafusais.

Na interface da JMT, os feixes de miofibrilas terminais apresentavam em suas extremidades projeções sarcoplasmáticas alongadas em formato de “dedos”, envolvidas por interdigitações que são invaginações sarcoplasmáticas (dobras do sarcolema) provenientes da matriz extracelular, com aspecto de cisalhamento, caracterizando a complexa estrutura do sistema muscular, denominada de JMT (CIENA et al., 2010).

Segundo Tidball (1994), as invaginações sarcoplasmáticas promovem a formação de dobramentos, que são projeções da matriz extracelular denominadas de interdigitações, localizadas entre as projeções sarcoplasmáticas que proporcionam, funcionalmente, maior relação entre os feixes de miofibrilas com o tecido conjuntivo, aumentando assim a área de contato na interface músculo-tendão. No entanto, nas amostras examinadas observamos além dos componentes clássicas da JMT, características ultraestruturais atípicas da JMT, ainda pouco exploradas. No presente trabalho foi possível distinguir, subespecializações, que são áreas intercaladas entre feixes de miofibrilas terminais e tecido conjuntivo na região central e periférica da extremidade distal da fibra muscular, com ampla área de tecido conjuntivo circundando os feixes de miofibrilas, através de longos feixes que formam os microtendões.

As JMT foram observadas na extremidade da fibra muscular e nas laterais destas, formando às JMT laterais. Corroborando com os relatos de Young et al. (2000), tais terminações presentes na periferia da fibra muscular são caracterizadas por junções laterais, comunicações estas localizadas entre o sarcômero terminal e invaginações sarcoplasmáticas, responsáveis pela transmissão lateral de tensão, ao transmitir a tensão gerada pela contração dos feixes de miofibrilas até a matriz extracelular de fibras musculares adjacentes. Neste sentido os resultados do presente trabalho comprovam que a transmissão de tensão ocorra em maior parte, mas não apenas na região da JMT, mas também, em menor proporção, em regiões proximais através de comunicações entre os feixes de miofibrilas e tecido conjuntivo com o endomísio de fibras musculares adjacentes. Entretanto, terminações de feixes de miofibrilas intrafusais foram observadas na região central da fibra muscular

próximo à JMT, provavelmente estas terminações podem ter contribuído com a formação dos vários níveis de invaginações sarcoplasmáticas, demonstrado pelas sub-especializações na região da JMT entre o ventre anterior do músculo digástrico e o tendão intermediário.

Em nossos dados, na parte tendínea da JMT, observaram-se ampla área de tecido conjuntivo, com redução dos tenócitos. Estas células se caracterizaram por apresentar seus respectivos núcleos fusiformes (alongados), relativamente volumosos em relação ao citoplasma celular. No citoplasma foram evidenciados, bem desenvolvidas, como as mitocôndrias e Complexo de Golgi. Segundo Ippolito et al. (1980) a diminuição gradual na proporção de células por matriz, pode ocorrer, e as células tendíneas assemelham-se, apresentando apenas o formato fusiforme.

Moore e De Beaux (1987) descreveram que os tenoblastos transformam-se em tenócitos e, ocasionalmente podem ocorrer o inverso, tornando-se alongados. A proporção do núcleo aumenta em relação ao citoplasma e, os processos celulares tornam-se extensões longas e delgadas a partir do corpo celular. Em secções transversas, o aspecto morfológico dos tenócitos e suas projeções assemelham-se com uma aranha. Knoblock (2008) enfatizam que os tenócitos são células tendíneas fusiformes, do tipo celular primário encontrados no tendão e que são supridas por uma intrincada rede microvascular que lhes permite manter em seu ambiente extracelular.

Os dados deste estudo confirmam que entre os tenócitos foram observados longas e delgadas projeções citoplasmáticas que se comunicavam com outras projeções dos tenócitos adjacentes. De acordo com Waggett, Benjamin e Ralphs (2006) as células tendíneas estabelecem comunicações intercelulares entre si através de junções desmossomiais ou do tipo “gap”.

Sob luz polarizada, na região da JMT foram identificadas fibras colágenas em tonalidade esverdeada (Tipo III) e alaranjada (tipo I), adjacentes às fibras musculares. De acordo com Amiel et al. (1984), o colágeno tipo I é o mais abundante no tecido tendíneo na fase adulto, enquanto que o colágeno tipo III, é reduzido drasticamente.

Quando observadas as fibras musculares do grupo idoso, os resultados demonstraram amplas alterações nos componentes e região da JMT em decorrência

do processo fisiológico do envelhecimento. Na parte muscular da JMT, observaram-se alterações no padrão dos sarcômeros em séries, com desalinhamento, diminuição da disposição e formatos das mitocôndrias.

Foi notado que durante o envelhecimento do sistema muscular apresenta-se perda progressiva da massa muscular e, concomitantemente, diminuição da força, comprimento e resistência muscular. Esta condição denominada de sarcopenia revela importantes implicações desfavoráveis aos cuidados com a saúde e aspectos sócio-culturais para os seres humanos. Além disso, a sarcopenia contribui para a fragilidade da estrutura muscular e acarreta em elevados custos nos tratamentos específicos relatados por Janssen et al. (2004) e morte prematura em alguns casos relatados por Malatesta et al. (2010). Thompson (2009) enfatiza que há diminuição da massa muscular presente nos idosos sarcopênicos é devido a múltiplos fatores que continuam a ser elucidados.

Em adição, pode-se enfatizar os relatos de Goldspink (2004), que o músculo esquelético é um tecido altamente especializado, o qual apresenta remodelamento constante a diversos fatores. Em modelos experimentais de hipoatividade muscular relatado por Shah et al. (2001), através da diminuição da ação da gravidade e em músculos idosos ocorre plasticidade muscular, ao revelar diminuição da área de secção transversa (IYOMASA et al., 2009), e subsequentemente, no volume total do músculo, comprometendo a eficácia contráctil, caracterizando a atrofia muscular. Ainda Goldspink (1999) e Volpi et al. (2008) frisam que as alterações no comprimento da fibra muscular são decorrentes da diminuição dos sarcômeros em séries.

Esteve et al. (2008) ao analisarem a densidade das mitocôndrias nas regiões subsarcolemal, sarcoplasmática (intermiofibrilar) e pericapilar, no tecido muscular de ratos anêmicos, observaram redução na quantidade de mitocôndrias em ambas as regiões. Os autores enfatizam que em músculos distintos com características glicolíticas e oxidáticas como no caso dos músculos, extensor longo dos dedos e sóleo respectivamente, apresentaram alterações mitocondriais semelhantes.

Durante o envelhecimento há diminuição do número de mitocôndrias nas células musculares, destacando eventos como disfunção mitocondrial e apoptose celular, relacionando estes fatores à diminuição da massa muscular presentes em

pacientes sarcopênicos. É interessante notar que Thomas (2010) menciona os prováveis mecanismos responsáveis pela sarcopenia e sua possível potencialização entre as interações destes fatores, destacando: pré-maturidade, desnutrição ao nascimento, sedentarismo, imobilidade, níveis reduzidos de hormônios tróficos, doenças neuromusculares e traumáticas.

Durante o envelhecimento, Shibata et al. (2010) e Malatesta et al. (2010) relatam que o declínio na regeneração celular ocorre por apresentar alteração na quantidade e diferenciação das células satélites.

Segundo Grefte et al. (2007), fibras musculares com metabolismo oxidativo alto (Tipo I), são de contração lenta e resistente a fadiga, as fibras glicolíticas (Tipo IIA), são de contração rápida e moderada resistência a fadiga e as fibras glicolíticas-oxidativas (Tipo IIB), são de contração rápida e não resistentes a fadiga. A proporção dos tipos de fibras nos músculos esqueléticos pode sofrer adaptações e alterações ao longo da vida e drasticamente em idades avançadas (JÄRVINEN et al., 2005)

Segundo Baldwin e Haddad (2001), a composição dos tipos de fibras nos músculos esqueléticos, sofre influência de fatores como a hereditariedade, envelhecimento, hormonal e em modelos experimental de hipoatividade (BAZAN et al., 2008).

Verdijk et al. (2010), relataram ao analisar através de biópsia muscular do vasto lateral de idosos, forte correlação entre a quantidade de célula satélite e AST da fibra muscular. Segundo Malatesta et al. (2010), a densidade de células satélites diminui significativamente nos músculos de ratos idosos em comparação com os músculos adultos, com comprometimento na capacidade regenerativa do tecido muscular na sarcopenia. Pressupõe-se que a diminuição de célula satélite no tecido muscular desempenhe contribuição favorável à diminuição específica de fibras tipo II e conseqüentemente na massa e comprimento muscular, em virtude deste tipo de fibra produzir maior tensão específica e produção de força durante as contrações musculares. Ou seja, a diminuição de fibras tipo II com o envelhecimento contribui para o desenvolvimento de fraqueza muscular, qualitativo pela diminuição da AST e quantitativo pelo aumento relativo de fibras tipo I.

Com o envelhecimento, além das características de atrofia muscular foram observadas alterações na disposição e formato das invaginações sarcoplasmáticas e consequentemente nas evaginações sarcoplasmáticas com aumento de depósito de colágeno nesta região. Estas alterações morfológicas são semelhantes às encontradas na JMT do músculo pterigóideo medial de ratos Wistar idoso, reportadas recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (CIENA et al., 2010) que possivelmente podem contribuir com rigidez e a lesões musculares.

As modificações na JMT possivelmente são oriundas das alterações em ambos os tecidos musculares e tendíneos com espessamento dos feixes de fibras colágenas na região da JMT. Na parte tendínea foram observados ampla área de depósito de tecido conjuntivo com diminuição dos tenócitos e estes situados em proximidade com a JMT. Além de apresentar no tecido tendíneo maior incidência de fibras colágenas do tipo I. De acordo com Jarvinen et al. (2005), com o envelhecimento ocorre a maior taxa de tendinopatias e rupturas. Segundo Kostrominova (2013), o tecido tendíneo é composto principalmente de colágeno tipo I, além de diversos grupos de glicoproteínas como a fibromodulina, elastina, tenascina e decorina. Os efeitos do envelhecimento na expressão e localização dos elementos constituintes do tendão não foram estabelecidos.

Em relação à redução dos tenócitos no tecido tendíneo, Ippolito et al. (1980), relatam que com o envelhecimento, a proporção de células por matriz diminui gradualmente e, diversas outras alterações ocorrem com as células tendíneas e seus longos processos citoplasmáticos. Segundo Moore e De Beaux (1987), estes processos celulares longos são necessários para manter o estreito contato entre os tenócitos e os componentes da matriz, para compensar a diminuição celular e aumento expressivo da matriz tendínea durante o envelhecimento.

Feixes de fibras colágenas espessas foram observados formando comunicações centrais angulares distantes da JMT, que projetam-se em direção das JMT laterais, ou seja, as JMT laterais comunicam-se entre si através das comunicações centrais. Tais elementos constituintes e associados possivelmente à JMT, mesmo que distantes, foram apenas observados no grupo idoso. Estas alterações morfológicas são possivelmente decorrentes do aumento expressivo de tecido conjuntivo e da morte celular de fibras musculares em decorrência da idade,

revelando ampla plasticidade tecidual desta região associado com a adaptação a nível ultraestrutural com limitações até o presente momento.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e os resultados ora apresentados acerca das características estruturais e ultraestruturais da junção miotendínea do músculo esternomastóideo desde o desenvolvimento ao envelhecimento, conclui-se que:

1. A região de interface apresenta intensa atividade celular com redução com o envelhecimento;
2. A membrana sarcoplasmática apresenta dobras, denominadas de invaginações e evaginações sarcoplasmáticas e subespecializações que apresentam constante remodelamento durante seu desenvolvimento até o envelhecimento;
3. A extremidade da fibra muscular próximo à JMT apresenta-se com formato cônico;
4. Na interface há presença de grupamentos mitocôndrias entre feixes de fibras colágenas;
5. A interface com o envelhecimento apresentam espessamento no tecido conjuntivo principalmente colágeno tipo I e características de atrofia na fibra muscular.
6. Com o envelhecimento as junções miotendíneas laterais convergem e formam as comunicações centrais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AJIRI, T.; KIMURA, T.; ITO, R.; INOKUCHI, S. Microfibrils in the myotendon junctions. **Acta Anatomica**, v. 102, p. 433-439, 1978.

BEHMER, O. A.; DE TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1975.

BEMIS, W. E.; LAUDER, G. V. Morphology and function of the feeding apparatus of the lungfish, *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). **Journal of Morphology**, v. 187, n. 1, p. 81-108, 1986.

BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. **International Review of Cytology**, v. 196, p. 85-130, 2000.

BONCOMPAGNI, S.; ROSSI, A. E.; MICARONI, M.; BEZNOUSSENKO, G. V.; POLISHCHUK, R.S.; DIRKSEN, R. T.; PROTASI, F. Mitochondria are linked to calcium Stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. **Molecular Biology of de Cell**, v. 20, n. 3, p. 1058-1067, 2009.

BURTON, D. G. Cellular senescence, ageing and disease. **Age**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2009.

BUTLER, D. L.; JUNCOSA, N.; DRESSLER, M. R. Functional efficacy of tendon repair processes. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 6, p. 303-329, 2004.

BUTLER, D. L.; SHEN, M. Y.; STOUFFER, D. C.; SAMARANAYAKE, V. A.; LEVY, M. S. Surface strain variation in human patellar tendon and knee cruciate ligaments. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 112, n. 1, p. 38-45, 1990.

CHUEN, F. S.; CHUK, C. Y.; PING, W. Y.; NAR, W. W.; KIM, H. L.; MING, C. K. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 52, n. 9, p. 1151-1157, 2004.

CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; ALVES, P. H.; BOLINA-MATOS, R. S.; DIAS, F. J.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Histochemical and ultrastructural changes of sternomastoid muscle in aged Wistar rats. **Micron**, v. 42, n. 8, p. 871-876, 2011.

CIENA, A. P.; ALMEIDA, S. R. Y.; DIAS, F. J.; BOLINA, C. S.; ISSA, J. P. M.; IYOMASA, M. M.; OGAWA, K.; WATANABE, I. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastrics muscle and intermediate tendon in adults rats. **Micron**, v. 43, n.2-3, p. 258-262, 2012.

CIENA, A. P.; LUQUES, I. U.; DIAS, F. J.; YOKOMIZO DE ALMEIDA, S. R.; IYOMASA, M. M.; WATANABE, I. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 1011-1014, 2010.

CLARK, K. A.; MCELHINNY, A. S.; BECKERLE, M. A.; GREGORIO, C. C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.18, p. 637-706, 2002.

CURZI, D.; SALUCCI, S.; MARINI, M.; ESPOSITO, F.; AGNELLO, L.; VEICSTEINAS, A.; BURATTINI, S.; FALCIERI, E. How physical exercise changes rat myotendinous junctions. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, n. 9, p. 117-121, 2012.

DECONINCK, A. E.; RAFAEL, J. A.; SKINNER, J. A.; BROWN, S. C.; POTTER, A. C.; METZINGER, L.; WATTA, D. J.; DICKSON, J. G.; TINSLEY, J. M.; DAVIES, K. E. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. **Cell**, v. 90, n. 4, p. 717-727, 1997.

DIOGO, R. The head and neck muscles of the philippine colugo (Dermoptera: Cynocephalus volans), with a comparison to tree-shrews, primates, and other mammals. **Journal of Morphology**, v. 270, p. 14-51, 2009.

DIOGO, R.; ABDALA, A.; LONERGAN, N.; WOOD, B. A. From fish to modern humans- comparative anatomy, homologies and evolution of the head and neck musculature. **Journal of Anatomy**, v. 213, p. 391-424, 2008.

DORAL, M. N.; ALAM, M.; BOZKURT, M.; TURHAN, E.; ATAY, O. A.; DÖNMEZ, G.; MAFFULLI, N. Functional anatomy of the Achilles tendon. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 18, n. 5, p. 638-643, 2010.

DRESSLER, M. R.; BUTLER, D. L.; WENSTRUP, R.; AWAD, H. A.; SMITH, F.; BOIVIN, G. P. A potential mechanism for age-related declines in patellar tendon biomechanics. **Journal Orthopaedic Research**, v. 20, n. 6, p. 1315-1322, 2002.

FALLON, J.; BLEVINS, F. T.; VOGEL, K.; TROTTER, J. Functional morphology of the supraspinatus tendon. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 20, n. 5, p. 920-926, 2002.

GENESER, F. **Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M.; TORENSMA, R.; VON DEN ROFF, J. W. Skeletal Muscle Development and Regeneration. **Stem Cells and Development**, v. 16, n.5, p. 857-868, 2007.

HUIJING, P. A. Muscular force transmission: a unified, dual or multiple system? A review and some explorative experimental results. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 107, n. 4, p. 292-311, 1999.

IPPOLITO, E.; NATALI, P. G.; POSTACCHINI, F.; ACCINI, L.; DE MARTINO, C. Morphological, immunochemical, and biochemical study of rabbit achilles tendo at various ages. **The Journal of none of Joint Surgery**, v. 62, n. 4, p. 583-598, 1980.

ISHIKAWA, H.; SAWADA, H.; YAMADA, E. Surface and internal morphology of skeletal muscle. **Handbook of Physiology-skeletal muscle**, p. 1-20, 1982.

JÓZSA, L.; BÁLINT, J. B.; RÉFFY, A.; DEMEL, Z. Histochemical and ultrastructural study of adult human tendon. **Acta Histochemical**, v. 65, n. 2, p. 250-257, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto / atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KANNUS, P. Structure of the tendon connective tissue. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 10, n. 10, p. 312-320, 2000.

KANNUS, P.; JOZSA, L.; KVIST, M.; LEHTO, M.; JÄRVINEN, M. The effects of immobilization on myotendinous junction: an ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 144, n. 3, p. 387-394, 1992.

KNOBLOCH, K. The role of tendon microcirculation in Achilles and patellar tendinopathy. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 3, n. 18, p. 1-13, 2008.

KOSTROMINOVA, T. Y.; BROOKS, S. V. Age-related changes in structure and extracellular matrix protein expression levels in rat tendons. **Age**, in press, 2013.

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

LANG, T.; STREEPER, T.; CAWTHON, P.; BALDWIN, K.; TAAFFE, D. R.; HARRIS, T. B. Sarcopenia: etiology, clinical onsequences, intervention, and assessment. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 4, p. 543-559, 2009.

LIGHT, N.; CHAMPION, A. E. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. **The Biochemical Journal**, v. 219, n. 3, p. 1017-1026, 1984.

LIN, T. W.; CARDENAS, L.; SOSLOWSKY, L. J. Biomechanics of tendon injury and repair. **Journal of Biomechanics**, v. 37, n. 6, p. 865-877, 2004.

LINSENMEYER, T. F.; GIBNEY, E.; IGOE, F.; GORDON, M. K.; FITCH, J. M.; FESSLER, L. I.; BIRK, D. E. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha1(V) NH2-terminal domain, aputative regulator of corneal fibrillogenesis. **The Journal of the Cell Biology**, v. 121, n. 5, p. 1181-1189, 1993.

MACCONNACHIE, H. F.; ENESCO, M.; LEBLOND, C. P. The of increase in the number of skeletal muscle nuclein the postnatal rat. **The American Journal of Anatomy**, v.114, p. 245-253, 1964.

MACKAY, B.; HARROP, T. J.; MUIR, A. R. The fine structure of the muscle tendon junction in the rat. **Acta Anatomic**, v. 73, n. 4, p. 588-602, 1969.

MAFFULLI, N.; BARRASS, V.; EWEN, S. W. Light microscopit histology of Achilles tendon ruptures. A comparison with unruptured tendons. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 28, n. 6, p. 857-863, 2000.

MENG, S. J.; YU, L. J. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. **International of Molecular Science**, v. 11, n. 4, p. 1509-1526, 2010.

MISSAGHI, B. Sternocleidomastoid syndrome: a study case. **The Journal of the Canadian Chiropractic Association**, v. 48, n. 3, p. 201-205, 2004.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011.

MOORE, N. L.; DE BEAUX, A. A quantitative ultrastructural study of rat tendo from birth to maturity. **Journal of Anatomy**, v. 153, p. 163-169, 1987.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MOTOYAMA, A. A.; WATANABE, I.; IYOMASA, M. M.; SILVA, M. C. P.; SOSTHINES, M. C. K.; OGAWA, K.; LOPES, M. G. O.; KFOURY, J. R. Ultrastructure of motor nerve terminals in the anterior third of wistar rat tongue. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 6, p. 464-470, 2009.

NARICI, M. V.; MAFFULLI, N.; MAGANARIS, C. N. Ageing of human muscles and tendons. **Disability and Rehabilitation**, v. 30, n. 20-22, p. 1548-1554, 2008.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKASHI, K. Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. A demonstration using the cell-maceration/scanning electron microscope method. **Acta Anatomica**, v. 151, n. 4, p. 250-257, 1994.

NIYIBIZI, C.; KAVALKOVICH, K.; YAMAJI, T.; WOO, S. L. Type V collagen is increased during rabbit medial collateral ligament healing. **Knee Surgery, Sports Traumatology, arthroscopy**, v. 8, n. 5, p. 281-285, 2000.

PARTHASARATHY, S.; JUBRAN, A.; LAGHI, F.; TOBIN, M. J. Sternomastoid, rib cage, and expiratory muscle activity during weaning failure. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 1, p. 140-147, 2007.

PATEL, T.J.; LIEBER, R.L. Force transmission in skeletal muscle: from actomyosin to external tendons. **Exercise and Sport Science Reviews**, v. 25, p. 321-363, 1997.

PINTO, S.; CARVALHO, M. Motor responses of the sternocleidomastoid muscle in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Muscle & Nerve**, v. 38, n. 4, p. 1312-1317, 2008.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy, **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208, 1963.

RODRIGUEZ-GUZMAN M, M. A. J.; SANTESTEBAN, E.; GAÑAN, Y.; MACIAS, D.; HURLE, J. M. Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic signaling. **Developmental Biology**, v. 302, n. 1, p. 267-280, 2007.

RUFAL, A.; RALPHS, J. R.; BENJAMIN, M. Structure and histopathology of the insertional region of the human Achilles tendon. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 13, n. 4, p. 585-593, 1995.

SAWADA, H.; ISHIKAWA, H.; YAMADA, E. High resolution scanning electron microscopy of frog satorius muscle. **Tissue & Cell**, v. 10, n. 1, p. 179-190, 1978.

SOBOTKA, S.; MU, L. Characteristics of tetanic force produced by the sternomastoid muscle of the rat. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 1-10, 2010

STANLEY, R. L.; FLECK, R. A.; BECKER, D. L.; GOODSHIP, A. E.; RALPHS, J. R.; PATTERSON-KANE, J. C. Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons. **Journal of Anatomy**, v. 211, n. 3, p. 325-334, 2007.

TAJSHARGHI, H. Thick and thin filament gene mutations in striated muscle diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1259-1275, 2008.

TESTUT, L. **Traité d'anatomie humaine**, 6. ed., Paris: Octave Doin et Fils, 1052.Tomo I, 1911p.

THOMPSON, L. V. Age-related muscle dysfunction. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 1-2, p. 106–111, 2009.

TIDBALL, J. G. Force transmission across muscle cell membranes. **Journal of Biomechanics**, v. 24, n. 1, p. 43-52, 1991.

TIDBALL, J. G.; SALEM, G.; ZERNICKE, R. Site and mechanical conditions for failure of skeletal muscle in experimental strain injuries. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 3, p. 1280-1286, 1993.

TOZER, S.; DUPREZ, D. Tendon and ligament: development, repair and disease. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today, reviews**, v. 75, n. 3, p. 226-236, 2005.

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

TROTTER, J. A.; EBERHARD, S.; SAMORA, A. Structural domains of the muscle-tendon junction. 1. The internal lamina and the. **The Anatomical Record**, v. 207, n. 4, p. 573-591, 1983.

ULLAH, M.; MANSOR, O.; ISMAIL, Z. I. M.; KAPITONOVA, M. Y.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Localization of the spinal nucleus of accessory nerve in rat: a horseradish peroxidase study. **Journal of Anatomy**, v. 210, p. 428-438, 2007.

VAN EIJDEN, T. M.; KORFAGE, J. A.; BRUGMAN, P. Architecture of the human jaw-closing and jaw-opening muscles. **The Anatomical Record**, v. 248, n. 3, p. 464-474, 1997.

VASILEV, V.; ANDREEV, D.; KÜHNEL, W. Scanning electron microscopy of the endomysial collagen in the rat paravertebral musculature. **Annals of Anatomy**, v. 177, n. 1, p. 85-87, 1995.

VIDAL, B. C. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron**, v. 34, n. 8, p. 423-432, 2003.

WAGGETT, A. D.; BENJAMIN, M.; RALPHS, J. R. Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 11, p. 1145-1154, 2006.

WATANABE, I. **Erhart: elementos de anatomia humana**. 10. ed., São Paulo: Atheneu, 2009.

WATANABE, I. **Scanning electron microscopy atlas of cells and tissues of the oral cavity**. São Paulo. [s/n]:1998, 196p.

WATANABE, I.; OGAWA, K.; YAMADA, E. Rabbit parotid gland acini as revealed by scanning electron microscope. **Ciências e Cultura**, v. 41, n. 3, p. 284-287, 1989.

WATANABE, I.; YAMADA, E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. **Archivum Histologicum Japonicum**, v. 46, p. 173-182, 1983.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophysical Biochemical Cytology**, v. 4, n. 6, p. 727-730, 1958.

WILLIAMS, P. E.; GOLDISPINK, G. The effects of immobilization on the longitudinal growth of striated muscles. **Journal of Anatomy**, v. 116, p. 45-55, 1973.

YAMASHITA, S.; MCGRATH, K. F.; YUKI, A.; TAMAKI, H.; KASUGA, N.; TAKEKURA, H. Assembly of transverse tubule architecture in the middle and myotendinous junctional regions in developing rat skeletal muscle fibers. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 28, n. 2-3, p. 141-151, 2007.

ZACKSENHAUS, E.; JIANG, Z.; CHUNG, G.; MARTH, J. D.; PHILIPS, R. A.; GALLIE, B. L. pRB controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. **Genes & Development**, v. 10, n. 23, p. 3051-3059, 1996.

APÊNDICE

MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 75:1292–1296 (2012)

Ultrastructural Features of the Myotendinous Junction of the Sternomastoid Muscle in Wistar Rats: From Newborn to Aging

ADRIANO POLICAN CIENA,^{1,2} SONIA REGINA YOKOMIZO DE ALMEIDA,¹ CRISTINA DE SOUSA BOLINA,² REGINA DE SOUSA BOLINA-MATOS,² ROSE ELI GRASSI RICCI,² MARCELO CAVENAGHI PEREIRA DA SILVA,³ MARIA ANGÉLICA MIGLINO,² AND II-SEI WATANABE^{1,2*}

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences-ICB III, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Department of Morphology and Genetic, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

KEY WORDS myotendinous junction; development; muscle, skeletal; aging; transmission electron microscopy

ABSTRACT The myotendinous junction (MTJ) is a major area for transmitting force from the skeletal muscle system and acts in joint position and stabilization. This study aimed to use transmission electron microscopy to describe the ultrastructural features of the MTJ of the sternomastoid muscle in Wistar rats from newborn to formation during adulthood and possible changes with aging. Ultrastructural features of the MTJ from the newborn group revealed pattern during development with interactions between muscle cells and extracellular matrix elements with thin folds in the sarcolemma and high cellular activity evidenced through numerous oval mitochondria groupings. The adult group had classical morphological features of the MTJ, with folds in the sarcolemma forming long projections called “finger-like processes” and sarcoplasmic invaginations. Sarcomeres were aligned in series, showing mitochondria near the Z line in groupings between collagen fiber bundles. The old group had altered “finger-like processes,” thickened in both levels of sarcoplasmic invaginations and in central connections with the lateral junctions. We conclude that the MTJ undergoes intense activity from newborn to its formation during adulthood. With increasing age, changes to the MTJ were observed in the shapes of the invaginations and “finger-like processes” due to hypoactivity, potentially compromising force transmission and joint stability. *Microsc. Res. Tech.* 75:1292–1296, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

The sternocleidomastoid muscle in humans is located in the cervical region; it consists of two muscle bellies and insertion into the mastoid process and plays an important role in the movement of cranio-vertebral joints and inspiration as accessory muscles (Sobotka, 2010).

In rodent mammals, a thin membrane of connective tissue separates muscles homologous to the sternocleidomastoid. The sternomastoid (SM) muscle is found medially, whereas the cleidomastoid is located posterolaterally (Diogo et al., 2008).

In the proximal insertion region, the SM muscle has a narrow collagen fiber bundle that joins the tendon near the muscle-tendon interface, a region named myotendinous junction (MTJ).

The MTJ is a highly specialized and complex region that transitions between muscle and tendon and is delimited by folds in the sarcolemma (Tidball, 1991). The primary function of the MTJ is to transmit force generated by intracellular contractile proteins to extracellular connective tissue proteins present in the tendon tissue (Kannus et al., 1992).

MTJ development is directly influenced by interactions between myoblasts and extracellular matrix elements and is most likely regulated by local signaling via heterogeneous distribution of retinoic acid (Rodríguez-Guzmán et al., 2007).

The specialized abilities of the muscle cells to contract and produce force are performed during the last weeks of intrauterine life and the first weeks of the early neonatal period. Because these functions are fundamental for development, formation of the ultrastructural complex is highly specialized in the MTJ during adulthood and possibly undergoes changes with increasing age.

This study aimed to describe using transmission electron microscopy the ultrastructural features of the MTJ of the SM muscle in newborn, adult, and old Wistar rats.

MATERIALS AND METHODS

This study was composed by three different age groups of five male Wistar rats (*Rattus norvegicus*): a newborn group (5 days old); an adult group (4 months old); and an old group (24 months old). The animals were housed in standard environment in the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo with a light/dark cycle of 12 h, room temperature (25 ± 2 °C),

*Correspondence to: Ii-sei Watanabe, Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, Butantã 05508-900, São Paulo SP, Brazil. E-mail: watanabe@icb.usp.br

Received 27 February 2012; accepted in revised form 22 March 2012

DOI 10.1002/jemt.22063

Published online 23 April 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF THE MTJ OF THE SM MUSCLE

1293

Fig. 1. Transmission electron photomicrographs of the MTJ region. Newborn Group: (A) Highly active muscle cells with numerous oval mitochondria (arrowheads) are shown. Blood capillaries (c) and endothelial cell nuclei (N) are found in the interstice. B: Under increased magnification, oval mitochondria with varied diameters reveal their cristae with double membrane (arrow). C: At the end of

the muscle cell, myofibril bundles (*) with small oval mitochondria are dispersed in the developing MTJ region. Thin and short folds in the sarcoplasmic membrane are found at the interface, forming invaginations (arrowhead) and evaginations (arrows). D: Evaginations (arrows) and invaginations (arrowhead) are delimited by the sarcoplasmic membrane. Scale Bars, 5 µm (A), 1 µm (B-C), 0.5 µm (D).

chow and water ad libitum. All procedures in this study adhered to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation (EAEC) (n°. 159/2010) at the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo-USP.

Transmission Electron Microscopy

For transmission electron microscopy, the animals were intraperitoneally anesthetized with urethane (3 g/Kg) and perfused with a modified Karnovsky fixative solution (containing 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4). After dissecting the SM muscles (right and left), 4-mm³ samples of the MTJ region were generated. The samples were postfixed in a 1% osmium tetroxide solution at 4°C and subsequently immersed in an aqueous 5% uranyl acetate solution at room temperature. Next, the samples were dehydrated in an increasing alcohol series, immersed in propylene oxide, and embedded in Spurr resin. Semithin sections were cut with a Reichert Ultra Cut[®] ultra-microtome and stained with a 1% toluidine blue solution to test the region to be analyzed. Next, ultrathin 90-nm sections were cut, collected on 200 "mesh" copper grids (Sigma[®]), and contrasted with a 4% uranyl acetate solution and an aqueous 0.4% lead citrate solution (Picoli et al., 2011; Watanabe and Yamada, 1983). The grids were examined under a Mor-

gagni 268D transmission electron microscope in the Department of Surgery, FMVZ-USP, São Paulo, Brazil.

RESULTS

Newborn Group

Examination of the ultra-thin sections from the MTJ region of SM muscles revealed primary development and tissue organization, as indicated by muscle cells undergoing high cellular activity with numerous oval mitochondria delimited by the sarcoplasmic membrane without distinction between intermyofibrillar and sub-sarcolemal groups and in the extracellular matrix, blood capillaries with their endothelial cell nuclei were observed between the muscle cells (Fig. 1A). Under increased magnification, double membrane was seen in the oval mitochondria (Fig. 1B). Longitudinal disposition of the myofibril bundles were noted at the end of the muscle cell, with small oval mitochondria dispersed in the developing MTJ region. Short and thin folds were observed in the sarcoplasmic membrane at this interface, forming invaginations and evaginations (Fig. 1C). At high magnification, thin folds were found in the sarcoplasmic membrane and in the extracellular matrix cytoplasmic part of the fibroblast (Fig. 1D).

Adult Group

Examination of the MTJ region of the SM muscles revealed longitudinal disposition, myofibril bundles, and sarcomeres in series aligned with oval mitochondria in pairs adjacent to the Z-band and groupings of

Fig. 2. Transmission electron photomicrographs of the MTJ region. Adult group: (A) Longitudinal disposition of myofibril bundles at the end of the cell, showing the sarcomeres in series (*) and oval mitochondria in pairs adjacent to the Z Line. Long invaginations at the MTJ interface between finger-like processes and voluminous grouping of mitochondria (arrows) between collagen fiber bundles (c). (B) The alignment of sarcomeres in series (*) and the sarcoplasmic invaginations (arrows) consisting of fiber bundles with

extensive region of connective tissue (c) are noteworthy. (C) The myofibril bundles show various levels of sarcoplasmic invaginations (arrows). The delimitation of collagen fiber bundles of the mitochondria (M) grouping and part of the rough endoplasmic reticulum of the tenocyte (*) is notable. (D) Under increased magnification, the finger-like processes (arrows) are delimited by the sarcoplasmic invaginations (arrowhead) consisting of collagen fibers. Scale Bars, 5 μ m (A), 2 μ m (B-C), 1 μ m (D).

mitochondria between collagen fiber bundles were observed (Fig. 2A). At the end of the cell, a muscle-tendon interface showed the alignment of sarcomeres and long sarcoplasmic invaginations (Fig. 2B). Various levels of sarcoplasmic invaginations were identified between the myofibril bundles. The sarcoplasmic invaginations were longer than sarcomeres on some occasions and were delimited by collagen fiber bundles, a grouping of mitochondria, and the cytoplasmic part of the rough endoplasmic reticulum of the tenocyte (Fig. 2C). Long "finger-like processes" interspersed by invaginations formed by collagen fibers from the extracellular matrix are shown in Figure 2D.

Old Group

Examination of the MTJ region of the SM muscles revealed tenocyte nuclei in an extensive region of collagen deposition. The end of the muscle cell had a narrowing conical shape, with significantly increased adjacent collagen deposition; in addition, morphological changes to the MTJ led to varied shapes with short and thick invaginations and "finger-like processes" (Fig. 3A). Within the extensive region of collagen deposition, the following were observed: tenocyte nucleus; atypical features with varied diameters, dispositions and lengths of sarcoplasmic invaginations showing ramifications and suggestive ultrastructural characteristics of cellular atrophy like muscle cell diminishment with substitution by connective tissue (Fig. 3A). Central

communications were seen through thick collagen fiber bundles in the lateral ends of the muscle cell (Fig. 3B), and an extensive adjacent region of collagen deposition was noted. In the central region of the muscle cell and far from the MTJ region, various levels of sarcoplasmic invaginations exhibited thick angular latero-lateral communications with the lateral junctions (Fig. 3C). Increased magnification revealed thickened, irregularly shaped sarcoplasmic invaginations, consisting of collagen fiber bundles transversely and longitudinally disposed from the extracellular matrix, where irregularly shaped "finger-like processes" consisted of myofibril bundles delimited by the sarcoplasmic membrane (Fig. 3D).

DISCUSSION

The results of this study showed the ultrastructural features of the MTJ of the SM muscle in Wistar rats from the three age groups: newborn, adult, and old. It was possible to characterize the morphological features during the developmental pattern of the MTJ region, its complete formation during adulthood, and its modifications with increasing age.

The musculoskeletal system region disposed between muscle and tendon tissue cells, also known as the interface region, is the muscle-tendon unit. According to Kjaer (2004) and Kannus (2000), this interface is named MTJ because a specialized and complex

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF THE MTJ OF THE SM MUSCLE

1295

Fig. 3. Transmission electron photomicrographs of the MTJ region. Old group: (A) The end of the muscle cell narrows and is conical with significantly increased adjacent collagen deposition (c). In this extensive region of collagen fibers, tenocyte nuclei (T) and finger-like processes interspersed by invaginations (arrows) are found at the interface. B: An extensive area of collagen deposition (c) is near the periphery and adjacent to the muscle cell, revealing atypical features of sarcoplasmic invaginations (arrows) and their different levels of thick latero-lateral and angular central connections (arrowhead).

C: An extensive region of collagen deposition (*) is adjacent to the muscle cell. In the central region of the muscle cell, there are various levels of sarcoplasmic invaginations forming latero-lateral and angular (arrows) connections with the lateral junctions (arrowheads). D: Increased magnification reveals thickening and irregular shapes of the sarcoplasmic invaginations (arrowheads) formed by collagen fiber bundles (c). Finger-like processes (arrows) show irregular shapes delimited by the sarcoplasmic membrane. Scale Bars, 2 μ m (A-B-C), 1 μ m (D).

anatomical structure located between muscle fibers and tendons.

Analysis of the MTJ region in the newborn group showed high cellular activity as evidenced by a high concentration of oval mitochondria, blood capillaries, and endothelial cell nuclei. Herein, we described the ultrastructural morphology of MTJ development at the end of the cell, delimiting the extracellular matrix elements with thin folds of the sarcolemma forming short invaginations and evaginations. According to Rodriguez-Guzman et al. (2007), during avian limb muscle morphogenesis the relative rate of tendons and muscle fibers of a muscle belly is regulated by a retinoid acid synthesis and degradation balance. The retinoid acid plays an apoptotic signal for muscle tissue and it is also required for tendon maturation, so the development occurs through interactions between skeletal muscle precursor cells and extracellular matrix elements. Kostrominova et al. (2009) emphasized that MTJ development is influenced by the force generated by muscle contractions during the late embryonic and initial neonatal periods (Benjamin and Ralphs, 2000; Yamashita et al., 2007).

Analysis of the MTJ region from the adult group demonstrated highly developed formation of this complex structure, with myofibril bundles aligned with a repetitive pattern of sarcomeres in series and oval

mitochondria in pairs near the Z line at the end of the muscle fiber, corroborating reports by Boncompagni et al. (2009). Classic features of the MTJ were observed in the myofilament bundles delimited by the sarcolemma, forming sarcoplasmic projections named "finger-like processes" (Kojima et al., 2008; Tidball, 1994) that were interspersed with collagen fiber bundles that formed sarcoplasmic invaginations from the extensive region of collagen deposition in the extracellular matrix (Ciena et al., 2012). In addition to being the principal location for force transmission, Trotter (2002) described that the MTJ provides functions, such as motor control, positioning, and joint stabilization, that act as synergistic or antagonistic driving forces and store/release elastic energy.

In the old group, we observed extensive ultrastructural alterations in the MTJ region with increasing age, and the musculoskeletal system showed extensive structural plasticity. These features were marked by the extensive collagen deposition adjacent to the MTJ, alterations in the lengths and shapes of the "finger-like processes", and thickened sarcoplasmic invaginations and central communications with lateral junctions. In our study, it was also observed characteristics of atrophy like substitution of muscle area by connective tissue, and Rodriguez-Guzman et al. (2007) reported during chicken development that under physiological

conditions, cell death removes myofibers lacking stable MTJ.

Our structural findings in the old group are in accordance with descriptions by Roffino et al. (2006) in an experimental model of muscle hypoactivity in primates after a period of space flight. More recently, we reported the main ultrastructural changes in the MTJ of the medial pterygoid muscle in Wistar rats with increasing age (Ciena et al., 2010) presenting similar observations of the present data.

The aspects of muscle ultrastructure even in different biochemical myofibrillar functions, dispositions, and compositions like the model of muscle hypoactivity described by Bazan et al. (2008) and aging described by Ciena et al. (2011) influence the MTJ ultrastructure in the same manner.

In face of these facts, we can conclude that the MTJ changes significantly from the beginning of development, revealing its pattern, and is completely formed during adulthood, exhibiting classic morphological features and changes in the shapes of invaginations and "finger-like processes" through plasticity due to cell hypoactivity with increasing age, possibly compromising its main functions, such as joint stabilization and force transmission.

REFERENCES

- Bazan E, Issa JPM, Watanabe I, Mandarim de Lacerda CA, Del Bel EA, Iyomasa MM. 2008. Ultrastructural and biochemical changes of the pterygoid muscle induced by unilateral exodontias. *Micron* 39:536–543.
- Benjamin M, Ralphs JR. 2000. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol* 196:85–130.
- Boncompagni S, Rossi AE, Micaroni M, Beznoussenko GV, Polishchuk RS, Dirksen RT, Protasi F. 2009. Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Mol Bio Cell* 20:1058–1067.
- Ciena AP, Luques IU, Dias FJ, Almeida SRY, Iyomasa MM, Watanabe IS. 2010. Ultrastructure of the myotendinous junction of the medial pterygoid muscle of adult and aged Wistar rats. *Micron* 41:1011–1014.
- Ciena AP, Almeida SRY, Alves PHM, Bolina-Matos RS, Dias FJ, Issa JP, Iyomasa MM, Watanabe IS. 2011. Histochemical and ultrastructural changes of sternomastoid muscle in aged Wistar rats. *Micron* 42:871–876.
- Ciena AP, Almeida SRY, Dias FJ, Bolina CS, Issa JP, Iyomasa MM, Ogawa K, Watanabe IS. 2012. Fine structure of myotendinous junction between the anterior belly of the digastric muscle and intermediate tendon in adult rats. *Micron* 43:258–262.
- Diogo R, Abdala A, Lonergan N, Wood BA. 2008. From fish to modern humans: comparative anatomy, homologies and evolution of the head and neck musculature. *J Anat* 213:391–424.
- Kannus P. 2000. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10:312–320.
- Kannus P, Jozsa L, Kvist M, Lehto M, Järvinen M. 1992. The effect of immobilization on myotendinous junction: An ultrastructural, histochemical and immunohistochemical study. *Acta Physiol Scand* 144:387–394.
- Kjaer M. 2004. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev* 84:649–698.
- Kojima H, Sakuma E, Mabuchi Y, Mizutani J, Horiuchi O, Wada I, Horiba M, Yamashita Y, Herbert DC, Soji T, Otsuka T. 2008. Ultrastructural changes at the myotendinous junction induced by exercise. *J Orthop Sci* 13:233–239.
- Kostrominova TY, Calve S, Arruda EM, Larkin LM. 2009. Ultrastructure of myotendinous junctions in tendon-skeletal muscle constructs engineered in vitro. *Histol Histopathol* 24:541–550.
- Picoli LC, Dias FJ, Issa JPM, Ogawa K, Ciena A, Iyomasa MM, Lopes RA, Watanabe I. 2011. Ultrastructure of submandibular salivary glands of mouse: Tem and hrsem observations. *Microsc Res Tech* 74:1154–1160.
- Rodriguez-Guzman M, Montero AJ, Santesteban E, Santesteban E, Gañan Y, Macias D, Hurler JM. 2007. Tendon-muscle crosstalk controls muscle bellies morphogenesis, which is mediated by cell death and retinoic signaling. *Dev Biol* 302:267–280.
- Roffino S, Carnino A, Chopard A, Murtin M, Marini JF. 2006. Structural remodeling of unweighted soleus myotendinous junction in monkey. *C R Biol* 329:172–179.
- Sobotka S, Mu L. 2010. Characteristics of tetanic force produced by the sternomastoid muscle of the rat. *J Biomed Biotechnol* 2010:1–10.
- Tidball JG. 1991. Force transmission across muscle cell membranes. *J Biomech* 24:43–52.
- Tidball JG. 1994. Assembly of myotendinous junctions in the chick embryo: Deposition of P68 is an early event in myotendinous junction formation. *Dev Biol* 163:447–456.
- Trotter JA. 2002. Structure-function considerations of muscle-tendon junctions. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 133:1127–1133.
- Watanabe I, Yamada E. 1983. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. *Arch Histol Jpn* 46:173–182.
- Yamashita S, Mcgrath KF, Yuki A, Tamaki H, Kasuga N, Takekura H. 2007. Assembly of transverse tubule architecture in the middle and myotendinous junctional regions in developing rat skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* 28:141–151.