



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

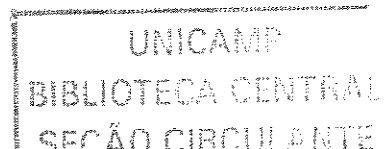
Luis Alberto Domingo Francia Farje

**“CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA JUNÇÃO
MÚSCULO PAPILAR - CORDA TENDÍNEA EM ANIMAIS
NORMAIS E HIPERTENSOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
LUIS ALBERTO DOMINGO FRANCIA FARJE
Jair de Campos Soares
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de Anatomia.

Orientador: Prof.Dr. Jair de Campos Soares



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	7/UNICAMP
	F228c
V	EX
TOMBO BC/	62438
PROC.	10-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	10/3/05
Nº CPD	

BIBID- 342887

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

F227c **Farje, Luis Alberto Domingo Francia**
Características estruturais da junção músculo papilar – corda tendínea em animais normais e hipertensos / Luis Alberto Domingo Francia Farje. -- Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientador: Jair de Campos Soares
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Coração. 2. Músculo. 3. Ultraestrutura(Biologia). I. Soares, Jair de Campos.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

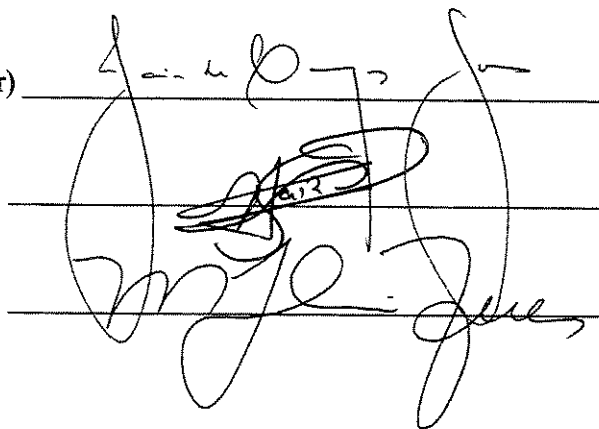
Campinas, 29 de setembro de 2004.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jair de Campos Soares (Orientador)

Prof. Dr. Progresso José Garcia

Prof. Dr. Maria Júlia Marques

Three handwritten signatures are written on three horizontal lines. The first signature is at the top, the second in the middle, and the third at the bottom. The signatures are written in a cursive, flowing style.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	07
RESUMO.....	09
INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DA LITERATURA.....	12
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
ARTIGO.....	28
Tendinous cord-papillary muscle junction: structural characteristics in normal and hypertensive rats	
L. A. D. Francia-Farje ¹ , C. C. D. Almeida ¹ , S. M. M. Matheus ² , J. C. Soares ²	
¹ <i>Department of Anatomy, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil</i>	
CONCLUSÃO GERAL	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

*“Yo te agradezco, O Dios, porque de
una forma tan maravillosa fui
formado, maravillas son tus obras y yo
lo sé muy bien”.*

Salmo 139: 14

Dedico,

Aos meus pais Teobaldo e
Elena, à minha esposa
Camila, às minhas irmãs
Judith, Elizabeth e Maria
Elena; aos meus cunhados
Jhony e Luis e aos meus
sobrinhos Jhonnito e
Kathleen pelo amor, apoio,
confiança e incentivo para
obter o sucesso.

Dedico,

**À memória da minha avó
Juana Maraví e familiares
que não estão mais entre
nós, ...**

Ao Prof. Dr. Jair de Campos Soares.

Meu orientador e amigo, de quem admiro sua fortaleza, persistência, otimismo, bom humor e sobre tudo amor pela ciência e pela educação. Pelos seus ensinamentos e conselhos; por ser a pessoa que esteve sempre ao meu lado compartilhando momentos de fracassos e de acertos e, por ajudar-me com paciência e dedicação na elaboração deste trabalho.

Como vai sua mente

En el inicio de la civilización cultivaban el Yo Mayor. El Yo que sabe lo que es cierto y lo que está errado. Es necesario Coraje para poner en práctica lo cierto. De lo contrario el conflicto aparece. Lo que no permite manifestar la parte cierta, el Bien, es justamente la parte constituida por el yo menor, la carne.

¡Debemos decir que una especie de cosecha está siendo hecha, como tiene que ser, y que ya existe un privilegio, un mérito dentro de cada uno que, en el transcurso de los tiempos, retiraron muchos velos! ¡Son los que tienen el mérito de conseguir captar vibraciones un poco más sutiles! ¡Esto es un privilegio! Por eso están aquí, atendiendo a nuestro llamado. ¡"Quien tiene oídos que oiga!"

DR. CELSO CHARURI
(29 de mayo de 1981)

Agradeço,

À Profa. Maria Júlia pelos aportes oferecidos na participação da banca, pela paciência e compreensão.

Ao Prof. Progresso pelos aportes dados antes e durante a banca de defesa.

Ao Prof. Humberto por estar sempre disposto a colaborar e ajudar.

À Liliam (secretária) pela sua amizade, ajuda, bom humor e paciência.

À Profa. Shirlei pela sua ajuda, sinceridade e amizade.

À Profa. Selma Maria Michelin Matheus pela sua ajuda, disposição amizade e orientação.

Ao Prof. Antônio Marcos Orsi pela sua disposição e amizade.

Ao Prof. Francisco Martinez pela amizade, disposição e ajuda.

À Profa. Ângela pela amizade, ajuda e por ter cedido material indispensável para certas técnicas deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, pelo convívio e amizade.

Aos Professores do Departamento de Morfologia: Alexandre, Cláudia, Luis Fernando, Maeli e Irani, pela ajuda e cooperação.

À Marcinha Torrejais pela amizade e ajuda.

Ao Gelson Rodrigues e Maria Luíza pelo entusiasmo e colaboração.

Ao Claudinei e todos os funcionários do Departamento de Patologia da UNESP de Botucatu pela ajuda no aprendizado e realização da Imunofluorescência.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, Luciano Alves da Cunha, Cleuza de Andrade Freitas, Paulo Sérgio da Silva e Jerusa Verpa.

Aos amigos: Renata, Eduardo e Eduardinho, Renata e Renato, Liliana, Suzi, Rodrigo e Ricardo, Genair e Moisés, pela amizade e companheirismo em todo momento.

Ao Leandro, grande companheiro, amigo e irmão espiritual, pela ajuda, entusiasmo, cooperação e tolerância.

À família Kimoto (Magda, Sanae, Tiemi, D. Margarida) por tratar-me não só como amigo, senão como parte da família. Pelo carinho, ajuda e pelos anos tão belos que vivi junto a vocês.

A todos os meus alunos de línguas e às escolas (CCAA, CCI, PROJETO, GLOBAL e WIZARD) pelos auxílios e amizade que possibilitaram terminar esta etapa da minha vida.

Ao Sr. José Georgette, chefe do Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina, UNESP - Botucatu, pela ajuda nas medições e fornecimento dos animais SHR.

Ao Biotério Central da UNESP – Botucatu, pelo fornecimento dos animais do grupo controle.

Aos meus amigos e colegas Sérgio, Raquel, Karina, Célia, Eliandra, Sílvia, Patrícia pelo convívio, incentivo e amizade.

Aos grandes amigos Alex, Eduardo (QUITO) e Robson pelo incentivo, companheirismo e amizade.

Ao Jorge e à Conceição pela ajuda, alegria e tranqüilidade que sempre transmitiram.

RESUMO

A junção musculotendínea (JMT) é a região de transição entre o tendão e o tecido muscular. Este trabalho visa avaliar as características morfológicas da JMT, através de técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), assim como avaliar o papel da vinculina nessa região por meio da técnica de imunofluorescência na JMT em corações de ratas hipertensas (SHR - Spontaneous Hypertensive Rats) e normais. Os corações (16 SHR e 28 normais) foram retirados e processados para serem estudados à microscopia de luz, MET e MEV. À microscopia de luz, observaram-se as cordas tendíneas ramificando-se e os feixes de colágeno penetrando nas digitações da porção terminal do músculo papilar em ambos os grupos. A densidade de colágeno (embora não avaliada quantitativamente) mostrou-se maior nos animais SHR. O estudo em MEV mostrou que o ápice do músculo papilar das ratas SHR apresentaram-se morfológicamente mais alargado. Os miócitos SHR apresentaram as características gerais dos miócitos de animais normais, ou seja, têm formato alongado, corpo cilíndrico e ápices cônicos. Suas extremidades, em alguns casos, ramificam-se. À MET, pequena quantidade de substância fundamental amorfa e numerosas vesículas sarcoplasmáticas foram observadas no ápice da fibra muscular de animais SHR. No estudo com Imunofluorescência (IF), observou-se que a fluorescência era mais evidente nos animais SHR, onde a marcação do sarcolema apresentava distribuição regular da vinculina formando estriações transversais nas fibras do músculo papilar. Estas estrias tinham conexão com o sarcolema, aparentemente em nível do disco Z do sarcômero. Este resultado sugere que esta proteína desenvolve papel importante na transmissão de força, já que, nas JMT dos animais SHR, a marcação da vinculina é muito mais evidente. Nos animais SHR, a perda da transmissão de força poderia ser

compensada pela maior densidade e aumento de feixes colágenos da conexão músculo papilar-colágeno-valva.

INTRODUÇÃO

Hipertensão arterial – Ratos SHR

A hipertensão arterial é, inquestionavelmente, um dos maiores males que afligem o homem moderno. A vida agitada, os hábitos alimentares inadequados, o estresse, o sedentarismo, associados a fatores genéticos, constituem a base para o desenvolvimento dessa patologia.

Um indivíduo é considerado hipertenso quando a pressão arterial está acima de 140x90 mmHg em adultos, com mais de 18 anos, medida em repouso de quinze minutos e confirmada em três vezes consecutivas e em várias visitas médicas. Elevações ocasionais da pressão podem ocorrer com exercícios físicos, nervosismo, preocupações, drogas, alimentos, fumo, álcool e café.

No Brasil 10 a 15% da população é hipertensa. A maioria das pessoas desconhece que são portadoras de hipertensão e 95% delas têm hipertensão arterial chamada de essencial ou primária (sem causa). Outros 5% têm hipertensão arterial secundária a uma causa bem definida. O achado de hipertensão arterial é elevado nos obesos (20 a 40%), diabéticos (30 a 60%), negros (20 a 30%) e idosos (30 a 50%).

Modelos genéticos de hipertensão experimental têm sido desenvolvidos com o objetivo de mimetizar a patogênese da hipertensão primária humana. Os mais comumente usados são as cepas de ratos espontaneamente hipertensos SHR (spontaneously hypertensive rats) e Dahl, sensíveis ao sal. Os ratos do modelo SHR desenvolvem hipertensão sem necessidade de manobras adicionais tais como sobrecarga de sal e apresentam complicações em órgãos alvos. A

semelhança da hipertensão primária humana, a patogênese da hipertensão no SHR parece ser heterogênea: anormalidades celulares no sistema nervoso central, neurohumorais e renais têm sido observadas. Apesar do debate sobre a aplicabilidade do SHR à hipertensão humana, este modelo tem sido muito útil na avaliação dos efeitos anti-hipertensivos de muitas drogas.

Em que pesem as opiniões contrárias, parece-nos, pelas descrições acima referidas, que os ratos SHR constituem um bom modelo biológico disponível para o estudo da hipertensão arterial e de suas consequências estruturais e funcionais. Embasado nesta premissa, este estudo pretende estudar as eventuais alterações morfológicas da conexão entre o músculo papilar cardíaco e as cordas tendíneas nesses animais e compará-las às conexões de animais saudáveis.

REVISÃO DA LITERATURA

A Junção Musculotendínea (JTM) é a região de transição entre um tendão ou aponeurose e o tecido muscular. Os tendões são estruturas de tecido fibroso denso modelado que possuem enorme força de tensão, bem como alto grau de elasticidade. São compostos por fibrilas colágenas grossas e estriadas, as quais estão regularmente arranjadas em feixes. EVANS & BARBENEL (1975) estudaram as propriedades estruturais e mecânicas dos tendões em relação à sua função. Junto a cada fascículo de fibras colágenas que formam o tendão, fileiras de fibrócitos alongados e achatados estão espalhados ao longo de fibrilas grossas de colágeno. Usando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), JOZSA et al.,(1991) descreveram o tendão em humanos, como uma malha feita por fibras colágenas e SQUIER & BAUSH (1984) caracterizaram a organização tridimensional dos fibroblastos e das fibras colágenas no tendão de ratos.

Como já é sabido, as fibras musculares transmitem a tensão estimada em mais ou menos $1,6 \times 10^4$ Newtons, através da JMT. Macroscopicamente ou à microscopia de luz, as fibras musculares aparentemente terminam diretamente no tendão. Quando se observa em detalhes, nota-se que a extremidade da célula muscular é denteada e que as suas projeções citoplasmáticas interdigitam-se com os feixes de colágeno do tendão que provavelmente se tornam contínuas com fibras reticulares do endomísio. Isto é observado com maior facilidade à MET (GARTNER & HIATT, 1997). Existe uma continuidade estrutural entre as miofibrilas que terminam na face interna do sarcolema da extremidade das fibras musculares, e os componentes da matriz extracelular (feixes de colágeno já mencionados antes) na região da JMT. Esta relação é assegurada através de uma estrutura complexa composta de muitos componentes intra e extracelulares e a intervenção de uma proteína integral de membrana. O sarcolema mostra forma característica na JMT onde é completamente interdigitado (MACKAY et al., 1969; NAKAO, 1975; NAKAO, 1976; TROTTER et al.,1983; TIDBALL et al., 1986;

TIDBALL & CHAN, 1989; TIDBALL & LAW, 1991; LAW, 1993; SENGU et al., 1995). Acredita-se que esse arranjo sirva para diminuir a tensão por unidade de área de membrana e para aumentar a superfície de contato reforçando a adesão entre as fibras musculares e feixes colágenos. Estas invaginações do sarcolema dispõem-se na extremidade distal das fibras musculares sendo o sarcolema coberto externamente por lâmina basal de aproximadamente 300 Å de espessura (MACKAY et al., 1969; TIDBALL, 1984). A lâmina basal é formada por uma lâmina densa com 30 nm de espessura (mais externa e eletrondensa) e por uma lâmina lúcida, ou lâmina rara, com 20 nm de espessura (menos elétron-densa), situada entre o sarcolema e a lâmina densa (MAIR & TOMÉ, 1972; KORNELIUSSEN, 1973; TROTTER et al., 1981; TROTTER et al., 1983; TIDBALL & DANIEL, 1986; TIDBALL & MARK CHAN, 1989; BURRIDGE et al., 1988; BURRIDGE et al., 1992).

AJIRI, et al.(1978) referem que a lâmina basal na extremidade distal da célula muscular, junto ao tendão, tem 300-400 Å de espessura e é mais grossa nesta região do que em outras. Referem também que existe um espaço entre o sarcolema e lâmina basal, a lâmina rara (lâmina lúcida mencionada pelos autores citados anteriormente), a qual é menos densa e possui 200 – 300 Å de espessura. Cabe destacar que fazem menção da lâmina rara como uma estrutura que não faz parte da lâmina basal. Mencionam também que contém fibrilas finas com aspecto granular.

Filamentos finos de actina (6 a 9 nm de diâmetro) do sarcômero terminal estendem-se das margens do disco Z terminal em direção ao sarcolema inserindo-se numa camada de material subplasmalemal denso (MACKAY et al., 1969; MAIR & TOMÉ, 1972; KORNELIUSSEN, 1973; TIDBALL & DANIEL, 1986).

TROTTER, et al., (1983), no estudo sobre os domínios estruturais da JMT, mencionam que os filamentos finos do último sarcômero deixam a última banda A e continuam em direção paralela aos miofilamentos do sarcômero, entrando finalmente numa região subjacente à membrana plasmática, denominando-a de "lâmina interna". Esta lâmina é composta por filamentos finos de aproximadamente 5 nm de diâmetro.

Por outro lado, entre o sarcolema e a lâmina densa da membrana basal, observaram-se também filamentos finos que unem ambas as lâminas (TIDBALL & DANIEL, 1986). KORNELIUSSEN (1973), no seu estudo da ultraestrutura das JMT em ratos, menciona esses filamentos como especializações parecidas a espinhos de 60 Å de espessura. Segundo esta autora, estas especializações formam intersecções transversais em pilhas ao longo das invaginações da membrana plasmática das JMT dos animais estudados. Ela chamou a atenção a estas estruturas como importantes para a transmissão de força das fibras musculares ao tendão.

NAKAO (1975) observando a ultraestrutura da JMT de caudas de girinos e o acoplamento terminal no músculo esquelético da lampréia, verificou que, subjacente ao sarcolema, existem duas lâminas: a camada de união e a lâmina de filamentos de conexão (mais interna); e na face extracelular a lâmina externa (contendo fibras colágenas) e a lâmina intermediária, esta última disposta entre a lâmina externa e o sarcolema. Os filamentos de conexão vão desde o disco Z do último sarcômero até a camada de união. A camada intermediária é observada como a região menos elétron-densa entre o sarcolema e a lâmina externa. Segundo este autor, todos os envoltórios do sarcolema, incluindo a lâmina externa, estão completamente ausentes no segmento terminal das invaginações sarcolemais. (para melhor compreensão veja Figura 1).

NAKAO (1975) notou que a camada de filamentos de conexão é mais fina que a vista no estudo da estrutura fina da JMT de caudas de girinos em 1975. Menciona também que esta camada é mais grossa nas fibras parietais do que nas fibras centrais do músculo esquelético. Segundo o autor, o sarcolema do segmento terminal da invaginação mostra freqüentemente acoplamentos específicos com as cisternas do retículo sarcoplasmático. A lâmina externa é parcial ou completamente deficiente no segmento terminal das invaginações sarcolemais, formando-se acoplamentos terminais, de tal forma que as fibrilas colágenas contidas na invaginação parecem estar em contato direto com o sarcolema. SENGU et al.(1995) mencionam a lâmina externa como parte da

membrana basal e afirmam que as fibrilas colágenas se unem a esta na JMT do músculo esquelético.

Segundo MACKAY, et al., (1969) as fibras colágenas existentes na JMT em ratos aproximam-se do sarcolema e unem-se à face externa da lâmina basal, sendo que muitas delas estendem-se profundamente entre as fendas e invaginações. À medida que as miofibrilas se aproximam da JMT, estas ramificam-se muito mais freqüentemente que em qualquer outro lugar ao longo do músculo. Nos dois últimos sarcômeros, as miofibrilas dividem-se em diversos feixes de miofilamentos os quais se inclinam para os lados das fendas e invaginações sarcolemas onde se inserem à face interna do sarcolema. O sarcômero terminal mostra-se freqüentemente completo, mas não em todos os casos, devido ao plano de corte feito no nível do disco Z; já que os filamentos quando são oblíquos parecem incompletos, dando a aparência de que não chegam até o sarcolema.

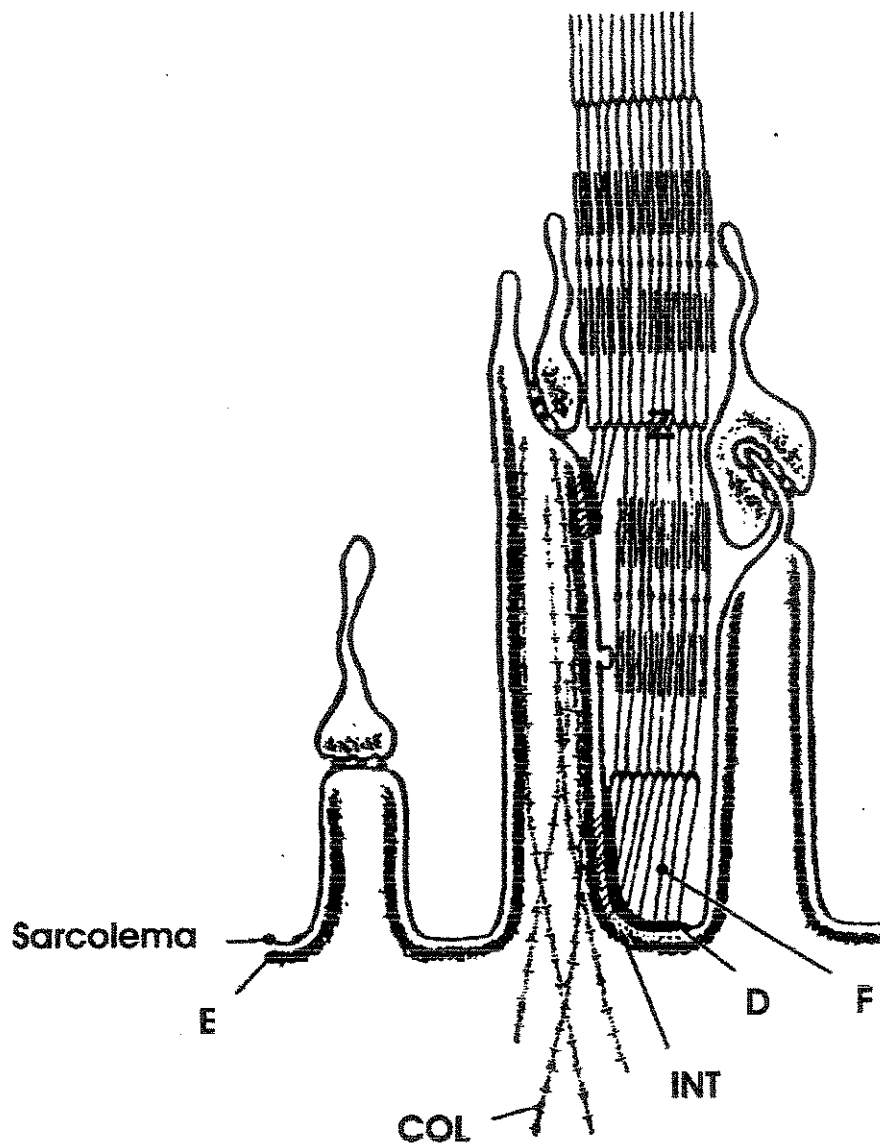


Figura 1- Diagrama resumindo os aspectos ultraestruturais da junção Músculo-tendão do músculo esquelético da lampreia. A superfície extracelular das invaginações digitiformes está coberta, quase totalmente, pela lâmina externa (E). A superfície interna do sarcôlema está coberta pela densa camada de união amorfa (D), dentro da qual filamentos de conexão se inserem formando a camada de filamentos de conexão (F) profunda à camada união. Na área da junção músculo-tendão a camada intermediária (INT) está localizada no espaço entre o sarcôlema e a lâmina externa. Esta camada consiste numa série de estruturas obliquas filamentosas paralelas conectando o sarcôlema e a lâmina externa. Fibrilas ou fibras colágenas (COL) penetram nas invaginações digitiformes e seus lados estão em contato com a lâmina externa. Existe muitos tipos de acoplamentos terminais (Segundo Nakao, 1975).

As tríades, segundo ALBERTS ET AL.(1995), são formadas no músculo esquelético pelas cisternas terminais do retículo sarcoplasmático e pelos túbulos T. O retículo sarcoplasmático é um conjunto de túbulos achatados e anastomosados que circundam, como uma rede, cada miofibrila; e os túbulos T, ou túbulos transversos, são uma série de dobras do sarcolema que envolvem cada miofibrila e se encontram em estreito contato com as cisternas terminais do retículo sarcoplasmático. Estas estruturas são muito importantes na transmissão do impulso nervoso que despolariza o sarcolema na interação molecular geradora de força, pois esta ocorre somente quando a fibra muscular esquelética recebe um sinal vindo do seu axônio motor. Este sinal dispara um potencial de ação na membrana plasmática da célula muscular e esta excitação elétrica se espalha rapidamente pelos túbulos T. Este sinal atravessa um pequeno espaço e alcança as cisternas terminais do retículo sarcoplasmático. Quando as proteínas de membrana dos túbulos T, sensíveis à voltagem, são ativadas pelo potencial de ação que está chegando, elas provocam a abertura de alguns canais de cálcio (Ca^{2+}) do RS, provavelmente por acoplamento mecânico. Assim, os íons Ca^{2+} são liberados passivamente do retículo sarcoplasmático, onde estão armazenados em alta concentração, para a fenda sináptica da junção mioneural provocando a abertura de mais canais, amplificando assim, a resposta. A entrada de grande quantidade de Ca^{2+} no sarcoplasma inicia a contração das miofibrilas. Todas as miofibrilas contraem ao mesmo tempo porque o sinal proveniente da membrana plasmática da célula muscular é transmitido, para cada sarcômero, num intervalo de milissegundos (via túbulos T e retículo sarcoplasmático). O aumento de concentração de Ca^{2+} é transitório, pois o íon é recaptado ativamente para o retículo sarcoplasmático por uma Ca^{2+} ATPase existente na membrana do retículo. Em 30 milissegundos a concentração de Ca^{2+} citoplasmático alcança níveis de repouso e as miofibrilas relaxam.

Por outro lado, uma série de proteínas análogas àquelas encontradas em placas de adesão focal em células não musculares, mediam a conexão dos filamentos finos (filamentos de actina) ao sarcolema (BURRIDGE et al., 1988;

BURRIDGE et al., 1992; BAILLY M., 2003). Os contatos focais são regiões onde a célula se prende fortemente ao substrato, ou seja, a membrana plasmática à matriz extracelular. As principais proteínas transmembrana de ligação nos contatos focais são da família das integrinas, cujo domínio externo se liga a um componente da matriz extracelular e o domínio interno ou citoplasmático está ligado aos filamentos finos (filamentos de actina) das fibras musculares. Esta ligação é indireta, pois é mediada por proteínas de conexão as quais se estendem da miofibrila até a membrana e são seqüencialmente a alfa-actinina, a vinculina e a talina. O domínio citoplasmático da integrina (uma proteína de membrana) liga-se à proteína talina, que por sua vez se liga à vinculina e esta aos filamentos de actina por associação com a α -actinina. (Ver figura 2). É por isso que nestas regiões se observam uma grande quantidade de talina.

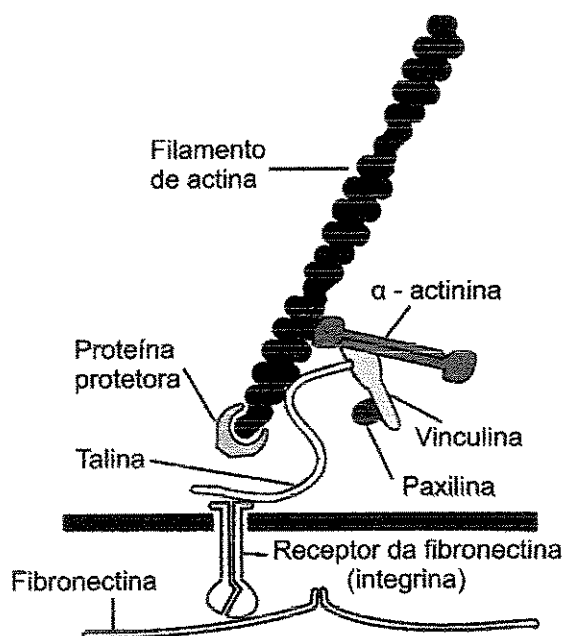


Figura 2: Modelo para explicar como as integrinas da membrana plasmática conectam os filamentos de actina à matriz extracelular através do contato focal. Observa-se as proteínas de conexão a alfa-actinina, a vinculina e a talina, que se estendem seqüencialmente da miofibrila até a membrana. A talina liga-se ao domínio citoplasmático da integrina. Segundo ALBERTS, 1995.

TIDBALL et al.(1986) fizeram um estudo no qual demonstraram que a talina é também encontrada na JMT. Segundo estes investigadores, a talina pode estar envolvida nos processos de transmissão da força dos filamentos de actina à membrana plasmática. Esta proteína é encontrada nas interdigitações que as células musculares formam ao se estenderem dentro dos tendões.

Segundo OTTO (1990), a vinculina está localizada no lado citoplasmático das junções intercelulares que contém actina e, em placas de adesão entre a célula e a matriz extracelular. Visto que a vinculina une a alfa-actinina, a talina, a paxilina e pode oligomerizar-se consigo mesma, sugere-se que ela participe ligando filamentos de actina às integrinas da membrana plasmática. Outros autores têm localizado a vinculina exclusivamente nas bandas Z dos sarcômeros (TERRACIO et al., 1990). Assim, MASSA et al., (1994) estudando os músculos esqueléticos imaturos de ratos de 18 dias de idade, descreveram a detecção imunofluorescente da vinculina numa rede tridimensional formada por costâmeros (bandas sarcoméricas transversais, localizadas próximas ou nas bandas Z) e por fios longitudinais finos ocasionais correndo entre as miofibrilas. Os costâmeros são sítios de ancoragem que conectam a linha Z com o sarcolema lateral e que se dispõem transversalmente dando aspecto de costelas e nos quais encontra-se presente a vinculina (PARDO et al., 1983; ANASTASI et al., 1998; ANASTASI et al., 2003). MASSA et al. (1995) também descreveram a presença da vinculina em domínios juncionais localizados em costâmeros sarcolemas e junções neuromusculares e musculotendíneas, utilizando técnicas de microscopia de imunofluorescência.

BARSTEAD & WATERSON (1991) referem que a função essencial da vinculina em nematódeos é a manutenção da integridade muscular. Ela está em densidades subsarcolemas e pode estar envolvida na união da membrana plasmática ao aparelho contrátil que corre paralelamente à ela. Desse modo, a vinculina reforça a união do aparelho contrátil à periferia da célula, onde esta proteína se insere em ângulos agudos na membrana. Esta função da vinculina está bem demonstrada pelo exame genético de nematódeos, nos quais um defeito no gene da vinculina causa malformações musculares. A função de ancoragem é ilustrada mais claramente pelo disco intercalar do músculo cardíaco e pelas densidades da JMT do músculo esquelético.

Além das já mencionadas, existem outras proteínas importantes como, por exemplo, a desmina que, por sua vez, forma uma rede que provavelmente reforça

o esqueleto citoplasmático na JMT (TIDBALL, 1992). A distrofina é necessária para a associação normal dos filamentos finos ao sarcolema na extremidade da fibra muscular, o que foi verificado nos trabalhos onde se comparavam fibras normais e fibras com problemas relacionados à distrofia muscular de Duchene (D.M.D.). Observou-se que, nesta região da fibra muscular, existem dois tipos de associações que podem ser terminais ou laterais. Nos indivíduos com problemas genéticos relacionados à distrofina (D.M.D), a presença dessa proteína nas associações da extremidade da fibra não foi observada, assim como também se notou a diminuição das pregas ou invaginações do sarcolema (TIDBALL & LAW, 1991).

Afirma-se também que existe uma quantidade maior de distrofina na região da JMT do que em qualquer outro lugar da fibra muscular e é este o motivo pelo qual os defeitos patológicos são mais notórios nesta área (TIDBALL & LAW, 1991). Acredita-se também que a redução de distrofina esteja ligada à redução da densidade de discos Z, os quais são associados a filamentos finos que se estendem desde eles até um material denso subsarcolemal. A integrina, uma proteína integral de membrana, também está localizada na Junção Músculotendínea e proporciona ligação direta entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (SWADLOW, MAYNER, 1989).

Em fibras musculares esqueléticas de vertebrados a JMT representa o lugar onde novos sarcômeros são inseridos durante o crescimento longitudinal da fibra (MACKAY & HARROP, 1969).

Outros estudos mostram que os lipídios da camada bilipídica da membrana plasmática não representam um componente essencial no que se refere à transmissão de energia na JMT (TROTTER, et al., 1981) isso porque, ao extrair-se os lipídios da membrana, com o uso de detergentes não-iônicos, a estrutura da JMT permanece intacta. Os autores também observaram a presença de filamentos finos conectando a lâmina densa da lâmina basal com a camada eletrodensa intracelular, dentro da qual filamentos de actina aparecem fazendo enlaces. Estes filamentos devem passar através do compartimento hidrofóbico da

membrana plasmática. Eles vêm da lâmina lúcida e se enlaçam com estruturas citoplasmáticas, seja por passagem direta ou através da membrana, ou ainda por conexão direta com elementos transmembrana.

Além da Distrofia Muscular de Duchene, a atrofia muscular decorrente de outras patologias causa também mudanças na estrutura da JMT. Por exemplo, nas células atrofiadas pelo excesso de “stress”, observa-se uma diminuição considerável do pregueamento do sarcolema. Nota-se também diminuição dos miofilamentos, especialmente miosina, o que resulta no encurtamento da banda A dos sarcômeros e também na proliferação de mitocôndrias. (TIDBALL, 1984).

Os ribossomos são numerosos no sarcoplasma na extremidade distal da fibra muscular e formam em alguns casos, polirribossomos. Nos ápices das invaginações do sarcolema, grupos de vesículas de 400 Å de diâmetro e retículo endoplasmático rugoso são vistos freqüentemente. Além disso, existem muitas mitocôndrias no sarcoplasma terminal, onde elas são mais compridas que em qualquer outro lugar. São vistas também tríades bem formadas no sarcoplasma terminal dos músculos esqueléticos (MACKAY, et al., 1969).

ICARDO & COLVEE (1995) detalharam a organização dos feixes colágenos nas valvas atrioventriculares de camundongos. O colágeno está organizado num sistema de feixes, os quais são sinuosos ou ondulados e orientados ao longo de linhas de tensão. Desse modo, o colágeno é um componente essencial do tecido valvar assim como da Junção Musculotendínea. Com relação à estrutura do tecido valvar, esses autores afirmam também que as valvas atrioventriculares são formadas por folhetos e estes, por sua vez, formados por duas camadas, uma fibrosa no lado ventricular, e uma esponjosa situada no lado atrial. Esta camada fibrosa está formada por feixes ondulados de colágeno orientados e organizados de forma diferente, tanto no lado esquerdo quanto no direito; e a camada esponjosa, formada nos dois lados por uma rede de fibras colágenas finas sem nenhuma orientação aparente. As extremidades dos músculos papilares mostram formas alongadas e cônicas, no que se refere à valva tricúspide. As fibras de colágeno unem-se à superfície dos miócitos que formam esses músculos. Por

outro lado, componentes colagenosos dos folhetos das valvas mitrais unem-se diretamente aos músculos papilares mitrais através de fibras colágenas que se inserem tangencialmente, sem formação de corda tendínea interposta (ICARDO & COLVEE, 1995). Esses autores sustentam também que, em ambos os lados, os miócitos são envolvidos numa capa de tecido colagenoso o qual possui fibras que se dispõem circularmente e estão fortemente interconectadas.

O músculo cardíaco possui propriedades estruturais e fisiológicas que o distinguem dos músculos esquelético e liso. No homem é formado por tratos de miofibrilas, cada uma com 80 micrômetros de comprimento por cinco micrômetros de diâmetro, contendo um ou dois núcleos, centralmente localizado. Cada célula pode ser parcialmente dividida em dois ou mais ramos em suas extremidades que terminam em contato com outras células. A célula cardíaca exibe estriações que são idênticas àquelas do músculo esquelético, com bandas A, I, H e a linha Z. Entre uma célula e outra existem complexos juncionais muito elaborados que à microscopia de luz aparecem como estriações conspícuas, os discos intercalares (WILLIAMS & WARWICK, 1980). Estes discos são bandas transversais que servem como junções de adesão e comunicação entre as células do músculo cardíaco. Estas junções são complexas e envolvem além de junções de adesão, também junções do tipo “gap” pois permitem a passagem dos íons Ca^{2+} e os distribuem de tal forma que possa ocorrer a contração simultânea do músculo cardíaco (sincício funcional). O sarcômero da fibra muscular cardíaca possui filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina; porém, diferente do músculo esquelético, não possui a nebulina que forma um filamento intermediário cuja função é alinhar os filamentos finos. Por isso, os filamentos finos nas fibras cardíacas não são alinhados uniformemente (ROSS et al., 1993).

As fibras musculares cardíacas possuem ainda grandes e numerosas mitocôndrias e possuem também retículo sarcoplasmático bem desenvolvido, porém não bem organizado e formando tríades com os túbulos T (como visto no músculo esquelético) e, sim díades, nos quais os túbulos T são maiores e apresentam um revestimento similar à lâmina basal que os acompanha para o

interior da célula. Estes se encontram na altura da linha Z e cabe mencionar que no miocárdio do ventrículo esquerdo os túbulos T são maiores que no ventrículo direito (McNUTT, 1969; FAWCETT, 1969; ROSS et al., 1993).

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo descrever e comparar, através de métodos histológicos, de imunofluorescência e de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, as características morfológicas das junções músculos papilares-cordas tendíneas em ratas normais e hipertensas (SHR – spontaneous hypertensive rats).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 44 ratas da mesma idade, sendo 28 normais, adultas, pesando em média 300 g obtidas no Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP; e 16 ratas SHR pesando em média 220 g, obtidas no Biotério de Medicina Experimental da Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu – UNESP. Antes do sacrifício, as pressões arteriais dos animais foram medidas através de manguito caudal.

Os animais foram anestesiados, pesados e, após incisão torácica mediana, as costelas foram seccionadas e o plastrão esternal levantado para exposição das vísceras torácicas.

Os animais foram perfundidos, via ventrículo esquerdo, com solução salina (NaCl a 0,9%) seguida de solução fixadora de paraformaldeído 10%, para o estudo histológico; ou glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,4) para o estudo ultraestrutural. Cerca de 15 minutos antes da perfusão injetou-se, via intraperitoneal, uma dose de heparina de 130 UI/Kg. de peso corpóreo.

Microscopia de luz

Quatro animais normais e dois animais SHR foram submetidos aos procedimentos iniciais. Após perfusão, os corações foram removidos, pesados e, sob microscópio cirúrgico, foram abertos e os músculos papilares retirados com as suas respectivas cordas tendíneas. Os fragmentos foram fixados em solução aquosa de formol a 10%, por um período de 4 horas após o que foram lavados, desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast®.

Secções histológicas com 7 μ m foram obtidas em micrótomo LEICA Spencer – 820®, foram coradas com Tricrômico de Masson. A documentação histológica foi conduzida em fotomicroscópio Axiophot 2 (Zeiss)®.

ESTUDO ULTRAESTRUTURAL

a) Microscopia Eletrônica de Varredura.

Utilizaram-se três animais normais e três SHR. Depois da perfusão vascular com o fixador glutaraldeído 2,5%, retiraram-se fragmentos contendo a extremidade do músculo papilar os quais foram imersos em glutaraldeído 2,5% durante duas horas e lavados em PBS. Os fragmentos foram então submetidos à digestão do tecido conjuntivo com HCl 8 N, sob agitação constante, a 60°C. Após 40 minutos de digestão, as peças foram lavadas em sucessivas trocas de PBS e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em PBS, durante uma hora. Após várias lavagens em PBS e desidratação em séries de concentrações crescentes de álcool, o material foi submetido à secagem em aparelho de ponto crítico Balzers CPD-20®. As peças foram montadas em suporte metálico com cola de prata e foram cobertas com ouro (10 nm) em aparelho Balzers MED-010®. O material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura PHILIPS SEM 515®.

b) Microscopia Eletrônica de Transmissão:

Para este estudo foram usados cinco animais normais e cinco SHR, todos submetidos à perfusão vascular referida anteriormente para MEV. Os corações foram dissecados e pequenas porções contendo os músculos papilares com regiões de implantação das cordas tendíneas foram removidas. Os fragmentos foram imersos no mesmo fixador por três horas e incluídos em resina (Araldite 506®). Na microtomia foram obtidas secções de 0,5 µm de espessura, coradas com azul de metileno e azur II (1:1), analisadas em microscópio óptico e selecionadas áreas específicas para MET. Secções com 60 a 80 nm de espessura foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Alguns testes foram conduzidos visando padronizar a técnica de imunofluorescência. Utilizaram-se cortes de músculo esquelético e cortes com vasos sanguíneos para se obter um controle positivo da reação de imunofluorescência indireta. Além disso, testes com cortes de músculo estriado, foram conduzidos com dois tipos de controle negativo: no primeiro, não se colocou o anticorpo antivinculina nem o anti IgG FITC; e, no segundo tipo, só se omitiu o anticorpo antivinculina.

Para esta técnica utilizaram-se quatro animais normais e três hipertensos. Após remoção dos blocos contendo músculos papilares com porções das cordas tendíneas, os fragmentos foram imersos em n-hexana e depois em nitrogênio líquido. Os blocos foram montados sobre suporte com O.C.T. (OPTIMAL CRITICAL TEMPERATURE - MILLES LABORATORIES USA®). Foram feitos cortes longitudinais com 6 µm de espessura em criostato Cryocut (REICHERT-JUNG- Alemanha®) e montadas lâminas com três cortes cada uma.

Os cortes foram fixados em acetona por 10 minutos (a 4°C) e depois cobertos com soro bloqueador anti-Goat por 30 min. A seguir, adicionou-se o conjugado anti-vinculina¹ durante duas horas, seguida de 3 lavagens de 10 minutos cada, com PBS. Na seqüência, colocou-se o segundo conjugado (anti-IgG) conjugado com FITC² durante uma hora, e fizeram-se 3 lavagens com PBS, de 10 minutos cada. Após montagem com lamínulas, procedeu-se à análise e fotografia dos materiais em microscópio Axiophot 2 - ZEISS® com luz epifluorescente e filtro específico para FITC. Utilizou-se filme Kodak® Gold ASA 400.

1 – Monoclonal antivinculin antibody produced in mouse. Clone hVIN-1 (V 9131)-sigma.

2 – Mouse IgG FITC, titer in 1:64 IF(i) (F5897) – sigma.

Artigo**TENDINOUS CORD-PAPILLARY MUSCLE JUNCTION: STRUCTURAL CHARACTERISTICS IN NORMAL AND HYPERTENSIVE RATS**

L. A. D. Francia-Farje¹, C. C. D. Almeida¹, S. M. M. Matheus², M. M. Torrejais³, J. C. Soares²

¹ *Structural and Cellular Biology Post-Graduation, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil*

²*Department of Anatomy, Institute of Biosciences, Paulista State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil*

³*Biological Sciences and Health Center, UNIOESTE, Cascavel, PR, Brazil*

Abstract

Many works were made about myotendinous junction (MTJ) of striated muscle, but there are few works about MTJ of the heart. The present work aims to evaluate the morphological characteristics of the MTJ through histological, ultrastructural (TEM) and tri-dimensional (SEM) approaches, as well as to evaluate the expression of vinculin, by immunofluorescence, in healthy and hypertensive rats (SHR). The hearts (16 SHR and 28 healthy) were processed for histological, electronmicroscopy (TEM) and scanning microscopy (SEM) studies. The light microscopy shows, in both animal groups, the tendinous cords branching out and the collagen bundles penetrating in the apex of papillary muscle digitations. The SEM study revealed that the papillary muscle apex of SHR rats exhibits widened shape while the healthy rats did not exhibit such feature. Probably the loss of force transmission would be supplied with a higher efficiency by the length of the connection papillary muscle-collagen-valve. In SHR animals it was observed many intercalary discs near to the fiber tip, discreet amount of amorphous intercellular substance and numerous vesicles. In these animals, the expression of vinculin was more evident outlining the sarcolemma with regular distribution forming transverse striations. The presence of this protein in a transversal grooving suggests that the vinculin circles around myofibrils in the Z band region. The vinculin marking in the

MTJ confirmed its important role in the force transmission. These structural and functional characteristics are confirmed in this paper, once there is more evident marking in the tendinous cord-papillary muscle junctions of SHR animals than in healthy control ones.

Key words heart; hypertensive rats; myotendinous junction; tendinous cord; ultra-structure; vinculin.

INTRODUCTION

The Myotendinous Junction (MTJ) is the transition region between a tendon or an aponeurosis and the muscle tissue. The tendons are dense modeled fibrous tissue structures which have huge tension strength, as well as a high stretching rate. They are composed by thick collagen fibrils, which are regularly arranged in bundles. The collagen is a protein which make up the fibers which are organized as bundles, and in the heart are oriented along the tension lines and represents an essential component of the valve tissue as well as of the MTJ. The papillary muscles extremities are long and conic in shape concerning the tricuspid valve. Collagen fibers tie to the myocytes tips which form these muscles. From the mitral valve cusps collagen bundles join directly to the papillary muscles and insert obliquely, without the formation of a typical interposed tendinous cord (Icardo & Colvee, 1995). The muscle fiber terminal sarcolemma is completely invaginated, having a "finger-like" aspect (Mackay et al.1969; Nakao, 1975; Nakao, 1976; Trotter et al.1981; Tidball et al.1986; Tidball & Chan, 1989; Tidball & Law, 1991; Law, 1993).

Correspondence to:

Luis Alberto D. Francia-Farje, Department of Anatomy, Institute of Biosciences, Paulista State University (UNESP), Rubião Junior, CEP18618-000, P.O.BOX 510, Botucatu, SP, Brazil. Phone: # 55 14 3811-6040, Fax: # 55 14 3815-3744, jaircams@ibb.unesp.br

It is believed that this disposition is useful to reduce the tension per membrane surface unity. In this region, the basement membrane is formed by a more external and electron-dense layer; and by a less electron-dense lucid layer that is placed between the sarcolemma and the former (Mair & Tomé, 1972; Korneliussen, 1973; Trotter et al. 1981; Trotter, et al. 1983; Tidball & Daniel, 1986; Tidball & Chan, 1989). Trotter et al. (1983) mentioned that the thin filaments of the terminal sarcomere leave the last A band of a given muscle fiber and continue in a parallel direction to the sarcomere myofilament, finally entering in a subjacent region to the sarcolemma, which was named "Internal layer", composed of filaments with 5 nm diameter. Thin filaments were also observed between the sarcolemma and the dense layer (Tidball & Daniel, 1986). According to BurrIDGE et al., (1988); BurrIDGE et al., (1992) and Bailly (2003) a series of analogous proteins to those found in focal adhesion plates in non-muscular cells, does the connection of the thin filament (actin filaments) to the sarcolemma. The focal contacts are regions where the cell ties strongly to the basement membrane, which means, the sarcolemma to the extracellular matrix. The main transmembrane proteins of connection in the focal contacts are those from the integrins family, whose external domain connects to a component from the extracellular matrix. The internal or cytoplasmic domain is connected to the thin filaments (actin filaments) of the tensional fibers. This connection is indirect, because it is mediated by connection proteins which are starting from the myofibril to the membrane: the α -actinin, the vinculin and the talin. The cytoplasmic domain of the integrin connects to the talin that connects to the vinculin and this one connects to the actin filaments by association with the α -actinin. Other authors have placed the vinculin exclusively in the sarcomere Z band of the myofibril (Terracio et al. 1990). Barstead & Waterston (1991) refer that the essential vinculin function is keeping the muscular integrity; which is in subsarcolemmal densities and can be involved in the plasmatic membrane union to the contractile equipment, which runs in a parallel direction to it to reinforce the union between the contractile equipment and the cell outskirts. This vinculin function is well demonstrated in the nematodes genetic exam, in which a

failure in the vinculin gene causes muscular malformations. Massa et al., (1994) and Anastasi et al., (2003), detected the vinculin, by means of immunofluorescence (IF), in a tridimensional network formed by costameres, by transversal sarcomeric bands placed on or near to the Z bands and by occasional longitudinal thin threads running among the myofibrils.

The present work aims to evaluate the morphological characteristics of the MTJs through histological, TEM and SEM microscopies, as well as to evaluate the vinculin expression, through the immunofluorescence, in the MTJs from papillary muscles of healthy and hypertensive rats (SHR). These informations are relevant for the comprehension of the MTJ structure in the cardiac muscle and allow to compare with the skeletal muscle where the vinculin perform an important role in the muscle integrity maintenance and in the force transmission to the tendon.

MATERIALS AND METHODS

There were used 44 female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of the same age, being 28 normal, adults (150 days old), with average weight of 300 g. and 16 SHR (Spontaneous Hypertensive Rats), with average weight of 220 g. Before the sacrifices, the blood pressure of the animals was measured through the caudal cuff. The animals were anesthetized and weighed. Through a median thoracic incision the skin was displaced, the ribs were sectioned, the external plate was lifted and the thoracic organs exposed. The animals were perfused through the left ventricle with saline solution (NaCl at 0.9%) followed by 10% paraformaldehyde in PBS for the histological study; or 2.5% glutaraldehyde in PBS (0.1 M; pH 7,4) for the ultrastructural study. Around 15 minutes before the perfusion, an i.p. heparin dose at 130 UI/Kg body weight was made.

Weight and Blood Pressure

Statistic Procedure - Student's test for independent samples was made to compare both groups based on information about body weight, heart weight and blood pressure.. All statistical evaluation was made with 5% of significance level (ZAR, 1999).

Light microscopy

Procedures were done in four healthy control and two hypertensive animals. After the perfusion, the hearts were removed, weighed and opened. The papillary muscles were removed with their respective tendinous cords. The fragments were fixed in formaldehyde 10% solution in PBS, during 4 hours. After that, they were washed, dehydrated, clarified and embedded in Paraplast[®]. Histological sections (7 μ m thick) were obtained in an AOTEC Spencer – 820[®] microtome, and were stained with Masson Trichrome method. The histological study and documentation was carried out in an Axiophot 2 (Zeiss)[®] photomicroscope.

Scanning electron microscopy

Three normal animals and three SHR animals were used. After the vascular perfusion with 2.5% glutaraldehyde in PBS, fragments containing the papillary muscles extremities were immersed in the same fixative for two hours and washed overnight in PBS. The fragments were submitted to the connective tissue digestion with 8N HCl, under constant shaking, at 60° C (Desaki & Uehara, 1983). After 40 min digestion, the fragments were washed many times in PBS and post-fixed in 1% osmium tetroxide for one hour. After several washings with PBS and dehydration in a series of increasing alcohol concentrations, the material was dried in Critical Point Balzers equipment CPD-20[®]. The fragments were mounted on a metal stub with silver glue and covered with gold (10 nm) in Balzers MED-010[®] sputter. Specimens were analyzed and photographed with the Philips SEM 515[®].

Transmission electron microscopy

For this study, five healthy and five SHR animals were used, which were perfused as previously described. The hearts were opened and small portions containing the papillary muscles and tendinous cords were excised. The fragments were immersed in the fixative for three hours and embedded in Araldite 506[®]. 0.5 μ m thick sections were stained with methylene blue and azur II (1:1) and selected by light microscopy aimed to TEM examination. Sections (60 to 80 nm thick) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

Indirect Immunofluorescence Microscopy

Tests were carried out aiming to standardize the immunofluorescence technique. Striated muscle and blood vessel histological sections were used in order to get a positive control of the indirect immunofluorescence reaction. Besides, tests were made with muscle sections, where it was not used the first conjugated in order to select the negative controls of the IF reaction. Two types of negative controls were made: in the first one, neither the first conjugate nor the second one were used; and in the second type, only the first conjugated was omitted. For this technique, four healthy and three SHR animals were used. Fragments from MTJs were immersed in N-hexane and then in liquid nitrogen at 180 °C. The blocks were mounted over a stand with O.C.T. (Optimal Critical Temperature – Milles Laboratories, USA[®]). Longitudinal 6 μ m thick sections were made in Cryocut (Reichert - Jung–Germany[®]). The sections were fixed in acetone for 10 minutes (at 4° C) and covered with blocking serum anti-Goat for 30 min. Then, the anti-vinculin was added for two hours, followed by three PBS washings of 10 min. each. After anti-IgG was placed with FITC for one hour, and three PBS washings, 10 min. each were made. The analyses and photographs were made in Axiophot 2 – Zeiss[®] microscope with epifluorescent light and specific filter for FITC. Kodak Gold[®] ASA 400 film was used. The procedures described above were in

accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA), protocol number 01/2000 -CEEA.

RESULTS

Weight and Blood Pressure

At 150 days old, it was observed that normal rats weighed 472.25 ± 11.9 g (n=28) while the hypertensive rats presented weight of 236.25 ± 20.1 g (n=16). The hearts of the SHR animals showed, when the body weight is considered, proportionally bigger than the hearts of the normal animals. The normal hearts weighted 1554 ± 0.055 g, while the SHR ones weighted 1312 ± 0.019 g. The mean weight of the hearts of SHR animals correspond to 0.55% of their body weight, while the hearts of healthy animals correspond to 0.32% of their body weight. The mean blood pressures were of 130 ± 10 mmHg in healthy rats and of 170 ± 10 mmHg in SHR rats. Table 1 shows the mean values and Student's test results concerning the variables mentioned above.

Table 1. Means and SDs and Student's test results of the variables.

Variable	Healthy rats	SHR rats	Student's test
Body weight	472.54 ± 11.9	268.13 ± 20.1	26.21 (P<0.0001)
Heart weight	1554 ± 0.055	1312 ± 0.019	18.50 (P<0.0001)
Blood pressure	130.00	170.00	15.7 (P<0.0001)

The difference in the mean values of the two groups is greater than would be expected by chance, there is a statistically significant difference between the input groups (P=< 0.001).

Light microscopy

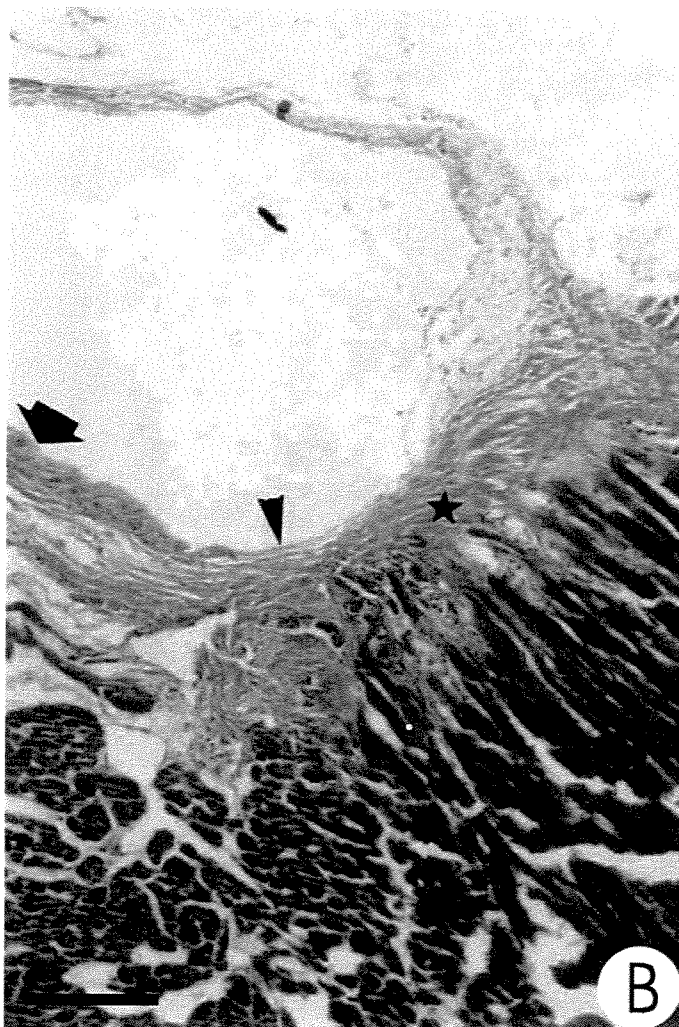
It was observed in the right ventricle of normal rats, the collagen bundles from the tendinous cords branch out and penetrate in the myocytes finger-like projections, in the extremity of the papillary muscle (Fig. 1A). It is also observed, in detail, the

endocardium and the extremities of the muscular fibers where the collagen bundles interconnect (Fig. 1A). The collagen bundles were inserted more deeply in the papillary muscle; in its ventricular wall face. In the SHR animals, very similar aspects were found in longitudinal sections of the papillary muscles in the right ventricle. In both cases, some muscular fibers appeared between dense collagen bundles, already in the core of the tendinous cords. In the left ventricle of SRH animals, typical papillary muscles were not observed but large muscle trabecula from which thin collagen bundles leave and run to insert in the atrioventricular valves. Around the middle third of the muscle trabecula it could be seen a collagen condensation that corresponds to the mitral valve cuspids anchorage. The collagen bundles in that region showed several orientations and penetrated among the trabecula muscle fibers. This aspect could be observed in healthy rats where collagen bundles leave the connective condensations along the trabecula in order to form slender tendinous cords. The region where the most density of collagen tissue was observed, correspond to the cuspid insertion (Fig. 1B). Other smaller points corresponded to the origin of thin tendinous cords which were inserted in the cusp ventricular face of the left atrioventricular valve. In the cranial portion of these trabeculae, the fibrous ring of the mitral valve could be observed (Fig. 1B).

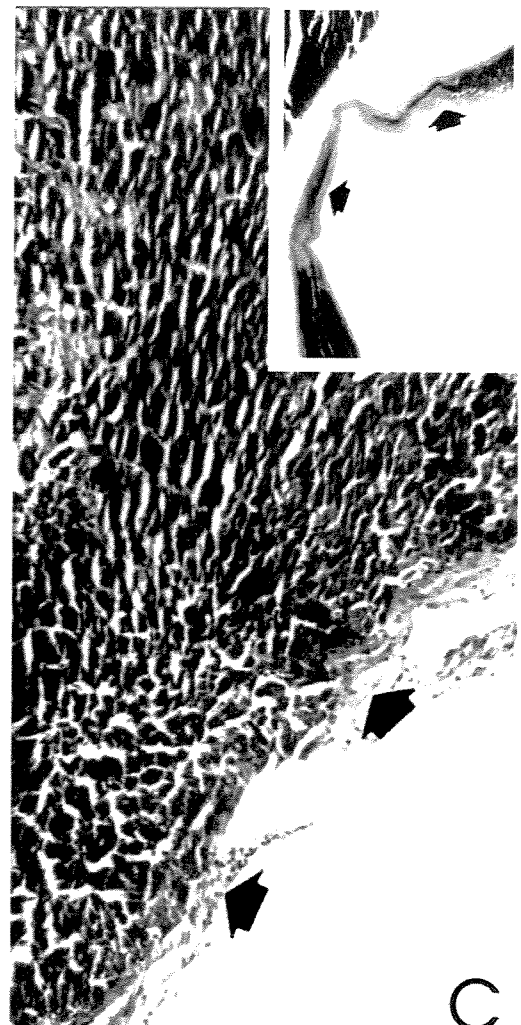
In the hypertensive rats, the muscle trabeculae were much more bulky than those observed in the normal animals. In the proximal region of the fibrous ring, a rich collagen fibers network interconnected with the muscle fibers. Collagen bridges among muscle fibers of the same trabecula or of different trabeculae could be observed (Fig. 1C).



A



B



C

FIG. 1

Fig. 1. A) MTJ longitudinal section in papillary muscle from right ventricle of a normal animal. Collagen bundles (green) and cardiac muscle fibers (red). Cardiac muscle fiber terminations (*) and interposed collagen bundles (arrows). Fibroblast nuclei (arrow heads) and endocardium (small arrows). Notice the collagen bundles advancing more deeply in the face towards the ventricular wall. Masson Trichrome. Scale bar = 25 μ m. B) Muscle trabecula longitudinal section from the left ventricle in normal animal. Collagen bundles condensation (star) in the location of an atrioventricular valve cuspid implantation (arrow head). Thick endocardium above the cuspid implantation (arrow). Masson Trichrome. Scale bar = 50 μ m. C) Muscle trabeculae (longitudinal section) from the left ventricle of SHR animal. Collagen bundles in the intercellular spaces of the myocardium and along the fibrous ring (arrows). Masson Trichrome. Scale bar = 50 μ m. Insertion - Cuspid connection to the myocardium crest detail (arrows). Masson Trichrome Scale bar = 25 μ m.

Scanning Electron Microscopy

In the right ventricle of SHR rats, the papillary muscle is a cylinder in shape, similar to the control animals. The apex of these muscles, however, does not have the typical conic shape of the healthy animals, but a more widened shape. It was also observed that the papillary muscle of SHR animals is not totally free, once besides the muscular fibers of its base there are others which keep it united to the ventricular wall, even in the muscle apex region. The myocardial cells seen in the papillary muscle of the right ventricle are elongated, their bodies are cylindrical and their apex shows a conic aspect. These cells group take a concentric direction to the surface point which the collagen fibers originate the tendinous cords (Fig. 3A). The sincicium fibers of the papillary muscle are connected to one another by bridges (Fig. 3B). In the extremity of the papillary muscles, some muscle cells get apart and project themselves towards the tendinous cord. Other muscle cells which get apart are arranged more distally than the others (Fig. 3D). The collagen fibers are connected among the muscle fibers at different depths and sometimes cross the muscles fibers network through holes (Fig. 3F). Small collagen fibers bundles get apart laterally from the papillary muscle, and have different directions of the main tendinous cord (Fig. 3A). The remaining conjunctive tissue form a kind of a cape which covers the muscle cell apex. As demonstrated in the light microscope study, in the SHR animal left ventricles, the muscle trabecula projects as a crest from the heart apex and towards the mitral valve fibrous ring. The collagen bundles insert obliquely on the wall of this trabecula (Fig. 2A). After the collagen digestion, it was observed in this region a set of muscle fibers with large spaces among themselves, from where the bundles of collagen fibers emerge. This bundle merges with the collagen of the atrioventricular valves (Fig. 2B, 2C and 2D). The myocardial trabeculae is much more complex (Fig. 3C) than the healthy animal. The myocytes have a stretched shape, cylindrical body and conic tips which, in some cases branch out. The myocyte tips are covered with collagen as the right ventricle cells (Fig. 3E).

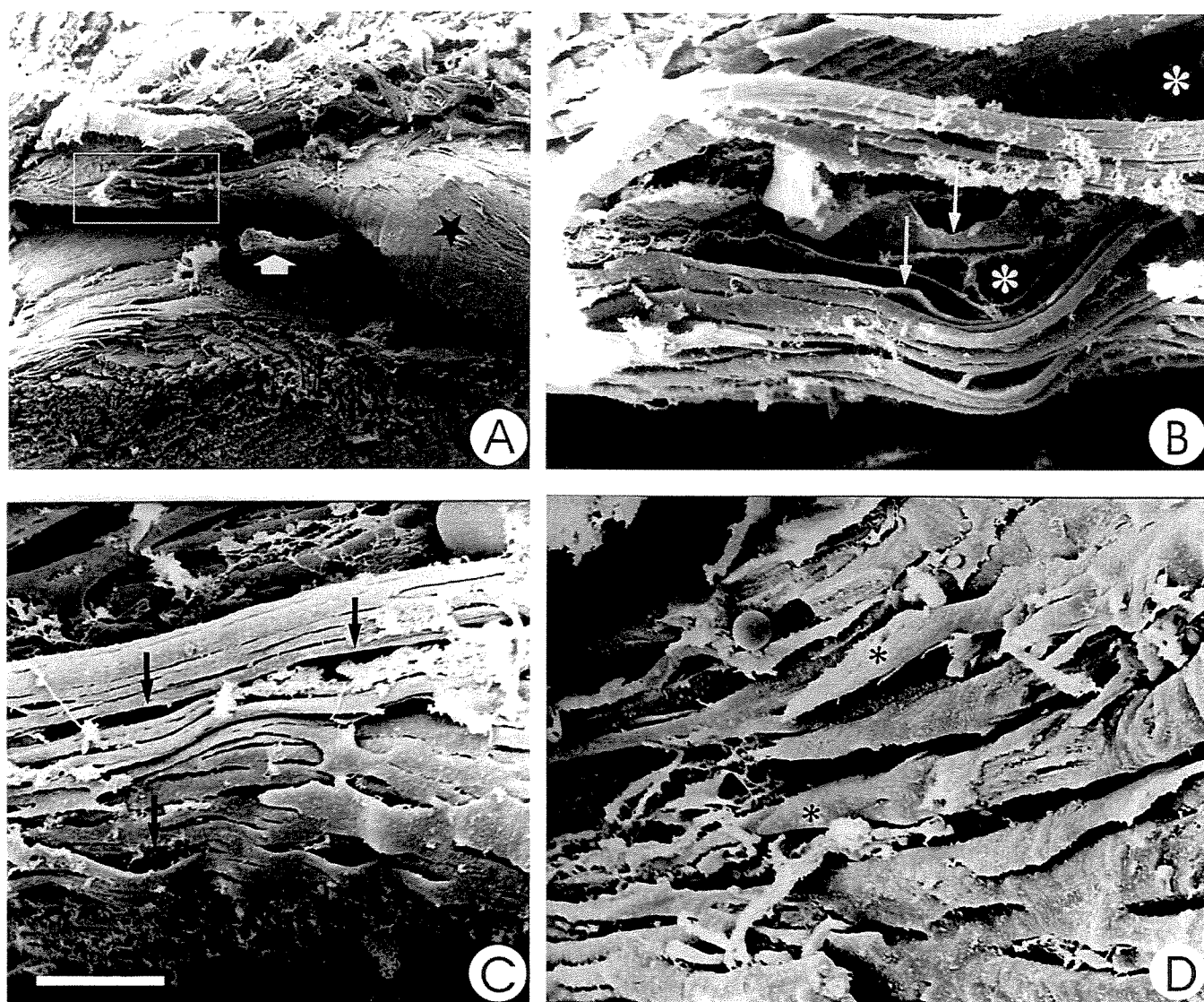


FIG. 2

Fig. 2. A) SEM of the MTJ region from the left ventricle of a normal mouse. Trabecula (star) where a collagen bundle is transversally inserted (wide arrow). Scale bar = 420 μm . B). Detail marked out in A. Larger spaces (*) near the valve with conjunctive tissue sheets (arrows) among the muscle fiber bundles. Scale bar = 50 μm . C) Smaller spaces (arrows) among the muscle fibers, near the heart apex. Scale bar = 50 μm . D) Muscle cells (*) with cylindrical body and conical apex. Scale bar = 25 μm .

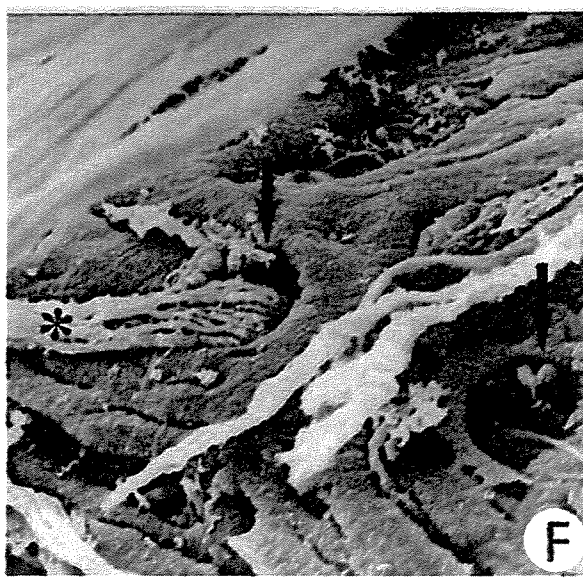
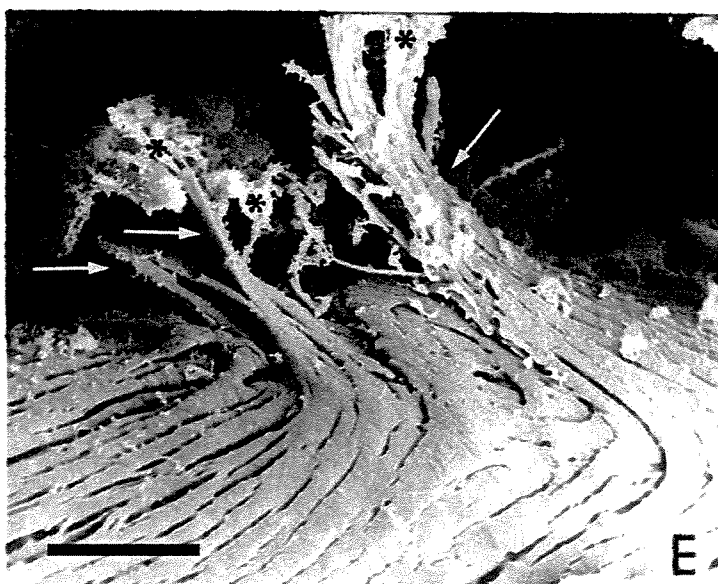
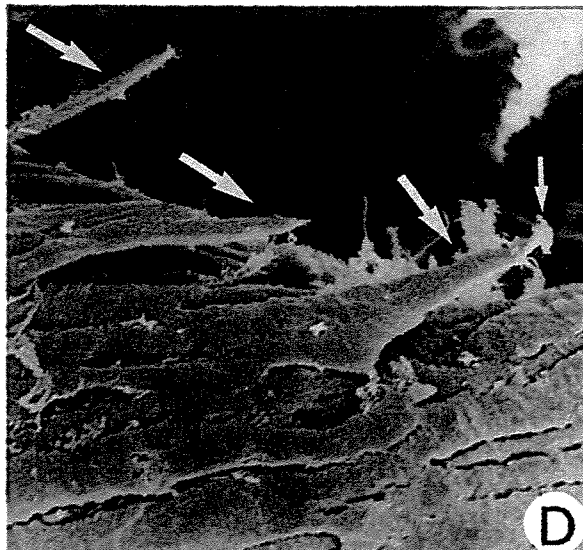
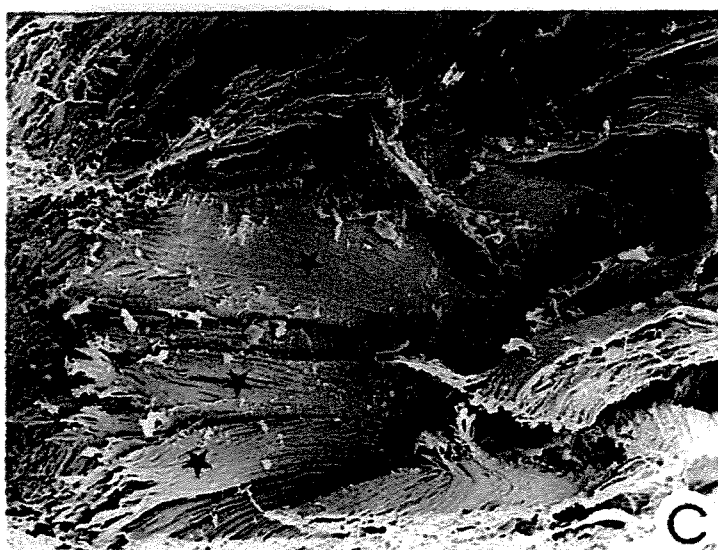
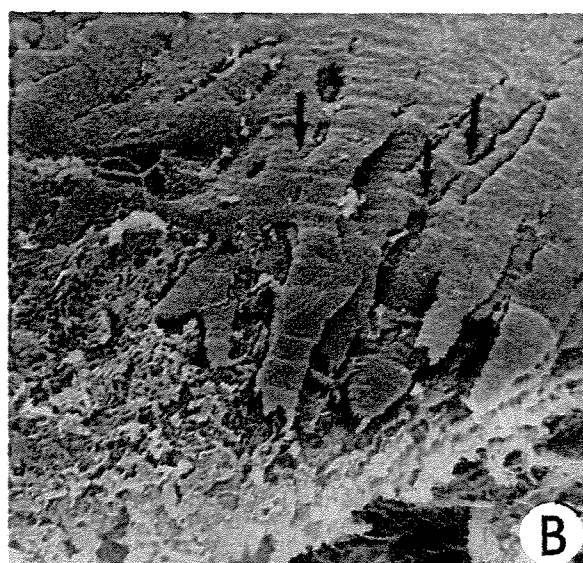
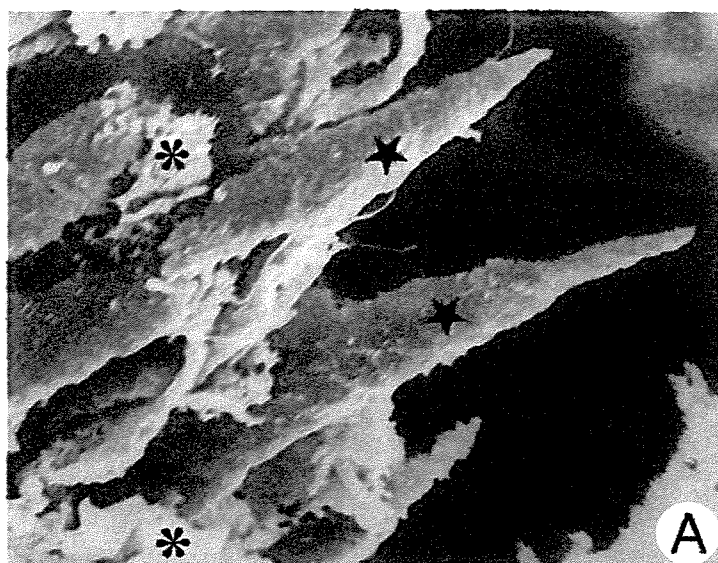


FIG. 3

Fig. 3. A) SEM of the MTJ region from the right ventricle of a SHR rat. Muscle cells apexes (stars). Collagen remains (*). Scale bar = 20 μ m. B) Muscle fibers united by bridges (arrows) forming sinsicium. Scale bar = 30 μ m. C) SEM of the MTJ region from the left ventricle of a SHR rat. General view of the complex myocardium trabeculae. Scale bar = 400 μ m. D) Muscle cells (large arrows) which highlight from the muscle keeping their morphological characteristics. Collagen (small arrow) covering the apex of the cell. Scale bar = 30 μ m. E) Muscle fibers detaching laterally from the ventricle wall and whose apexes are branched (arrows) and covered by collagen (*). Scale bar = 60 μ m. F) Holes (arrows) from where the collagen bundles (*) cross the muscle cells sinsicium. Scale bar = 20 μ m.

Transmission electron microscopy

The TEM study of the myotendinous region in the papillary muscles of both ventricles, in healthy animals, demonstrated that the myocytes do not finish at the same level, as observed in striated skeleton muscles. This way, the invaginations observed here are more heterogeneous, due to the irregularity of myocardial cell tips. However, some extremities of muscle fibers resemble fingers of a glove (Fig. 4 A). In the intercellular spaces, an amorphous substance is observed, in which collagen bundles crossover with different orientations. The muscle fibers extremities showed many closed intercalary discs, isolated or gathered vesicles, and loose contractile filaments. In the intercellular spaces, it can also be observed fibroblasts which send long projections among the collagen bundles and the muscle fibers. These cytoplasmic projections present numerous caveolae (Fig. 4C). In the same way the muscle fiber extremity shows numerous vesicles and caveolae (Fig. 4D and 4F) and at high magnifications, it is possible to identify three layers: the sarcolemma, the dense layer and, between of both, a less electrondense layer (lucid layer). In the internal face of the sarcolemma, it can be seen an internal dense layer composed by dense granules and transversally cut filaments (Fig. 4E and 4F). The collagen fibers are anchored in the dense layer. (Fig. 4E). In the cardiac muscle fiber it can be observed diads formed by a cistern of sarcoplasmic reticulum and a T tubule (Fig. 4B). The ultrastructural observations of the myotendinous region on SHR animals papillary muscles showed, on the first examination, a fingerlike aspect in the region of the muscle fiber apex. (Fig. 5A). Two important characteristics can be noted: an apparent increased density of intercalary discs (not quantified) near to the muscle fiber tip (Fig. 5B) and the discreet amount of amorphous intercellular substance. In the muscle fiber extremity, numerous vesicles can be observed too (Fig. 5C and 5D), as well as the sarcolemma and the lucid and dense layers are very well differentiated. The subsarcolemmal dense layer is noticed in this region too. Collagen fibrils connect to the dense layer. These connections occur laterally or in the apex of the muscle

fiber (Fig. 5C and 5D). Thin microfilaments are arranged ortogonally between the dense layer and the sarcolemma. These microfilaments can be seen as bridges through the lucid layer (Fig. 5C and 5D). In SHR animals, the fibroblasts although not quantified in this study, are more frequent and full of organelles.

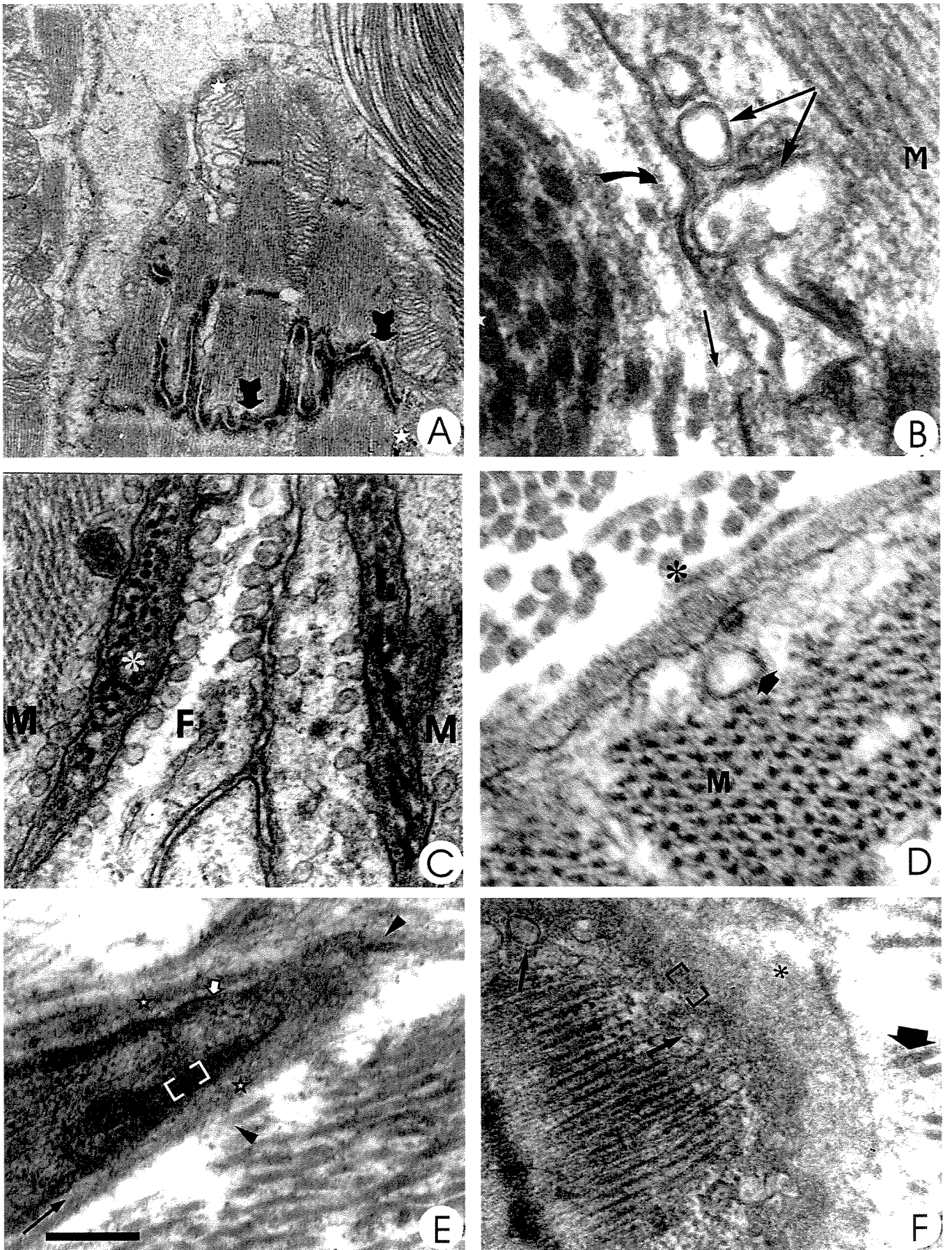


FIG. 4

Fig. 4. A) TEM of the MTJ of a normal animal. Multidirectional collagen bundles. Terminal portion of the muscle fiber with intercalated disc (arrows) and mitochondria (star). Scale bar = 1.0 μm . B) Dense layer (curved arrow), lucid layer (thin arrow) and diads formed by the sarcoplasmic reticulum and T tubule (double arrow). Scale bar = 0.1 μm . C) Cytoplasmic fibroblast processes (F) between two muscular fibers (M). Many caveolae (arrows) in the fibroblasts and also in the muscle fiber. Collagen bundles among the cells (asterisk). Scale bar = 0.25 μm . D) Subsarcolemal vesicle (wide arrow). Collagen fibers (*) in many directions and transverse muscle fibers (M). Scale bar = 0.15 μm . E) Dense layer (stars), lucid layer (thin arrow) and sarcolemma (thick arrow). Collagen fibers connected to the dense layer (arrow heads). The internal lamina is seen immediately internal to the sarcolemma (brackets) Scale bar = 0.2 μm . F) Longitudinal muscle fiber tip detail. Subsarcolemal vesicles and caveolae (thin arrow), lucid layer (asterisk) and collagen fibers (thick arrow). Internal lamina (brackets). Scale bar = 0.2 μm

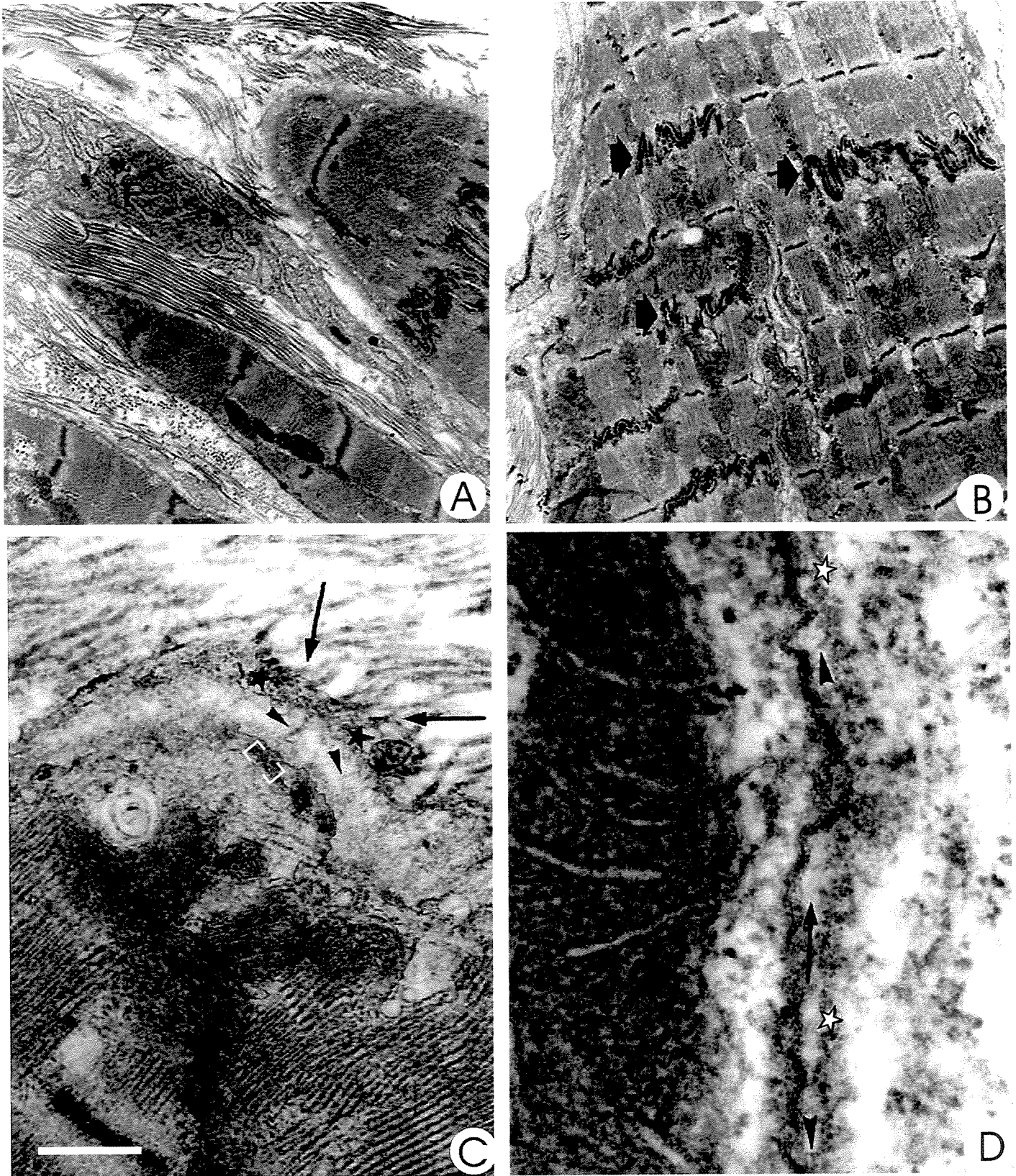


FIG. 5

Fig. 5. TEM of the MTJ region of a SHR mouse. A) Three muscle fibers, one fibroblast (F) and collagen bundles. Scale bar = 0,75 μm . B) Muscle fiber tip with several intercalary discs (arrows). Scale bar = 0,75 μm . C). Muscle fiber tip detail. Microfilaments (arrow heads) through the lucid layer. Collagen fibers (arrows) connecting on the dense layer (stars). Internal lamina (brackets). Scale bar = 0,50 μm . D) Sarcolemma close the muscle fiber apex. Dense (stars) and lucid layers (thin arrow) details, microfilaments crossing the lucid layer (arrowheads). Scale bar = 0,10 μm .

Immunofluorescence microscopy

The indirect immunofluorescence allowed to observe the sarcolemma of the skeleton muscle (control) and the intermyofibrillary spaces. The 6B figure shows a strong fluorescence corresponding to the smooth muscle fibers layers of an control arteriole. In the skeleton muscle transversal sections, the immunofluorescence which outlines the sarcolemma gives a hive aspect to the muscle tissue. In some regions around each muscle fiber, this fluorescence is more intense. This way, in longitudinal sections of normal animal hearts, it can be observed a weak, but evident fluorescence, near the MTJ (Fig. 6A and 6B). In SHR animals, the fluorescence is more evident, outlining the sarcolemma of the muscle fibers, both in the myocardium region as in the MTJ (Fig. 6D). It can be observed a regular distribution of vinculin forming transversal striations (costameres) in the papillary muscle fibers (Fig. 6C and 6E). These striations have a connection to the sarcolemma, apparently in the level of the Z line (Fig. 6C).

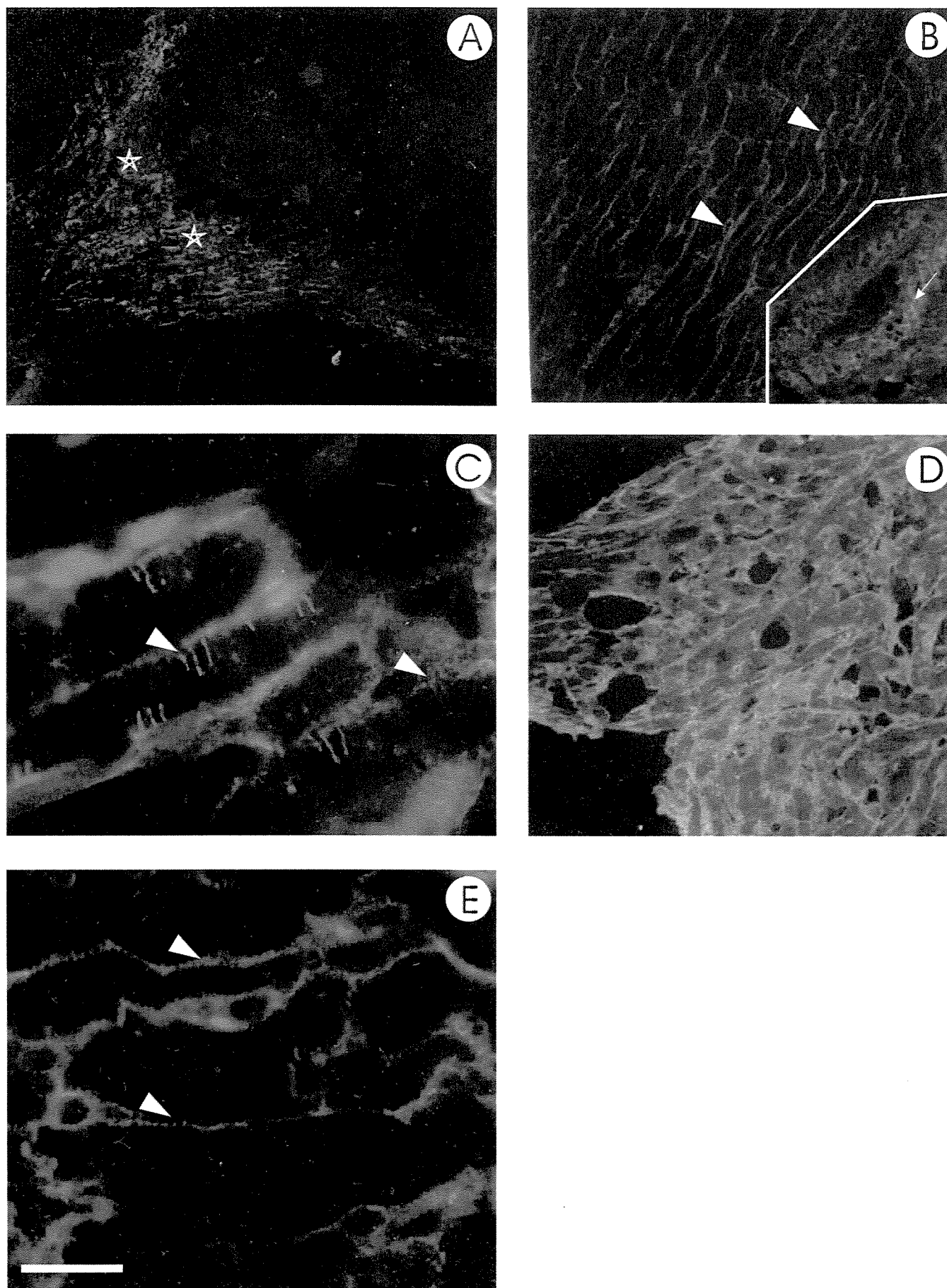


FIG. 6

Fig. 6. Vinculin immunofluorescence marking in MTJ and papillary muscles. A) Longitudinal section of the MTJ from normal rat. Note a higher marking near the cord (stars). Scale bar = 200 μm . B) Longitudinal section of normal myocardium with vinculin outlining the sarcolemma (arrow heads). Scale bar = 200 μm . Insertion: The vinculin on the artery walls (arrow) resembling multilayers (control test). Scale bar = 50 μm . C) Fluorescence transverse marks for vinculin, connecting with the sarcolemma, at the sarcomere Z line level (arrow heads). Scale bar = 40 μm . D) Longitudinal section of the MTJ from SHR heart. Notice a higher intensity on the marking. Scale bar = 200 μm . E) Marking dotted aspect, outlining the sarcolemma of the muscle fibers from the SHR animal (arrow heads). Scale bar = 40 μm .

DISCUSSION

Macroscopic observations and the weight evaluation showed that the healthy animals are bigger than the SHR ones and are in accordance with the average weights of the two animal groups. Although smaller, the SHR animals presented hearts which are proportionally larger than those of the control animals. The early macroscopic observations of SHR hearts are compliant to the morphological alterations which are observed in the hypertensive pathology and structural alterations in cardiac myofibers were not noticed on the optical microscopy. The hypertensive cardiopathy does not present a proper histological status, which can make a difference from it to other cardiopathies and, although there is an increase in size of the cardiac fibers, they do not present, on the microscopic examination, abnormally large (Cotran 1999).

The relations between the tendinous cords and the papillary muscles described in this work, by SEM, are in accordance, at least partially to the descriptions of Icardo & Colvee (1995) in the mouse whose described the collagen bundles connections on the myocytes of papillary muscles in the right ventricle resemble a characteristic MTJ; while in the left ventricle these connections resemble the structure of a pennate muscle. This study showed that the mitral valve cusps insert directly in two crest type muscle trabeculae. Thin tendinous cords, which rise from the trabeculae at several levels, insert in the ventricular face of the cusps. However it cannot be agreed with the suggestion of a pennate pattern muscle, in which, classically, it can be observed a longitudinal intermediate tendon which receives uni or bilateral oblique muscle fibers. In this SEM study the muscle fibers of the trabeculae in the left ventricle have a parallel arrangement which are not present in a pennate muscle.

Structurally, the collagen bundles which come from the tendinous cords on the right ventricle, spread out and penetrate among the fingerlike spaces formed among the myocyte groups in the extremity of the papillary muscle. At the light

microscopy, the muscle fibers seem to finish directly over the tendon and the collagen bundles orientations are suggested by the fibroblasts nuclei. The morphology of this junction resembles a classic MTJ seen in the skeletal muscle (Ross, 1993). The collagen forms a continuous cover wrapping up the papillary muscle and it is more condensed facing the ventricular wall. According to Tidball (1991) and Trotter (1983) this classic arrangement of MTJ optimizes the tension load over the papillary muscle tip. This condensation would represent the point of the highest tension over the connective tissue, resulting from the papillary muscle contraction.

In the left ventricle, the collagen bundles are inserted obliquely on the trabeculae myocytes. According to Icardo & Colvee (1995) this arrangement would be less efficient in the force transmission once a remarkable part of this force would dissipate along the longitudinal vector, in this case, the body of the trabecula. The marginal insertion of the cusps to the myocardium trabeculae tip would compensate such structural arrangement. Although evaluation were not made, the macroscopic observations showed an apparently increased fibrous elements of the cords and cusps of the SHR animals.

Many ultrastructural aspects observed in MTJ of skeletal muscles were described along this work on the cardiac muscle. It is very clear, on the small magnification observations, increased collagen bundles in the interstitial spaces to the detriment of the amorphous fundamental substance, in the hypertensive animals. In the right ventricle of SHR rats, the papillary muscle has a cylindrical aspect similar to the healthy animals, but, the muscle tip is widened suggesting a muscle hypertrophy. The myocardial cells of the papillary muscle in the right ventricle showed a stretched, cylindrical shape and conic tips, similar characteristics as the ones observed by Icardo & Colvee (1995). These morphological characteristics lighten the tension in the terminal region of muscles (Trotter et al.1983; Tidball, 1991; Trotter, 1993). This type of organization is less efficient in the force transmission,

once part of this force dissipates along a longitudinal vector. The connection between the papillary muscle and the mitral valve is very extensive as it happens through many cords which are connected to several points of the papillary muscle. This way, Williams & Warwick (1995), states that the length of this connections makes up for the efficiency loss in the force transmission. These muscles can develop a remarkable contraction power. In SHR animals, a more complex wall trabecula arrangement was observed, probably due to the physiological demand produced by the hypertension. With a higher amount of trabeculae in the ventricle, there would be more connections between the muscles and the valve. The loss of force transmission would be supplied with a higher efficiency by the length of the connection papillary muscle-collagen fibrils-valve. The muscle cells of the left ventricle trabeculae have a stretched, cylindrical shape and conic or branched tips. Some muscle cells show dislocated extremities from the general orientation of the fibers bundle, possibly due to an adaptive way to improving the force transmission in this junction.

The collagen fascicles are distributed in a multidirectional form among the final fingerlike projections of the myofibrils and fibroblasts are observed amid these fascicles. According to Mair & Tomé (1972) this cellular profile means, in the fetus, an intense biological activity. In this work, the observations of these fibroblasts in SHR animals, could mean an increased fibrogenic activity due to the functional requirement of the hypertensive heart.

The fingerlike profile of the myofibrillary terminations in the right ventricle, is explained by several authors, but there is a consensus in which this arrangement would be associated to the increase of the contact surface between myocytes and collagen fibers and consequently a reduction of the tension per membrane unit (Nakao, 1976; Mackay et al.1969). In a critical and detailed study, Nakao (1976) described the fine structure of the MTJ in tadpole tail muscles. This author mentioned that the sarcolemma is internally covered by a connection filament layer and an anchorage layer externally, which is composed by the intermediate layer

and by the external layer with associated collagen fibrils. This last one would be absent in the deepest portion of the terminal invaginations.

The same structures were described by other authors but with a different naming. (Korneliussen, 1973; Trotter et al.1981; Tidball, 1984; Tidball & Daniel, 1986; Trotter et al. 1983; Tidball & Law, 1991; Tidball & Chan, 1989; Korneliussen,1973; Mair & Tomé 1972; Ajiri et al.,1978). Concerning the different nomenclature used, the showed structures in the illustrations of the articles are exactly the same, except for little changes observed in situations with pathological or functional alterations. In this work, the terminology most common in the literature was used, which means, dense layer and lucid layer. The subsarcolemmal densities mentioned by Nakao (1976) as the connection filament layer were observed in this work at large magnifications in both study groups. On the other hand, it could be observed that the dense layer is continuous even in the depth of the invaginations, opposing what was observed by Nakao (1975, 1976) in skeletal muscles. This author had also described, a "terminal connection" between a cistern of the sarcoplasmic reticulum and the sarcolemma, which was not present either in any specimen analyzed in this work. It could not be observed either, in the terminal sarcomeres, the myofibril branches which go towards the subsarcolemmal dense layer as described by Mackay et al.(1969). The microfilaments transversally arranged in the lucid layer, between the dense layer and the sarcolemma, were observed clearly in the SHR animals. Ajiri et al.(1978), called them microfibrils, which in the conventional preparations appear as granular formations, while Korneliussen (1973) called them "spine-like" and Trotter et al.(1985) and Tidball (1984) named them fine filaments. According to Trotter et al.(1983) these microfilaments would, in reality, extending among the intra and extrasarcolemmal dense layers, through three different subunits which are united by covalent connections: a segment between the subsarcolemmal dense layer and the sarcolemma, an intersarcolemmal segment; and a segment which is present in the layer, equivalent to the ones described by other authors. However, as these last

authors have demonstrated, such structures are responsible to the anchorage mechanism between muscle fibers and collagen fibrils.

Numerous caveolae in the muscle fiber tips and micropinocytosis vesicles in fibroblasts were demonstrated in the two groups of study. According to Eisemberg & Milton (1984) the caveolae are commonly observed in the tonic muscle fibers and fasciae, near the MTJs and their function is still unknown. Some hypothesis tried to explain the presence of such structures: they would function as a reservoir of membrane to make up for the stretching of the sarcomere (Dulhunty & Franzini – Armstrong (1975); as the proportion of caveolae and T tubule openings is about the same, they could develop from the caveolae (Franzini–Armstrong et al.1975). In the mature muscle fibers they would have the pinocytic function, although it is questioned the reason of its elevated number and of the non-evidence of its migration along the fiber (Engel & Franzini-Armstrong, 1994). The fibroblast cytoplasmatic extensions also exhibited numerous caveolae whose function highlighted in the literature is that they would represent pinocytosis vesicles. These vesicles are responsible by the aminoacid collection from the extracellular medium which serve as the base for the fibrillar and the connective tissue amorphous substance synthesis (Fawcett, 1966). Based in purely morphological parameters as the ones demonstrated in this work, it is difficult to infer the likely function of these structures observed in the fibroblasts and in the muscle fibers. The data obtained here, however, bring fundamental initial information for a deeper study of the MTJ in normal and SHR animals.

Concerning the vinculin, its presence was confirmed in the plasmatic membrane costameres (Porter et al.,1992; Shear & Bloch, 1985; Anastasi et al., 2003). In this work, the vinculin was only demonstrated in transversal grooves of the myocardial fibers from SHR animals. This more evident marking could be related to the higher expression of this protein, probably due to the enhanced physiological requirement. An increase tension in this region would force a higher production of this protein,

which makes the connection between the cell and the extracellular matrix. The increased protein would give more stability in the transmission force in this junction.

Terracio et al.(1990) observed the intracellular location of the vinculin in longitudinal sections of normal skeleton muscle fibers, and suggested that the vinculin is located inside of the Z disc. Massa et al.(1995) observed the presence of vinculin in a fine intracellular net with a regular reticular pattern in transversal sections. The observations done here agree to the ones of Massa et al., (1995) which described the vinculin located in transversal grooves which are in connection to the sarcolemma, in longitudinal sections. This way, the presence of this protein in transversal grooves suggests that the vinculin circles (double rings) around myofibrils in the Z band region or near the I band region.

Shear & Bloch (1985) suggested that the vinculin has an important role in the force transmission, which is confirmed by the vinculin marking in the transition region between the muscle and the tendon. It can be agreed to these authors, once there is a more evident marking in the tendinous cord-papillary muscle junctions of SHR animals. Vinculin in those places represents a more efficient connection to support increased tension.

In conclusion, the anatomical, structural and ultrastructural changes, as well as the vinculin expression, presented in the SHR animals along this work, would represent adaptative process of this micro-region facing the blood pressure system present in these animals.

Acknowledgments

Supported by FAPESP (Grant 99/05005-1)

References

- Ajiri T, Kimura T, Ito R, Inokuchi S (1978) Microfibrils in the myotendon junctions. *Acta Anat.* 102 (4), 433-439.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (1999) *Fundamentos da Biologia Celular*, 3rd edition. Porto Alegre: Artes Médicas.
- Anastasi G., Amato A., Tarone G., Vita G., Monici M.C., Magaudo L., Brancaccio M., Sidoti A., Trimarchi F., Favaloro A., Cutroneo G. (2003) Distribution and localization of vinculin-talin-integrin system dystrophin-glycoprotein complex in human skeletal muscle. Immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Cells Tissues Organs* 175 (3): 151-164
- Bailly M (2003) Connecting cell adhesion to the actin polymerization machinery: vinculin as the missing link? *Trends Cell Biol.* 13 (4), 163 -165.
- Barstead RJ, Waterston R H (1991) Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J Cell Biol.* 114 (4), 715-724.
- Cotran, Ramzi S (1999) *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 6th edition. Philadelphia. Saunders.
- Dulhunty AF, Franzini – Armstrong C (1975) The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibers at different sarcomere lengths. *J Physiol.* 250: 513-559.
- Eisenberg BR, Milton RL (1984) Muscle fiber terminations at the tendon in the frog's sartorius: A stereological study. *Am J Anat.* 171 (3): 273-284.
- Fawcett DW (1969) *An atlas of fine structure. The Cell its organelles and inclusions.* pp. 353-362; 233-237. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company,.
- Franzini – Armstrong C, Landmesser L, Pilar G (1975) Size and shape of transverse tubule openings in frog twitch muscle fibers. *J Cell Biol.* 64(2): 493-497.
- Gartner, Hiatt L (1997) *Tratado de Histologia. Músculo* 1ª Edição p 131-134. Rio de Janeiro Guanabara Koogan.

- Icardo JM, Colvee E (1995) Atrioventricular valves of the mouse:III. Collagenous Skeleton and Myotendinous Junction. *Anat Rec.* 243: 367-375.
- Korneliussen H (1973) Ultrastructure of myotendinous junctions in Mixine and rat. Specialization between the plasma membrane and the dense layer. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 142(1):91-101.
- Law DJ (1993) Ultrastructural comparison of slack of stretched myotendinous junctions, based on a three-dimensional model of the connecting domain. *J Muscle Res. Cell Motil.* 14(4): 401-411.
- Mackay B, Harrop TJ, Muir AR (1969) The fine structure of the muscle tendon junction in the rat. *Acta Anat.* 73(4): 588-602.
- Mair WG, Tome FM (1972) The ultrastructure of the adult and developing human myotendinous junction. *Acta Neuropathol.* 21(3): 239-252.
- Massa R, Silvestri G, Sancesario G, Bernardi G (1995) Immunocytochemical localization of vinculin in muscle and nerve. *Muscle Nerve.* 18(11): 1277-1284.
- Nakao T (1975) Fine Structure of the myotendinous junction and "Terminal Coupling" in the Skeletal Muscle of the Lamprey, LAMPETRA JAPONICA. *Anat Rec.* 182(3): 321-337.
- Nakao T (1976) Some observations on the fine structure of the myotendinous junction in myotomal muscle of the tadpole tail. *Cell Tissue Res.* 166(2): 241-254.
- Porter GA, Dmytrenko GM, Winkelmann JC, Bloch RJ: Dystrophin colocalizes with β -spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol.* 117: 997-1005, 1992.
- Ross MH, Et al.: *Histología – Texto e Atlas.* 3ª Edição. p 203-240, 1993.
- Shear CR, Bloch RJ (1985) Vinculin in subsarcolemal densities in chicken muscle: localization and relationship to intracellular and extracellular structures. *J Cell Biol.* 101(1): 240-256.
- Terracio L, Simpson Dg, Hilenski L, Carver W, Decker Rs, Vinson N, Borg Tk (1990) Distribution of vinculin in the Z-disk of striated muscle: analysis by laser scanning confocal microscopy. *J Cell Physiol.* 145(1): 78-87.

- Tidball JG (1984) Myotendinous junction: Morphological changes and mechanical failure associated with muscle cell atrophy. *Exp Mol Pathol.* 40(1): 1-12.
- Tidball JG, Law DJ (1991) Dystrophin is required for normal thin filament-membrane associations at myotendinous junctions. *Am J Pathol.* 138(1): 17-21.
- Tidball JG, Chan M (1989) Adhesive strength of single muscle cells to basement membrane at myotendinous junctions. *J Appl Physiol.* 67(3): 1063-1069.
- Tidball JG, Daniel TL (1986) Myotendinous junctions of tonic muscle cells: Structure and loading. *Cell Tissue Res.* 245(2): 315-322.
- Trotter JA, Eberhard S, Samora A (1983) Structural domains of the muscle-tendon junction. 1. The internal lamina and the connecting domain. *Anat Rec.* 207(4): 573-591.
- Trotter JA, Corbett K, Avner BP (1981) Structure and function of the murine muscle-tendon junction. *Anat Rec.* 201(2): 293-302.
- Williams P & Warwick R (1995) *Gray's Anatomy*. 37th Edition. p 516-518. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical analysis*, 4th. Ed. Prentice-Hall, New Jersey, 663p.

CONCLUSÃO GERAL

A literatura disponível sobre a JMT permite concluir que as modificações anatômicas, estruturais e ultra-estruturais, bem como a expressão da vinculina, apresentadas nos animais SHR ao longo deste trabalho, representam processos adaptativos dessa micro-região (JMT), frente ao sistema de pressão presente no coração desses animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJIRI T., KIMURA T., ITO R., INOKUCHI S.: Microfibrils in the myotendon junctions. *Acta Anat* 102: 433-439, 1978
- ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P Fundamentos da Biologia Celular, 3rd edition... Porto Alegre: Artes Médicas. 847p, 1999.
- ANASTASI G., CUTRONEO G., SANTORO G., TRIMARCHI F.: The non-junctional sarcolemmal cytoskeleton: the costameres. *Ital J Anat Embryol* 103 (1): 1-11, 1998.
- ANASTASI G., AMATO A., TARONE G., VITA G., MONICI M.C., MAGAUDDA L., BRANCACCIO M., SIDOTI A., TRIMARCHI F., FAVALORO A., CUTRONEO G.: Distribution and localization of vinculin-talin-integrin system dystrophin-glycoprotein complex in human skeletal muscle. Immunohistochemical study using confocal laser scanning microscopy. *Cells Tissues Organs* 175 (3): 151-164, 2003.
- BAILLY M.: Connecting cell adhesion to the actin polymerization machinery: vinculin as the missing link? *Trends Cell Biol* 13 (4):163 -165, 2003.
- BARSTEAD R.J., WATERSTON R.H.: Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J Cell Biol* 114: 715-724, 1991.
- BURRIDGE K., FATH K., KELLY T., NUCKOLLS G., TURNER C.: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann Rev. Cell Biol* 4: 487-525, 1988.

BURRIDGE K., TURNER, CE., ROMER, L.H.: Tyrosine phos-phorylation of paxillin and ppl25^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly *J. Cell Biol.* 119:893-903, 1992.

EVANS J. H., BARBENEL J. C.: Estructural and mechanical propperties of tendon related to function. *Equine Vet. J.*, 7: 1-8, 1975.

FAWCETT D.W.: An atlas of fine structure. The Cell its organelles and inclusions. W. B. Saunders. Company, Philadelphia and London. p. 353-362; 233-237, 1969.

GARTNER , HIATT L (1997) Tratado de Histologia. Músculo 1ª Edição Rio de Janeiro .Guanabara Koogan p 131-134, 1997.

ICARDO J.M., COLVEE E.: Atrioventricular valves of the mouse:III. Collagenous Skeleton and Myotendinous Junction. *Anat Rec* 243: 367-375, 1995.

JOZSA L., KANNUS P., BALINT J. B., REFFY A.: Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat.*, 142: 306-312, 1991.

KORNELIUSSEN H.: Ultrastructure of miotendinous junctions in Mixine and rat. Specializations between the plasma membrane and the lamina densa. *Z Anat Ent Gesch.* 142: 91-101, 1973.

LAW D. J.: Ultrastructural comparision of slack of estretched myotendinous junctions, based on a three-dimensional model of the connecting domain. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 14: 401-411, 1993.

MACKAY B., HARROP T.J., MUIR A.R.: The fine structure of the muscle tendon junction in the rat. *Acta Anat* 73: 588-604, 1969.

MAIR W.G.P., TOMÉ F.M.S.: The ultrastructure of the adult and developing human myotendinous junction. *Acta Neuropath* 21: 239-252, 1972.

MASSA R., SILVESTRI G., SANCESARIO G., BERNARDI G.
Immunocytochemical localization of vinculin in muscle and nerve. *Muscle & Nerve* 18: 1277-1284, 1995.

McNUTT N.S.: Ultrastructure of the Myocardial Sarcolemma. *Circulation Research*. Vol 37, July 1975.

NAKAO T.: Fine Structure of the myotendinous junction and "Terminal Coupling" in the Skeletal Muscle of the Lamprey, *lampetra japonica*. *Anat Rec* 182: 321-338, 1975.

NAKAO T.: Some observations on the fine structure of the myotendinous junction in myotomal muscles of the tadpole tail. *Cell Tiss Res*. 166, 241-254, 1976.

OTTO JJ.: Vinculin. *Cell Motil Cytoskel*. 16:1-6, 1990.

PARDO J.V., SILICIANO J.D., CRAIG S.W.: Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *J Cell Biol*. 97(4): 1081-1088, 1983.

PORTER G.A., DMYTRENKO G.M., WINKELMANN J.C., BLOCH R.J.: Dystrophin colocalizes with β -spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol*. 117: 997-1005, 1992.

ROSS M.H.. Et al.: Histología – Texto e Atlas. 3ª Edição. p 203-240, 1993.

SENGA K., KOBAYASHI M., HATTORI H., YASUE K., MIZUTANI H., UEDA M., HOCINO T. Tipe VI collagen in mouse Masseter Tendón, from osseous attachment to myotendinous junction. *Anat Rec* 243: 294-302, 1995.

SQUIER C. A., BAUSH W. H.: Three-dimensional organization of fibroblasts and collagen fibrils in rat tail tendon. *Cell Tiss Res*, 238: 319-327, 1984.

SWASDISON S., MAYNE R.: Location of the integrin complex and extracellular matrix molecules at the chicken myotendinous junction. *Cell Tissue Res* 257:537, 1989.

TERRACIO L., SIMPSON DG., HILENSKI L., CARVER W., DECKER RS., VINSON N., BORG TK.: Distribution of vinculin in the Z disk of striated muscle: analysis by laser scanning confocal microscopy. *J Cell Physiol.* 145: 78-87, 1990.

TIDBALL J.G.: Myotendinous junctions: morphological changes and mechanical failure associated with muscle cell atrophy. *Exp Molec Pathol* 40: 1-12, 1984.

TIDBALL J.G.: Desmin at myotendinous junctions. *Exp Cell Res* 199: 206-212, 1992.

TIDBALL J.G., LAW D.J.: Dystrophin is required for normal thin filament-membrane association at myotendon junctions. *Am J Pathol* 138: 17-21, 1991.

TIDBALL J.G., O'HALLORAN T., BURRIDGE K.: Talin at the myotendinous junctions. *J Cell Biol* 103: 1465-1472, 1986.

TIDBALL J.G., CHAN M.: Adhesive strength of single muscle cells to basement membrane at myotendinous junctions. *J Appl Physiol* 67(3): 1063-1069, 1989.

TIDBALL J.G., DANIEL T.L.: Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell Tissue Res* 245:315-322, 1986.

TROTTER J.Á., EBERHARD S., SAMORA A.: Structural domains of the muscle-tendon junction. 1. The internal lamina and the connecting domain. *Anat Rec* 207: 573-591, 1983.

TROTTER J.Á., EBERHARD S., DUCHEN L.W.: Structural domains of the muscle-tendon junction.1. The internal lamina and the connecting domain. *Anat Rec* 207: 573-591, 1983.

WILLIAMS & WARWICK– Gray's Anatomy 36th Edition. W. B. Saunders. Company, Philadelphia p 516-518, 1980.