ALINE GONÇALVES

**Repercussões morfológicas da distrofia muscular sobre a cartilagem do
processo condilar da mandíbula de modelos murinos**

São Paulo

2017

ALINE GONÇALVES

**Repercussões morfológicas da distrofia muscular sobre a
cartilagem do processo condilar da mandíbula de modelos
murinos**

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 a
obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Edson Aparecido
Liberti

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3537
FMVZ

Gonçalves, Aline
Repercussões morfológicas da distrofia muscular sobre a cartilagem do processo
condilar da mandíbula de modelos murinos. / Aline Gonçalves. -- 2017
80 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2017.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Crescimento facial. 2. Degenerações neuromusculares. 3. Morfometria. 4. *large^{myd}*.
5. *dmd^{mdx}*. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Repercussões morfológicas da distrofia muscular na cartilagem do processo condilar da mandíbula de modelos murinos", protocolada sob o CEUA nº 5900290517, sob a responsabilidade de **Edson Aparecido Liberti e equipe**; Aline Gonçalves - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/06/2017.

We certify that the proposal "Morphological effects of muscular dystrophy on the cartilage of the mandibular condylar process of murine models", utilizing 5 Heterogenics mice (5 males), protocol number CEUA 5900290517, under the responsibility of **Edson Aparecido Liberti and team**; Aline Gonçalves - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/01/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2013 a 07/2017** Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **04 a 10 semanas** N: **5**

Linagem: **C57**

Peso: **10 a 24 kg**

Resumo: As distrofias musculares (DM) [] doenças genéticas ou congênitas de caráter irreversível e progressivo [] são caracterizadas por degenerações da musculatura esquelética capazes de induzir anomalias ósseas como resultado da perda de função do músculo. Osteopenia, fraturas por fragilidade, escoliose, além de danos nos processos de crescimento e remodelação que levam a diferenças de forma e de tamanho são modificações ósseas decorrentes desse conjunto de doenças musculares. Os músculos da cabeça e pescoço são também afetados em vários tipos de distrofias, alterando a morfologia craniofacial e a oclusão dentária. Por sua vez, a cartilagem do processo condilar da mandíbula (PC), uma das estruturas responsáveis pelo crescimento facial, por estar sob a influência direta de fatores intrínsecos (genéticos, epigenéticos) e extrínsecos (estimulação mecânica, tipo de alimentação etc), pode ter a sua morfologia prejudicada já que, os músculos faciais e da mastigação são, frequentemente, afetados nos distúrbios degenerativos neuromusculares.

Local do experimento: LAFACC- laboratório de Anatomia Funcional Aplicada a Clínica e a Cirurgia, Departamento de Anatomia USP, ICB-III

São Paulo, 22 de junho de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

ERRATA

GONÇALVES, A. **Repercussões morfológicas da distrofia muscular sobre a cartilagem do processo condilar da mandíbula de modelos murinos**. [Morphological effects of muscular dystrophy in mandibular condylar cartilage of the murine models]. 2017. 79 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	2º	80 f.	79 f.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GONÇALVES, Aline

Título: Repercussões morfológicas da distrofia muscular sobre a cartilagem do processo condilar da mandíbula de modelos murinos.

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 a obtenção do título de Doutora em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Dedicatória

Aos meus pais eu dedico essa Tese e tento aqui retribuir da forma como eles sempre desejaram, propuseram e oportunizaram: através do estudo.

Todo o cuidado e toda à minha vida eu devo:

À minha mãe, Maria Aparecida Martins Gonçalves, a quem eu agradeço infinitamente por me amar e me educar com um vanguardismo que nem mesmo ela sabe que tem em si. Por me fazer acreditar que tudo é possível. Da minha busca pelo conhecimento, passando pelos surtos de criatividade, pelo humor que tudo salva e até um pouco da minha loucura inofensiva, certamente devo tudo isso a ela.

Ao meu pai, Carlos Gonçalves eu agradeço do fundo do meu coração, pelo amor incondicional, por reconhecer a minha autonomia e pelo incentivo e afeto constantes. De quem herdei a rebeldia necessária e quem, quase que sem querer, sempre demonstrou que nada mais importa do que aquilo que nos faz bem. Obrigada por muitas coisas, sobretudo, por dar firmeza aos meus passos.

Com o amor e a proteção de vocês, sigo na vida tentando fazer o certo.

Agradecimentos especiais

Agradeço à querida, insubstituível e inesquecível: Sílvia de Campos Boldrini (*In memoriam*), uma pessoa feita de inteligência, beleza e ternura, que trouxe, dentre tantas coisas, sabedoria e alegria para a minha vida e cuja ausência ainda muito me dói. Apesar do tempo sem você e não apenas pela imensa saudade, eu ainda tenho muito a te agradecer: pela oportunidade inicial, por todos os sonhos que você fez com que eu também sonhasse e por todo o carinho que eu encontrei em você. À visão delicada e determinada das coisas que me ensinou a enxergar. À pluralidade de pensamentos que você ousava apoiar. O modo de saber direcionar-me ao que realmente importava. Foi assim que você tocou a minha vida e também é assim, ainda, que você se faz presente: em muitas decisões que eu tomo, em muitos projetos que realizo, e, de forma igualmente marcante, nas palavras desta Tese. E na contradição dessa nostalgia, carrego a gratidão de quem tem na memória um pouco da sua coragem transmitida em um sorriso que apagava a dureza do resto. Assim, o que sobrou foi continuar a vida e quando lembrar-me de você, abrir o mesmo sorriso tímido. Sorriso de quem a vida tornou mais forte por saber que uma reconstrução é possível.

Agradeço àquele que se tornou o meu orientador, mas que muito antes disso marcou de forma única a minha formação. Não um cirurgião-dentista, tampouco um mero tutor para a elaboração desse trabalho. Mas sim o anatomossauro e o querido mestre. Alguém que sabe relacionar na prática a vitalidade da juventude curiosa com os anos de aprendizado. Alguém que com seu avental surrado e ainda encoberto de giz, não faz outra coisa além de ensinar a todo o tempo. Ensinar aquilo que está muito além dos muros da universidade, pois na sua calejada jornada ele nos faz enxergar que nada como a própria vida pra ensinar certas coisas. E com essa sabedoria e com a autenticidade que se coloca no mundo, ele simplesmente forma pessoas. E de alguma forma, eu sempre reconheci que estive diante do que é privilégio de poucos. A convivência com o senhor traduz o porquê do professor ser tão importante, da razão pela qual algumas pessoas ainda insistem em entrar numa sala de aula e fazer um bom trabalho. Por tudo isso que devo não só agradecê-lo, mas também tenho o prazer de dizer: ótimo trabalho, meu eterno professor de Anatomia, Edson Liberti!

Agradecimentos

Sempre há uma razão para ser grata:

Às minhas irmãs pelos 50% de genes que compartilhamos e que nos tornam tão iguais e tão distintas ao mesmo tempo. À Renata Gonçalves pela imensa ajuda, por cozinhar pra mim e pelas bobadeiras de uma vida inteira. À Cláudia Gonçalves por ser a referência que pautou a minha formação.

À minha tia Ivanir Martins, minha madrinha, que sempre me ajudou e me amou, mas que também esteve à disposição numa das horas mais difíceis e iniciais de todo esse ciclo que essa Tese encerra. Amo você, tia!

À amiga-irmã Adriana Paiato, que a graduação em Odontologia me deu e que segue firme e forte ao meu lado. Pelas caronas, parcerias de clínica, resgates, revoltas e conversas sobre as mazelas da vida. E ainda, por me dar mais um amigo e um sobrinho: Rodrigo e Benício. Amo vocês, cabeçaço!

À Amanda Nardis simplesmente por ser amiga no sentido mais profundo que consigo conceder à palavra.

À Lia Flávia Rodrigues pelos laços afetivos que compartilhamos e pelas afinidades que só são possíveis entre grandes amigas.

Ao querido Kleber Nigro por sua alma especial, pela magia das coisas simples, por me aguentar no meio de todo esse processo e, sobretudo, pelo amor, carinho e afetos infinitos de todos os dias.

Ao Ziggy, pessoa não humana que dormiu sobre meus livros, mordeu incessantemente o meu computador, mas que em todos esses momentos, acrescentou ternura ao processo árduo do estudo.

Aos grandes amigos que ganhei nesse caminho:

À Joice Bertaglia devo muito mais que um agradecimento (e, provavelmente, algum dinheiro). Obrigada pela enorme amizade, pela parceria, pelas importantes trocas de ideias para a elaboração dessa pesquisa, pelo esclarecimento de dúvidas, pelo enorme incentivo não só a essa Tese, mas a todos os meus projetos de vida. Obrigada por se manter sempre por perto, pelas aventuras estranhas, pelas conversas aleatórias, pelas desengonçadas danças e

por seu humor que suaviza inúmeras situações. No final, o que a gente ganha mesmo é quem permanece ao nosso lado.

Ao meu grande amigo Jodonai Barbosa pela amizade valiosa e pela simplicidade que demonstra uma face muitas vezes escondida do ser humano. Obrigada por sanar minhas dúvidas sobre Anatomia, por se preocupar comigo mesmo de longe, por me ensinar os termos nordestinos que tanto me divertem e por ser um professor com imensa dedicação ao trabalho que me contagia e me enche de orgulho.

Ao amigo Marcelo Cavalli, pelas trocas acadêmicas, pelas infinitas conversas de laboratório, pelos inúmeros projetos no nosso pequeno “mundo das ideias” e pela grande amizade.

À Aline Marosti, minha xará, pela presença importante em muitos bons momentos, pelo auxílio em diversas ocasiões difíceis e pelo compartilhamento de tantas histórias de alegrias, dúvidas e receios.

À pequena notável Letícia Martins que teve participação efetiva na realização dos experimentos desta pesquisa. Agradeço por toda a ajuda, pelo companheirismo, por ouvir minhas divagações e pelas infindas tardes de conversas divertidas.

À amizade de Ananda Schoeter que persistiu muito além de um projeto de iniciação científica.

Ao companheiro derradeiro de laboratório, Luciano César, pela generosidade em colaborar nas partes burocráticas, mas principalmente pelos incentivos motivacionais diários.

À Renata de Brito Mari pelas conversas sempre regadas de muito incentivo nessa jornada de pós-graduação.

A todos os colegas, integrantes ou “agregados” do LAFACC, em especial a: Thelma Parada, Karina do Valle, Eduardo Beber, Catarina Tivane, Maria Brito, Gisele Martins e Marcos Vinícius da Silva.

Aos funcionários do ICB que se tornaram amigos:

Ao Sebastião Boleta, o “MacGyver” do LAFACC. Pelos inúmeros “testes” que elaborou para o processamento do meu material, por sempre ver um caminho para que tudo desse certo, pelos cafés preparados com satisfação, pelas

conversas engraçadas sobre a vida e por realmente fazer valer a frase de sua própria autoria: “quando a gente fica bom na técnica a pesquisa acaba!”.

À querida Marta Maria Righetti, pela competência que faz tudo ficar mais fácil, pelo bom humor constante, pela presteza com que realiza o seu trabalho e nos auxilia. Pela motivação que nos faz acreditar que tem coisas mais importantes na vida do que “esticar cortes!”.

À Sonia Almeida, pela ajuda essencial e processamento do material da MET, mas principalmente por sua doçura, carinho e acolhimento de sempre.

À Kelly Patrícia Borges pela disposição em colaborar com esse trabalho a qualquer momento e principalmente pelos momentos de descontração e ótimas conversas.

Às pessoas que contribuíram para a minha formação acadêmica:

À Prof. Dr. Flávia de Oliveira que me mostrou o melhor caminho a seguir na elaboração dessa Tese, não apenas pelas generosas palavras no exame de qualificação ou por ter me fornecido parte dos animais desta pesquisa, mas sobretudo porque mesmo de longe continua nos influenciando com seu trabalho dentro da pesquisa. Porque foi a monitora mais concorrida nas aulas práticas da Anatomia durante a minha graduação, transmitindo desde sempre uma grande vontade de ensinar e colaborar.

Ao Prof. Dr. Matsuyoshi Mori pelos grandes ensinamentos durante a graduação, pela contribuição no exame de qualificação e pela prontidão em ajudar.

Ao Prof. Dr. Renato Paulo Choppard (*In memoriam*) pela grande disponibilidade em compartilhar seu conhecimento.

Aos que contribuíram de alguma forma, com a elaboração da Tese:

Ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, especialmente às funcionárias: Jaqueline Martins, Daura Vaz e Rose Eli Grassi.

À Mariz Vainzof e Poliana Martins pelo fornecimento de parte dos camundongos utilizados no trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os animais incluídos nessa pesquisa.

“A consciência da complexidade faz-nos compreender que não poderemos nunca escapar à incerteza e que não poderemos nunca ter um saber total. ‘A totalidade é a não verdade.’”

Edgar Morin

“Estudar exige disciplina. Estudar não é fácil, porque estudar pressupõe criar, recriar e não apenas repetir o que os outros dizem. Estudar é um dever revolucionário.”

Paulo Freire

“Rust never sleeps.”

Neil Young

RESUMO

GONÇALVES, A. **Repercussões morfológicas da distrofia muscular sobre a cartilagem do processo condilar da mandíbula de modelos murinos.** [Morphological effects of muscular dystrophy in mandibular condylar cartilage of the murine models]. 2017. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As distrofias musculares – doenças genéticas ou congênitas de caráter irreversível e progressivo – são caracterizadas por degenerações da musculatura esquelética capazes de induzir anomalias ósseas como resultado da perda de função do músculo. Osteopenia, fraturas por fragilidade, escoliose, além de danos nos processos de crescimento e remodelação que levam a diferenças de forma e de tamanho são modificações ósseas decorrentes desse conjunto de doenças musculares. Os músculos da cabeça e pescoço são também afetados em vários tipos de distrofias, alterando a morfologia craniofacial e a oclusão dentária. Por sua vez, a cartilagem do processo condilar da mandíbula (PC), uma das estruturas responsáveis pelo crescimento facial, por estar sob a influência direta de fatores intrínsecos (genéticos, epigenéticos) e extrínsecos (estimulação mecânica, tipo de alimentação etc), pode ter a sua morfologia prejudicada já que os músculos faciais e da mastigação são, frequentemente, afetados nos distúrbios degenerativos neuromusculares. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as repercussões morfológicas das distrofias musculares na cartilagem do PC de dois modelos murinos distintos de distrofia (*dmd^{mdx}* e *large^{myd}*) e de seus respectivos controles: os camundongos C57BL/10. Os grupos animais (n=5) foram organizados de acordo com as idades (04 e 10 semanas), constituindo: C4, M4, L4, C10, M10 e L10 (camundongos controle, *dmd^{mdx}* e *large^{myd}* de 04 e de 10 semanas, respectivamente). Após a eutanásia, os espécimes foram processados através de técnicas histológicas rotineiras e, posteriormente, submetidos às colorações de HE, Picrossírius e Safranina-O, para a evidência dos componentes celular e colágeno e imuno-histoquímica para a marcação de células reativas ao IGF-1 e IGF-1R. Os aspectos ultraestruturais também foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram que a cartilagem apresentou-se debilitada sob os efeitos da distrofia muscular, acarretando em modificações no padrão morfológico geral do tecido,

na secreção das fibrilas colágenas e no acúmulo de proteoglicanas na MEC, as quais variaram de acordo com a idade e tipo de distrofia. Qualitativamente, a maior expressão de IGF-I e de seu receptor (IGF-IR) foi encontrada nos animais do grupo controle (C4 e C10), sendo observadas alterações do padrão de expressão dos mesmos no tecido cartilágneo dos animais distróficos (*dmd^{mdx}* e *large^{myd}*). Tais resultados sugerem prejuízos na maturação da cartilagem e formação óssea precoce e deficiente.

Palavras-chave: Crescimento facial. Degenerações neuromusculares. Morfometria. *large^{myd}*. *dmd^{mdx}*.

ABSTRACT

GONÇALVES, A. **Morphological effects of muscular dystrophy in mandibular condylar cartilage of the murine models.** [Repercussões morfológicas da distrofia muscular sobre a cartilagem do processo condilar da mandíbula de modelos murinos].2017. 80f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Muscular dystrophies are irreversible progressive diseases, genetic or congenital, characterized by degeneration of the skeletal muscles which can induce bone abnormalities as result of muscle function loss. Osteopeny, fragility fractures and scoliosis are bone modifications belonging to that set of muscular diseases. In addition, damages in the processes of growth and remodeling lead to skeletal differences in shape and size. Head and neck muscles are also affected in various types of dystrophies and may cause changes in both craniofacial morphology and dental occlusion. In turn, mandibular condylar cartilage (MCC) is one of the structures responsible for facial growth that is directly influenced by intrinsic (genetic, epigenetic) and extrinsic factors (mechanical stimulation, type of feeding, etc.). The morphology of MCC can be impaired since the facial and chewing muscles are often affected in the neuromuscular degenerative disorders. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of the muscular dystrophies on the growth of the MCC of murine models (*dmd^{mdx}* and *large^{myd}*) and their respective controls the C57BL/10 mice. For that purpose, animal groups were formed (n = 5) divided according to their ages (04 and 10 weeks), into the following experimental groups: C4, M4, L4, C10, M10 and L10 (control mice, *dmd^{mdx}* and *large^{myd}* of 04 and 10 weeks, respectively). After euthanasia, the specimens were processed through routine histological techniques, and then subjected to HE, Sirius red and Safranin-O staining for the disclosure of cellular components and collagen and immunohistochemistry for marking cells responsive to IGF-I and IGF-IR. The ultrastructural aspects were also analyzed by transmission electron microscopy. The results showed that the cartilage turned out to be impaired in the context of muscular dystrophy, leading to changes in general morphological pattern of the tissue, in the secretion of

collagen fibrils and in proteoglycans accumulation on ECM. These findings varied to according age and type of dystrophy. Qualitatively, the major expression of IGF-I and its receptor (IGF-IR) occurred in the animals of the control group (C4 and C10), showing alterations of their expression pattern in cartilage of the dystrophic animals (*dmd^{mdx}* and *large^{myd}*). These results suggest early cartilage maturation and poor bone formation.

Keywords: Facial Growth. Neuromuscular degenerations. Morfometry. *large^{myd}*. *dmd^{mdx}*.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -DG	Alpha-distroglicana
a	Camada articular
ATM	Articulação temporomandibular
ATP	Adenosina trifosfato
BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas
c	Camada condroblástica
C4	Grupo controle de 04 semanas
C10	Grupo controle de 10 semanas
CDM	Distrofia Muscular Congênita
CMD-1D	Distrofia Muscular Congênita- Forma 1D
CO ₂	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidine terahydrochloride
DGC	Complexo de proteínas associadas à glicoproteína distrofina
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DP	Desvio padrão
ECM	Músculo esternocleidomastóideo
EDTA	Solução desmineralizadora etileno-diamino-tetra-acetatodissódico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GH	Hormônio de crescimento
h	Camada hipertrófica
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilia-eosina
I	Período inicial de avaliação dos animais nas gaiolas metabólicas
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IGFBP	Proteína de ligação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina-I
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina- II
IGF-IR	Receptor de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina- I
Kb	Kilobase
L4	Grupo formado por animais <i>large^{myd}</i> de 04 semanas
L10	Grupo formado por animais <i>large^{myd}</i> de 10 semanas
MAP	Mitogen Activated Protein
M4	Grupo formado por animais <i>dmd^{mdx}</i> de 04 semanas
M10	Grupo formado por animais <i>dmd^{mdx}</i> de 10 semanas
ML	Microscopia de luz
p	Camada pré-condroblástica
Pb	Pares de bases nitrogenadas
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Processo condilar da mandíbula
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pt	Sistema teste
Pp	Número de pontos
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Sox 9	Sry-related HMG box 9
t	Espessura total
VGEF	Fator de crescimento do endotélio vascular
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 A CARTILAGEM DO PROCESSO CONDILAR DA MANDÍBULA E O CRESCIMENTO FACIAL.....	23
2.2 DOENÇAS NEUROMUSCULARES: PATOGÊNESE E REPERCUSSÕES OROFACIAIS.....	25
2.3 MODELOS MURINOS PARA O ESTUDO DE DOENÇAS NEUROMUSCULARES.....	27
2.4 CORRELAÇÕES ENTRE O SISTEMA IGF, A CARTILAGEM DO PC E AS DISTROFIAS MUSCULARES.....	30
3 OBJETIVOS.....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	35
4.2 GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS <i>LARGE^{myd}</i>	36
4.3 COLETA E OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES.....	36
4.4 MICROSCOPIA DE LUZ.....	36
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	37
4.6 ESTUDO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA IGF-1 E IGF-1R.....	38
4.7 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA	39
4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Aspectos Qualitativos	43
5.1.1 Morfologia geral da cartilagem.....	43
5.1.2 Tipificação das fibras colágenas.....	45
5.1.3 Matriz extracelular (MEC).....	47
5.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	49

5.1.5 Expressões do IGF-1 e do IGF-1R.....	52
5.2 Aspectos Quantitativos.....	54
5.2.1 Espessura das camadas.....	54
5.2.2 Densidade e área dos condrócitos.....	57
6 DISCUSSÃO.....	60
6.1 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA.....	60
6.2 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	63
6.3 EXPRESSÕES DO IGF-1 E DO IGF-1R NA CARTILAGEM.....	64
7 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas clínicas e experimentais mostraram a associação entre a condição funcional dos músculos da cabeça e do pescoço e o crescimento craniofacial, especialmente devido à biomecânica da articulação temporomandibular (ATM) e às propriedades de remodelamento próprias do tecido ósseo (KILIARIDIS, 1995).

Considerada o maior sítio de crescimento craniofacial, a cartilagem do processo condilar (PC) da mandíbula é parte integrante da ATM, além de atuar em um complexo sistema adaptativo relacionado à morfogênese do esqueleto facial (OWTAD et al., 2013). Embora não exista um centro de ossificação secundário como nos principais centros de crescimento cartilagíneos dos membros, a proliferação de células nas camadas superficiais, combinadas com a formação óssea endocondral na interface da cartilagem com o osso subcondral, produz o tecido ósseo que determina a estrutura dimensional da mandíbula (JING et al., 2015). Tais características – o fato de ser uma cartilagem secundária e a capacidade de adaptação – são responsáveis pela grande influência que os fatores mecânicos exercem sobre ela quando comparada com outros tipos de cartilagem, frente à alta demanda funcional proporcionada pelos movimentos mastigatórios (ENOMOTO et al., 2014).

No entanto, a presença de distúrbios neuromusculares sobre o sistema estomatognático é capaz de alterar os movimentos mandibulares, devido a diminuição do tônus muscular causado por essas doenças genéticas que provocam degeneração progressiva (VAN BRUGGEN et al., 2015). Como apontam os estudos de Botteron et al. (2008) e Van den Engel-Hoek et al. (2013), através de mensurações realizadas em ultrassonografias, os músculos masseter (potente elevador e protusor da mandíbula) e os suprahióideos (atuantes na estabilização mandibular), são potencialmente debilitados por ocasião dessas doenças, como a distrofia muscular.

Ao alterarem a morfofisiologia facial, modificações nas estruturas orais também são esperadas em decorrência das distrofias. Assim, o desequilíbrio entre músculos e o crescimento e desenvolvimento dos ossos, leva a vários distúrbios dentoalveolares (ANJUM, JAWAD, NASEEM, 2017).

De fato, danos às estruturas orais ocorrem, já que se sabe que a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) leva a uma alta prevalência de mordidas abertas anteriores e laterais sem

alteração esquelética vertical, devido ao enfraquecimento dos masseteres que ocorre em um estágio anterior ao dos músculos labiais. Assim, ocorre um desequilíbrio entre forças anteriores e laterais, as quais combinadas com o aumento do volume lingual causam diâmetro transversal aumentado e inclinação bucal dos dentes. Já na distrofia miotônica, uma alta prevalência de má oclusão é encontrada, incluindo mordidas cruzadas anteriores e laterais, associadas a aberrações esqueléticas verticais, devido ao envolvimento dos músculos da mastigação em maior grau, mas com pouco envolvimento dos supra-hióideos, o que acarreta o abaixamento da mandíbula e da língua sem o contrabalanceio das forças desenvolvidas pela contração muscular (MOREL-VERDEBOUT, BOTTERON, KILIARIDIS, 2007).

As modificações no microambiente articular por reposicionamento mandibular levam à liberação de fatores regulatórios que, por sua vez, influenciam o crescimento dos côndilos através da condrogênese, seguida por ossificação endocondral no PC (RABIE, XIONG, HÄGG, 2004) e também por ossificação intramembranosa na fossa mandibular (SHEN, DARENDELILER et al., 2006). Dentre a variedade de biomoléculas envolvidas nesse processo, destacam-se a Sox 9 (HAJJAR et al., 2003), os VEGFs e as BMPs (BARNOUTI et al., 2011). Entretanto, o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) é o responsável pela maior potência condrogênica (OHLSSON et al., 1998).

A investigação sobre o crescimento e desenvolvimento craniofaciais utiliza diferentes espécies animais como modelos, sendo os estudos em camundongos muito eficazes, por combinarem o poder da genética com a facilidade de manuseio (TURNER et al, 2001). Contudo, o enfoque dessas pesquisas é predominantemente morfológico, pois sua análise e apreciação detalhadas são essenciais para a compreensão do mecanismo de malformações craniofaciais (BOLDRINI, 1998). É nesse ponto que se insere o conceito de "morfologia molecular", ou seja, a combinação da morfologia clássica com a biologia molecular: a primeira, fornecendo a base para a compreensão das mudanças evolutivas na estrutura e formação da cabeça, e a outra, ajudando a esclarecer os princípios de desenvolvimento e o mecanismo das malformações craniofaciais (CHAI, MAXSON Jr, 2006).

Pelo até aqui exposto, considerando-se que a degeneração muscular interfere nas propriedades morfofuncionais da ATM e no crescimento gnático, sendo por meio da fraqueza muscular ou por alterações bioquímicas do metabolismo ósseo ou ambas, avaliou-se na presente pesquisa as repercussões morfológicas da distrofia muscular na cartilagem do PC da mandíbula de camundongos nas formas branda (*dmd^{mdx}*) e severa (*large^{myd}*). A opção por

estudar comparativamente esses dois modelos justifica-se tanto pela intenção descritiva - com o intuito de caracterizar a estrutura da cartilagem do PC da mandíbula frente a diferentes quadros clínicos de distrofia, mas, sobretudo, pelas possíveis correlações entre malformações e danos às estruturas dos terços inferior e médio da face, o que em última análise, representa o fornecimento de bases anatômicas para o conhecimento dos efeitos da doença na implantação de terapêuticas futuras.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A partir de um levantamento bibliográfico detalhado, esta seção reúne os conceitos, definições e resultados de investigações prévias que fundamentam e norteiam a hipótese da presente pesquisa.

2.1 A CARTILAGEM DO PC DA MANDÍBULA E A MORFOLOGIA FACIAL

Alterações na morfologia da articulação temporomandibular (ATM) podem ser causadas por distúrbios intrínsecos sistêmicos (genéticos e hormonais) e extrínsecos (mecânicos, nutricionais e físicos) que afetam um dos principais centros do crescimento facial: a cartilagem do processo condilar (PC) da mandíbula. Desequilíbrios neste tecido podem influir na formação da mandíbula e reduzir o seu potencial de crescimento (ERTUK, DOGAN, 1991). Destes ainda podem ocorrer efeitos secundários diversos, que incluem: desestabilização dos arcos dentários e da oclusão, ausência de estímulo funcional sobre o periodonto, ocorrência de mordida aberta anterior, menor movimentação distal dos dentes molares, diminuição da altura do processo alveolar e até mesmo alteração do comprimento facial e/ou assimetrias faciais irreversíveis (COPRAY et al., 1988).

A cartilagem do PC da mandíbula é única em comparação com outras cartilagens do corpo. É composta por fibrocartilagem ao invés de essencialmente pela cartilagem hialina ou elástica; sofre o processo de ossificação endocondral e é derivada do pericôndrio (MISTAKIDIS, CHOLOPOULOS, DIMITRAKOPOULOS, 2010). Além disso, ela apresenta distinções quanto alguns aspectos biológicos: origem embriológica, desenvolvimento ontogenético, modo de crescimento pós-natal e estruturas histológicas (SHEN, DARENDELILER, 2005).

A fibrocartilagem – combinação de tecido conjuntivo denso regular e cartilagem hialina – é formada por condrócitos e uma pequena quantidade de material amorfo da matriz circunvizinha. No interior das áreas fibrosas há núcleos achatados ou alongados que correspondem a fibroblastos. Essas células sintetizam uma ampla variedade de moléculas da matriz extracelular (MEC), tais como as fibras colágenas do tipo I e II (características da fibrocartilagem e da cartilagem hialina, respectivamente), permitindo que o tecido responda às solicitações do ambiente externo (ROSS; PAWLINA, 2012).

Controlado por um sistema multifatorial, o crescimento da cartilagem do PC ocorre por aposição, incorporação de células condrogênicas à sua superfície, aumento do interstício, além de intensa atividade mitótica dos condrócitos. Essas células distribuem-se aleatoriamente na cartilagem, conferindo ao côndilo a possibilidade de modificar a sua forma e adaptar-se de acordo com as solicitações funcionais. Durante o processo de envelhecimento a cartilagem vai gradualmente diminuindo a sua espessura e atividade celular (SIMÕES, 2003). Entretanto, mantém em sua superfície uma camada de células mesenquimais indiferenciadas durante a fase adulta. A partir destas, estímulos biomecânicos podem acarretar respostas bioquímicas, através de mudanças da atividade metabólica e da expressão gênica que precedem as alterações na atividade proliferativa, modificando assim a sua morfologia original (FUENTES et al., 2003).

Destacando os fatores extrínsecos sobre o crescimento da cartilagem do PC, a saber, as que atuam por meio das diversas funções motoras orais das quais a mandíbula participa efetivamente – respiração, sucção, mastigação, deglutição, produção do som e equilíbrio postural –, sabe-se que todas integram o sistema funcional neuromuscular e desempenham um controle natural do crescimento. Dessa forma, ainda que os sistemas orgânicos desenvolvam-se em conformidade com um plano genético fixo, quando a morfologia e posição são geneticamente predestinadas, o crescimento e a manutenção estrutural também são primariamente dependentes do estado funcional dos tecidos moles a ele relacionados (MOSS, 1997). Nesse sentido, destaca-se a ação dos músculos da mastigação (masseter, temporal, pterigóideo medial e pterigóideo lateral), bem como dos músculos acessórios (supra-hióideos, cervicais profundos posteriores e esternocleidomastóideo), que ao promoverem a estabilização e biomecânica da ATM, contribuem para a manutenção e condução do crescimento, determinando também em última análise, a capacidade adaptativa do côndilo mandibular (LV et al., 2012).

Inúmeras pesquisas foram realizadas para avaliar o papel que a função e a posição da mandíbula, em particular, podem desempenhar na influência do crescimento pós-natal do côndilo. Petrovic et al. (1972), encontraram aumento significativo do comprimento total da mandíbula devido à anteriorização postural. Da mesma forma, Carlson et al. (1980) observaram que a cartilagem condilar tornou-se mais espessa e hiperplásica em 02 semanas após a colocação de um aparelho que levava á protusão no fechamento das mandíbulas de macacos. Tais estudos demonstraram a ocorrência da adaptação do côndilo devido às propriedades específicas da cartilagem do PC, sobretudo, a sua capacidade de remodelamento, mas muito também á sua alta

sensibilidade ao crescimento de regiões adjacentes, particularmente da maxila (GRABER et al., 2012).

A correlação entre o potencial adaptativo da cartilagem do PC da mandíbula e as características específicas do seu tipo de crescimento ósseo, o endocondral, explicam como as exigências funcionais contínuas, sejam elas fisio ou patológicas, permitem que alterações tróficas ocorram (VENTURIN et al, 2010) e que, a partir destas, estabeleça-se uma interdependência entre os fatores intrínsecos e extrínsecos, onde as funções básicas do sistema estomatognático, podem influenciar na anátomo-fisiologia cartilagínea ou vice e versa, ora beneficiando o seu crescimento ora rompendo com o seu equilíbrio estrutural (SALOMÃO et al., 2001). Essa reciprocidade, porém, é ambígua, pois se de um lado, a estimulação extrínseca demonstra ser capaz de causar efeitos nocivos (anormalidades esqueléticas, por exemplo), de outro também proporciona os terapêuticos e desejáveis (como as correções ortopédicas).

2.2 DOENÇAS NEUROMUSCULARES: PATOGÊNESE E REPERCUSSÕES OROFACIAIS

Dentre os diversos fatores que afetam o crescimento mandibular, a ocorrência das chamadas distrofias musculares (DM), são reconhecidamente causas intrínsecas de alterações no complexo craniofacial.

Sob a denominação genérica de doenças neuromusculares, agrupam-se diferentes afecções decorrentes do acometimento primário da unidade motora, composta pelo motoneurônio medular, raiz nervosa, nervo periférico, junção mioneural e o próprio músculo (REED, 2002). Tais distúrbios compõem um conjunto de patologias congênitas, caracterizadas por fraqueza muscular, atrofia e alterações destrutivas do tecido muscular (VAINZOF; ZATZ, 2003).

Existem mais de 30 tipos reconhecidos geneticamente de desordens neuromusculares. A partir do mapeamento genético, determinou-se que estas podem ser de herança autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao cromossomo X (ZATZ, 2001).

As deficiências em componentes do complexo de proteínas associadas à glicoproteína distrofina (DGC) são conhecidas por causar a distrofia muscular de

Duchenne (DMD), as sarcogliconopatias e algumas formas de distrofia muscular congênita (MARTINS et al., 2013), (Figura 1).

Sabe-se que a DMD afeta o crescimento craniofacial, alterando a oclusão dentária e a fase pré-oral da deglutição. A força máxima de mordida e a distância máxima de abertura de boca de pacientes portadores de DMD são significativamente inferiores. Além disso, respiração bucal, macroglossia, deglutição atípica e má-oclusões são achados comuns nesses pacientes (BOTTERON et al., 2009).

Já as distrofias musculares congênitas (CDM) formam outro grupo heterogêneo de doenças musculares caracterizadas clinicamente por hipotonia neonatal, atraso no desenvolvimento motor, grau variável de contraturas articulares, e possível associação com anormalidades no sistema nervoso central e olhos. O quadro clínico tende a ficar estável, mas alguns pacientes apresentam uma evolução clínica lenta e progressiva. Também pode ocorrer comprometimento das funções respiratórias e da deglutição (DUBOWITZ, 1985), além de anomalias do desenvolvimento da face e maxilas e fraqueza muscular grave (BALASUBRAMANIAM, SOLLECITO, STOOPLER, 2008).

Mutações no gene humano LARGE foram descritos na distrofia muscular congênita tipo 1D (CDM1D), sendo este um dos cinco genes responsáveis pela codificação de enzimas de glicosilação da proteína α -dystroglicana (α -DG), membro essencial na formação e funcionamento do complexo DGC muscular (LONGMAN et al., 2003).

Figura 1- Complexo de proteínas associadas á distrofina (DGC)

Fonte: (KHURANA, DAVIES, 2003).

Legenda: Esquema de organização do complexo de proteínas associadas á distrofina (DGC), mostrando a sua ligação com os filamentos de actina pela parte extracelular.

2.3 MODELOS MURINOS PARA O ESTUDO DE DOENÇAS NEUROMUSCULARES

Estudos clínicos e neurológicos em animais portadores de fraqueza muscular têm contribuído na identificação de alguns modelos animais para o estudo das doenças neuromusculares. Assim, a utilização de camundongos, cães e gatos deficientes tornou possível a investigação de diferentes proteínas presentes nos músculos. Contudo, os modelos murinos, principalmente por possibilitarem certa facilidade na manipulação de seu genoma, são animais bastante utilizados em pesquisas moleculares e na avaliação de complexos proteicos musculares. Dessa forma, e fornecendo bases para compreensão

das mesmas patologias em humanos, eles tornaram-se essenciais em testes de novos protocolos de terapias experimentais de doenças genéticas (VAINZOF et al., 2008).

Modelos murinos para diversos tipos de doenças podem ocorrer naturalmente ou serem criados por bioengenharia. Atualmente, são conhecidos diferentes modelos animais para as distrofias musculares incluindo o modelo natural, *dmd^{mdx}*, para distrofia muscular de Duchenne com ausência da proteína distrofina (ALLAMAND et al., 2000) e o mutante *large^{myd}*, que apresenta uma deleção no gene LARGE, resultando em alterações no processo de glicosilação da proteína α -DG (BROWNING et al., 2005).

O camundongo *dmd^{mdx}*, apresenta uma mutação de ponto no éxon 23 do gene da distrofina, que forma um códon de parada prematuro (BULFIELD et al., 1984) e que resulta na ausência total da proteína no músculo, ocasionando degeneração e necrose. Entretanto, esses animais exibem um curso clínico brando da doença, a fraqueza muscular não é característica e o tempo de vida também não é reduzido. Apesar de, inicialmente, as células satélites se replicarem para repor e regenerar a injúria, as mesmas tornam-se gradualmente escassas com a idade e o camundongo passa a demonstrar deterioração muscular (PASTORET et al., 1995). Esse camundongo também apresenta certa proporção de fibras revertentes, da ordem de 2 a 3%, que são fibras que passam a expressar novamente a distrofina de forma espontânea.

Por sua vez, o camundongo *large^{myd}* possui uma mutação identificada em 1963 no Jackson Laboratory, EUA. Tal mutação é uma deleção dos éxons 4, 5 e 6 no gene da *Glycosyltransferase-like Large1 (Acetylglucosaminyltransferase-like 1A)* abrangendo cerca de 100 kb. O gene LARGE possui esse nome devido a seu tamanho, que é de 660 kb em humanos, embora o RNAm possua apenas 4,4 kb. O gene no camundongo possui tamanho similar. A deleção no gene LARGE gera um fenótipo miopático no qual o camundongo apresenta marcha anormal, tem tamanho reduzido e postura anormal da cintura posterior. O comprometimento se estende ao coração, sistema nervoso e sistema reprodutivo. Essas características já podem ser observadas no animal com 12 a 15 dias de vida (GREWAL et al., 2005).

Nesses animais, os defeitos de glicosilação nas células musculares provocam uma instabilidade de todas as proteínas de membrana levando a um quadro clínico distrófico. O camundongo homozigoto afetado apresenta fraqueza muscular significativa. Acredita-se que a enzima produzida por esse gene atue na via de glicosilação, porque quando ela é suprimida, a proteína α -DG apresenta massa diminuída (GREWAL et al., 2005).

Alguns sinais clínicos podem ser observados nos animais *large^{myd}*. Ao nascimento, os animais heterozigotos afetados diferem dos não afetados por apresentarem menor massa corporal e menor tamanho, comparativamente. Durante o desenvolvimento, esses animais apresentam enrijecimento dos membros pélvicos, com atrofia e hipertrofia muscular seletiva, desvio do eixo de membros, fraqueza muscular, contraturas e prejuízo da marcha. Ao teste de levantamento pela cauda, observa-se flexão dos membros pélvicos junto aos torácicos (Figura 2).

Figura 2 - Fenótipo de animais *large^{myd}*.

Fonte: (GONÇALVES, 2017).

Legenda: Sinal clínico característico da presença de distrofia muscular, especificamente pela retração total dos membros pélvicos quando estimulados pelo estiramento da cauda.

Os camundongos utilizados como modelos para o estudo das distrofias têm um intervalo de início da doença variando com a idade, o que pode ser atribuído a presença de defeitos do sistema nervoso central, que podem exacerbar o fenótipo geral ou torná-lo mais pronunciado, fazendo com que os sintomas sejam mais evidentes em idade

precoce. Atribui-se 10 dias para os camundongos *dmd^{mdx}* (TORRES; DUCHEN, 1987) e 02 semanas para os modelos *large^{myd}* (WHITMORE; MORGAN, 2014).

A utilização destes modelos experimentais tem sido fundamental para o avanço no entendimento da patogênese das degenerações neuromusculares, assim como também têm contribuindo na elaboração de protocolos terapêuticos envolvendo células-tronco. Apesar disso, poucos estudos foram desenvolvidos com o intuito de se conhecer a morfologia dos diversos órgãos e tecidos desses animais.

2.4 CORRELAÇÕES ENTRE O SISTEMA IGF, A CARTILAGEM DO PC E AS DISTROFIAS MUSCULARES

Como já exposto anteriormente, a cartilagem do PC da mandíbula exibe uma grande capacidade de se adaptar as demandas funcionais, como a do próprio crescimento e também a remodelação. Os meios pelos quais essas adaptações ocorrem são atribuídos a uma pequena população de células mesenquimais indiferenciadas que envolvem esse tecido. Tais células respondem aos hormônios e mediadores locais, como fatores de crescimento e citocinas (WANG, LAZEBNIK, DETAMORE, 2009).

Um grande avanço ocorreu no conhecimento da biologia molecular e dos mecanismos celulares relacionados ao crescimento da cartilagem do PC. Sabe-se atualmente, que alguns fatores de crescimento estão presentes na MEC e que os mesmos variam com relação a sua localização específica no tecido. Assim, foram apontados como elementos fundamentais para o desenvolvimento do côndilo mandibular: o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator endotelial de crescimento (VEGF), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), dentre outros (SERRANO et al., 2011).

Dentre esses fatores, sabe-se que os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I, IGF-II e as proteínas ligantes IGFBPS) são uma família de polipeptídeos envolvidos no controle do crescimento, na morfogênese, no controle do metabolismo e na manutenção das funções de proliferação e diferenciação celular dos tecidos orais (WERNER; KATZ, 2004). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os IGFs são importantes agentes mitogênicos e osteogênicos, por estimularem a cartilagem epifisial, a ossificação endocondral e a formação de osteoblastos. Entretanto, alterações

no receptor de IGF-I estão associadas com graves atrasos de crescimento e de desenvolvimento ósseos (DELATTE et al., 2004).

Estudos imuno-histoquímicos confirmaram que o IGF-I e o IGF-II são expressos em diferentes camadas da cartilagem do PC de ratos jovens e idosos, demonstrando a produção autócrina desses compostos nesse tecido. Assim, Maor et al. (1993), observou imunomarcações de IGF-IR na camada pré-condroblástica, enquanto Fuentes et al. (2002) demonstrou a presença de IGF-I na camada condroblástica – com menor imunoexpressão na hipertrófica – do PC.

Dada a íntima relação funcional entre músculo e osso ao longo do desenvolvimento, crescimento e envelhecimento, a investigação de marcadores responsáveis por estímulos anabolizantes ósseos é necessária quando se considera o grande número de doenças músculoesqueléticas que geram impactos significativos sobre ambos tecidos. Sendo os efeitos das ações dos IGFs um dos mecanismos mais evidentes de serem partilhados entre osso e músculo (BONEWALD et al., 2013). Desta forma, analisá-los em modelos animais portadores de distrofia é um meio potencial para compreender a fisiopatologia desse grupo de doenças.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Utilizando a cartilagem do PC da mandíbula de dois modelos murinos de distrofia muscular (*dmd^{mdx}* e *large^{myd}*) com 04 e 10 semanas, avaliou-se através de técnicas de microscopia de luz, imunohistoquímica e de microscopia eletrônica de transmissão:

1) Qualitativamente:

- o padrão morfológico geral da cartilagem;
- os componentes estruturais de colágeno (fibras do tipo I, II e III);
- as proteoglicanas da matriz extracelular;
- a ultraestrutura dos condrócitos e da matriz extracelular (MEC);
- a imunorreatividade dos condrócitos ao IGF-1 e IGF-1R;

2) Quantitativamente:

- a espessura das camadas constituintes da cartilagem;
- a densidade e a área dos condrócitos da camada condroblástica (c);

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção compreende a descrição detalhada, em ordem cronológica, da metodologia aplicada na presente pesquisa.

4.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 30 camundongos (*Mus musculus*) machos, com massa corporal entre 15 e 25 gramas, das linhagens: C57BL/10, *dmd^{mdx}* e mutantes *large^{myd}* provenientes, respectivamente, do Biotério da UNIFESP (Campos Baixada Santista) e do Biotério do Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CPGH-IB/USP). Os animais estão inseridos em um projeto amplo e são utilizados por outros pesquisadores em trabalhos envolvendo outros órgãos/tecidos. A presente pesquisa foi aprovada pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob o número de protocolo 5900290517/2017.

Para as linhagens utilizadas, foram formados dois grupos, de cinco animais cada, distribuídos de acordo com a idade, como exposto a seguir:

C4 – camundongos C57BL/10 (controle) de 04 semanas.

M4 – camundongos mutantes (*dmd^{mdx}*) de 04 semanas.

L4 – camundongos mutantes (*large^{myd}*) de 04 semanas.

C10 – camundongos C57BL/10 (controle) de 10 semanas.

M10 – camundongos mutantes (*dmd^{mdx}*) de 10 semanas.

L10 – camundongos mutantes (*large^{myd}*) de 10 semanas.

Todos os animais foram mantidos até os dias da eutanásia, em gaiolas de polipropileno com grade metálica, sem restrições de ração e água.

4.2 GENOTIPAGEM DOS CAMUNDONGOS MUTANTES *large^{myd}*

Para a identificação dos camundongos *large^{myd}*, foram realizados testes de genotipagem no CPGH-IB/USP, considerando-se a presença da mutação no gene LARGE por meio de reações de PCR a partir do DNA genômico. De maneira resumida, após identificação dos animais por marcações nas orelhas, retirou-se o sangue da cauda para posterior extração do DNA, através da incubação com solução de extração e proteinase K. Em seguida, realizou-se a amplificação por PCR multiplex, utilizando oligonucleotídeos (GT4F e GT4R) que flanqueiam e amplificam os alelos mutado e normal e identificam um produto de 162pb deletado nos camundongos *large^{myd}*. Em contrapartida, os primers MydF3 e MydR2 amplificam um produto de 421pb somente no alelo *large^{myd}* (GREWALL et al., 2005).

4.3 COLETA E OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES

Após o período experimental, os grupos foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico Xilasina (40mg/Kg) e Ketamina (120mg/Kg), e tiveram os PCs retirados para processamento de acordo com as técnicas descritas a seguir.

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ

Para avaliação sob microscopia de luz, os espécimes foram fixados em formol tamponado a 10% por um período de 48 horas, e descalcificados em solução desmineralizadora de 7% de EDTA (etileno-diamino-tetra-acetatodissódico) em pH básico (7,0-7,4), numa quantidade equivalente a 20 vezes o seu volume, renovada a cada 48 horas e avaliada a cada período, com a utilização de solução de oxalato de amônia a 5%.

Após a descalcificação, os espécimes foram posicionados em uma superfície de cortiça e fixados por um meio de inclusão para tecidos biológicos (*Tissue freezing medium*®, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). A seguir, a fim de se adaptar à temperatura da câmara do aparelho (-25°C), os PCs foram mantidos no interior de um criostato 30 minutos antes de serem processados.

Em seguida, foram obtidos cortes sagitais semisseriados com cinco μm de espessura. Os cortes assim obtidos foram corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (HE) para a observação do aspecto geral do tecido, das suas camadas constituintes e também para as análises quantitativas. A tipificação das fibras colágenas foi realizada por meio da técnica do picrossírius, analisada sob luz polarizada (JUNQUEIRA et al., 1979) e a avaliação das proteoglicanas da MEC foi realizada através do método de Safranina-O (LUNA, 1968).

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os animais foram anestesiados com ketamina (50mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intraperitoneal e em seguida perfundidos com solução fixadora de *Karnovsky* modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2%) em solução tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4).

O PC foi coletado, microdissecado sob estereomicroscópio (mantendo-se somente a parte cartilágnea) e imersos em solução fixadora durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por 3 vezes com solução tampão fosfato de sódio 0,1M e pós fixadas com solução tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas a 4°C. Novamente, as amostras foram lavadas com tampão fosfato de sódio e contrastadas com solução de acetato de uranila (0,5%) overnight. Feita a desidratação em série crescente de álcoois (do 70° ao absoluto, por 20 minutos cada) e óxido de propileno (2 vezes por 20 minutos), as amostras permaneceram overnight em mistura de resina e óxido de propileno (1:1), sob agitação, em seguida, substituída por resina e óxido de propileno (3:1) (por 8 horas), depois colocada em resina pura overnight. A inclusão das amostras foi feita utilizando-se resina pura, mantida em estufa a 60°C por 3 dias.

Obtidos os blocos de resina, estes foram trimados para a realização de cortes semifinos (300 micrômetros) em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT, Germany) e corados pelo método de azul de toluidina (1%) para verificação da área em microscópio de luz. Posteriormente, selecionada a área de interesse, foram realizados cortes ultrafinos (60 nanômetros) em eultramicrotomo, coletados em tela de cobre de 200 “mesh” (Sigma-Aldrich, USA) e, contrastados com a solução de acetato de uranila (4%) por 3 minutos, lavados em água destilada e novamente contrastados com a solução aquosa de citrato de chumbo (0,4%),

por 3 minutos e lavados com água destilada. As telas foram examinadas através de microscópio eletrônico de transmissão FEI-Morgagni 268D, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP.

4.6 ESTUDO DA REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA IGF-1 e IGF-1R

Para a localização do IGF-1 e do IGF-1R (receptor), primeiramente, realizou-se o desmascaramento antigênico, utilizando-se pepsina a 4% em HCl 0,01N por 30 minutos, por se tratar de material previamente formolizado. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada com solução específica (peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol) por cinco minutos. A incubação foi realizada com soro de cabra na proporção 1:5 em PBS, por um período de 30 minutos, a temperatura ambiente. O IGF-1 e o IGF-1R foram evidenciados utilizando-se os anticorpos anti-IGF-1 e anti-IGF-1R (Santa Cruz Biotechnology-Santa Cruz, CA) na diluição 1:50, que por prévia titulação, foi considerada a mais adequada. Os cortes assim tratados foram incubados com o anticorpo primário, na diluição descrita anteriormente, por 24 horas, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavados em PBS (3×10 min), incubados em peroxidase conjugada a imunoglobulinas anti-coelho e anti-camundongo obtidos de soro de cabra por 30 minutos, incubados com Vectain ABC (Avidina e Biotina) por 30 minutos, lavados em PBS 10% (3×10 min), e incubados em solução cromogênica 3,3'-diamino-benzidina em tampão PBS 10% contendo peróxido de hidrogênio a 6% para a revelação dos cortes. Todas as reações foram acompanhadas por lâminas controle contendo diversos cortes, submetidos a todas as etapas do procedimento suprimindo-se, entretanto, a aplicação do anticorpo primário.

4.7 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

Este item contém a descrição detalhada dos métodos utilizados para a obtenção dos dados quantitativos da pesquisa.

4.7.1 Espessura das camadas, área e densidade de volume dos condrócitos

Para as avaliações quantitativas relativas à espessura das camadas da cartilagem e área dos condrócitos foram utilizados métodos morfométricos descritos por Mandarim-de-Lacerda (1995).

A determinação da **densidade de volume dos condrócitos** foi obtida através da *estereologia* submetendo-se os cortes à regra da **amostra progressiva** (MANDARIM-DE-LACERDA, 1991), a fim de se estabelecer o menor tamanho da amostra para esse parâmetro passível de ser avaliado com resultados estatisticamente significativos. O exemplo a seguir, aplicado ao **animal 1**, é válido para os demais (dois a cinco) de cada grupo (C4, M4, L4, C10, M10 e L10).

Como, com essa metodologia, seriam contados 125 campos por animal, ou seja, 625 campos para um grupo de cinco animais (um número extremamente excessivo) aplicou-se a seguinte fórmula, preconizada por Hally (1964):

$$EPR = \sqrt{\frac{(1-Vv)}{n}}$$

Desta forma, estabeleceu-se preliminarmente, em alguns campos, a densidade de volume dos condrócitos (Vv), de acordo com um sistema teste (P_T) contendo 100 pontos.

De acordo com esse sistema-teste, foi determinado no campo, o número de pontos (P_p) que incidiram sobre os condrócitos; no caso, uma média de 30 pontos, cerca de 30% dos pontos totais. Aplicando-se a seguinte formula:

$$V_v = \frac{P_p}{P_T}$$

$$P_T$$

e, aceitando o índice de significância de 0,05 ou seja, a probabilidade de 95%, obtém-se:

$$0,05 = \sqrt{\frac{1 - 0,30}{n}}$$

portanto,

$$(0,05)^2 = \left(\sqrt{\frac{0,70}{n}} \right)^2$$

$$0,0025 = \frac{0,70}{n} \text{ ou seja, } n = 280 \text{ pontos}$$

Esses seriam, a princípio, os pontos totais que deveriam ser contados para a determinação da densidade dos condrócitos; porém, como estes ocupam somente uma pequena porcentagem da amostra, calculou-se o **n corrigido** para o **V_v** do material a ser estudado. Assim, determinou-se o número total de pontos, da seguinte maneira:

$$n \text{ corrigido} = \frac{n \text{ calculado}}{V_v}$$

$$V_v$$

$$\text{assim, } n \text{ corrigido} = \frac{280}{0,30} = 933 \text{ pontos}$$

$$0,30$$

Posteriormente, calculou-se o número de campos utilizados para a determinação da densidade dos condrócitos, dividindo-se o número de pontos do **n corrigido** pelo **número de pontos totais** do sistema teste utilizado (50 pontos), que daria um total de **nove campos** (com 0,012 mm²). Então na presente pesquisa, foram utilizados 10 campos para cada animal de cada grupo de estudo (C4, M4, L4, C10, M10, L10). Dessa forma, utilizou-se um total de 60 cortes da cartilagem do PC (10 por animal). Em cada corte foi avaliado um campo, correspondente a parte central. Os campos foram fotografados e analisados através de um

sistema de análise de imagem computadorizada (câmera Axiocam acoplada a um microscópio binocular Carl Zeiss Axioscope 40 e software Axiovision).

Para a determinação do número de condrócitos da camada condroblástica, foi elaborado um sistema teste retangular com cinco cm de largura e dois cm de altura, formado por linhas de inclusão e de exclusão, alocado sobre as imagens da tela do computador, de modo sistemático e uniforme. Dessa forma, foram contados todos os condrócitos contidos nessa área, evidenciados pela coloração do HE (Figura 3).

Figura 3- Cartilagem do PC

Fonte: (GONÇALVES, 2017)

Legenda: Sistema teste com linhas de inclusão e exclusão limitando a área de contagem dos condrócitos.

Aumento 40X. HE

4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise estatística foi realizada através da análise de variância com dois fatores (idade e presença/tipo de distrofia) e quando necessário, aplicou-se comparações múltiplas pelo método de Tukey.

O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% (ZAR, 1984), ou seja, valores foram considerados como significativos quando a probabilidade e índice de significância forem menores que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos são descritos ordenadamente nos seguintes tópicos: aspectos qualitativos e aspectos quantitativos.

5.1 Aspectos Qualitativos

Neste item serão descritos em todos os grupos (C4, M4, L4, C10, M10 e L10), os resultados referentes às análises através das técnicas: microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e reações de imuno-histoquímica para IGF-1 e IGF-1R.

5.1.1 Morfologia geral da cartilagem do PC

Ao se avaliar o revestimento cartilágneo do PC, verificou-se as suas camadas constituintes básicas: articular (**a**), pré-condroblástica (**p**), condroblástica (**c**) e hipertrófica (**h**), que exibiram diferenças estruturais entre os grupos (Figura 4).

Figura 4- Cartilagem do PC

Fonte: (GONÇALVES, 2017)

Legenda: Fotomicrografia evidenciando as características estruturais da cartilagem do PC dos animais dos grupos: C4 e C10 (A e D), M4 e M10 (B e E) e L4 e L10 (C e F). HE. Barra de calibração: 50 μm.

O padrão morfológico geral da cartilagem do PC – constituição e espessura das camadas celulares – variou em função da idade e da presença/tipo de distrofia dos animais analisados. Assim, os animais do grupo controle de 04 semanas (C4) apresentaram camadas cartilagíneas regulares, ou seja, **a** delgada com núcleos irregulares, alongados e fortemente corados; **p** composta por núcleos fusiformes que aumentam de tamanho e tornam-se cada vez mais separados entre si; **c** exibindo alta celularidade, marcada pela presença de núcleos esféricos excêntricos, dispostos de forma aparentemente aleatória, e **h** caracterizada pela presença de núcleos picnóticos. Por sua vez, o grupo controle de 10 semanas (C10) exibiu uma cartilagem uniforme, diferindo quanto à aparente diminuição de núcleos corados em todas as camadas celulares, com consequente aumento do espaçamento entre eles.

Quanto à organização estrutural da cartilagem do PC dos animais *dmd^{mdx}*, observou-se que os de 04 semanas (M4) apresentaram uma tendência de achatamento de **a** e **p**, com **c** exibindo núcleos mais propensos ao empilhamento vertical. Já os estratos celulares da cartilagem do PC de M10 exibiram limites precisos entre si, além de alta densidade de núcleos intensamente corados.

A composição das camadas cartilagíneas do PC dos camundongos *large^{myd}* foi a que mais diferiu dos demais grupos em ambas as idades. O aspecto disforme e a imprecisão na delimitação de todas as camadas foram características marcantes tanto no período de 04 como no de 10 semanas. Também foi possível detectar núcleos distribuídos de forma esparsa, o que ocorreu de forma evidente em **c** de L4 e em **a** de L10. Comparativamente aos demais grupos, a cartilagem exibiu menor espessura, sendo ainda mais delgada em L4.

5.1.2 Tipificação das fibras colágenas

Com relação aos componentes fibrosos da cartilagem do PC analisados sob luz polarizada, a organização espacial dos feixes de fibras colágenas nas camadas **p** e **c** em todos os grupos foi semelhante a uma rede ou malha pantográfica, com feixes longitudinais interconectados com feixes transversais. Quanto à distribuição das fibras colágenas dos tipos I (vermelhas, laranjas e amarelas) e III (verdes) verificou-se seu predomínio nos animais C4 e C10 (Figura 5 – A, D). Nos grupos M4 e M10 houve um aparente equilíbrio entre fibras do tipo I e III (Figura 5 – B, E), enquanto que nos grupos L4 e L10, muito embora tenha sido

detectado um predomínio de fibras do tipo I na camada articular de L10, observou-se um aumento considerável das fibras colágenas do tipo III (Figura 5 – C, F).

Figura 5 – Picrossírius cartilagem do PC

Fonte: (GONÇALVES, 2017)

Legenda: Distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III nas camadas constituintes da cartilagem do PC dos animais dos grupos C4 (A), M4 (B), L4 (C), C10 (D), M10 (E) e L10 (F). Observar o aspecto de rede pantográfica formada pelos feixes de fibras colágenas. Picrossírius sob luz polarizada. Barra de calibração 20 μ m.

5.1.3 Matriz extracelular (MEC)

O padrão de intensidade dos cortes corados pela técnica da Safranina-O nos grupos C4, C10, M4, M10, L4 e L10, está demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Safranina-O da cartilagem do PC

Fonte: (GONÇALVES, 2017)

Legenda: Ortocromasia para Safranina-O. **A** (C4): coloração intensa em todas as camadas da cartilagem do PC. **B** (M4): coloração intermediária uniforme em todas as camadas cartilagueas. **C** (L4): perda elevada de intensidade em toda a extensão da cartilagem. **D** (C10): alta intensidade em toda a extensão da cartilagem. **E** (M10): alta intensidade de coloração nas camadas **a+p**, com perda gradual do conteúdo de proteoglicanas (baixa intensidade) na camada **c** e intermediária em **h**. **F** (L10): coloração intermediária de **a+p** e **c** e áreas de maior intensidade em **h**. Barra de calibração 20 µm.

Ao se avaliar o padrão de coloração da Safranina-O, ocorreu uma gradação de intensidade, isto é, a mesma variou de mais intensa em todas as camadas dos grupos C4 e C10 (figura 6-A, D) e nas camadas **a+p**, de M10 (Figura 6-E), até menos intensa em todas as camadas de L4 (Figura 6-C). Valores intermediários foram detectados em toda a extensão cartilágnea de M4 (Figura 6-B) e nas camadas superficial e média (**a+p** e **c**) de L10 (Figura 6-F).

5.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As características ultraestruturais da cartilagem do PC da mandíbula de todos os grupos foram analisadas, principalmente, quanto ao conteúdo proteico, comparando-se a matriz extracelular (MEC) da cartilagem, o retículo endoplasmático rugoso (RER) e o nucléolo dos condrócitos.

Assim, verificou-se que a MEC do grupo controle caracterizou-se por exibir uma alta densidade de fibrilas delgadas que, embora dispostas em diferentes direções, assumiram em alguns trechos um trajeto predominantemente longitudinal, característico de arranjo em malha pantográfica. Nos animais do grupo *dmd^{mdx}* verificou-se a presença de fibrilas espessas, de densidade reduzida, caracterizando uma rede pantográfica de malhas amplas, e com conteúdo granular eletrondenso. Por sua vez, a MEC do grupo *large^{myd}* caracterizou-se por exibir uma desorganização estrutural representada por fibrilas desordenadas, ora formando partes de uma malha pantográfica com fibrilas de diferentes espessuras, ora constituindo feixes de fibrilas delgadas de orientação perpendicular ao corte. Relativamente ao retículo endoplasmático, tanto o arranjo como a espessura das suas cisternas, e a densidade de ribossomos não permitiram estabelecer uma diferença significativa entre os grupos (Figura 7).

Figura 7 – Aspectos ultraestruturais da cartilagem do PC.

Fonte: (GONÇALVES, 2017)

Legenda: Eletronmicrografias da MEC e dos condrócitos da cartilagem do PC. Ao centro e acima a MEC (destacada em azul), e ao centro e abaixo, o citoplasma do condrócito (destacado em laranja). Os detalhes da organização das fibrilas colágenas da MEC estão à esquerda, e do retículo endoplasmático à direita. (Para maiores informações, veja o texto). (Aumento 7000x)

Ao se avaliar o núcleo dos condrócitos, notou-se que a sua membrana apresentava-se como uma linha circular contínua, regular e estável, tanto nos animais do grupo controle como nos do grupo *dmd^{mdx}*, diferentemente do contorno tortuoso de sugestivo de deformação dessa estrutura observado no grupo *large^{myd}*.

Ao se analisar a cromatina nuclear, verificou-se que no grupo controle há uma condensação da heterocromatina (material eletron denso) próxima à membrana nuclear. No restante da organela, tanto a hetero como a eucromatina exibem uma distribuição uniforme,

sendo que esta última exhibe aspecto granular. No grupo *dmd^{mdx}* ocorre, aparentemente, um predomínio da eucromatina, enquanto que nos animais do grupo *large^{myd}* a heterocromatina forma grumos bem dispersos, que determinam espaços amplos preenchidos por eucromatina de aspecto homogêneo.

Nos nucléolos, ocorre certa proporcionalidade na distribuição das zonas granular (eletrotrondensa) e fibrilar nos grupos controle e *dmd^{mdx}*. No grupo *large^{myd}* é nítido o predomínio da zona fibrilar (Figura 8).

Figura 8 – MET do núcleo dos condrócitos da cartilagem do PC.

Fonte: (GONÇALVES, 2017).

Legenda: [A-F] Eletromicrografia dos núcleos de condrócitos da cartilagem do PC. [A- C] detalhes do núcleo e da região da membrana nuclear de animais dos grupos controle (A), *dmd^{mdx}* (B) e *large^{myd}* (C). [D-F] – Ultraestrutura dos nucléolos nos grupos controle (D), *dmd^{mdx}* (E) e *large^{myd}* (F). (Para maiores informações, veja o texto). (Aumento 28000x)

5.1.5 Expressões do IGF-1 e IGF-1R

As figuras 09 e 10 ilustram as células da cartilagem do PC da mandíbula sensibilizadas pelo IGF-1 e pelo IGF-1R, nos grupos de 04 e 10 semanas, respectivamente. Desta forma, foi possível verificar os condrócitos imunorreativos que se destacaram dentre aqueles que não exibiram nenhuma reatividade, além dos padrões de marcação e de sua localização nas diferentes camadas de todos os grupos.

Figura 09 – Imunomarcações celulares de IGF-1 e IGF-1R na cartilagem do PC dos grupos com idade de 04 semanas.

Fonte: (GONÇALVES, 2017).

Legenda: Expressão imuno-histoquímica de IGF-1 e IGF-1R em células da cartilagem do PC da mandíbula de camundongos com idade de 04 semanas. **A, B** – C4; **C, D** – M4; **E, F** – L4. Observar os condrócitos imunorreativos (setas espessas), e a ausência de imunorreatividade (setas delgadas). (Barra de calibração: 40µm).

A maior expressividade tanto do peptídeo (IGF-1) quanto do receptor (IGF-1R) ocorreu em C4 que apresentou células com marcação imuno-histoquímica em todas as camadas, porém mais predominantemente em **c** e **h**. Por sua vez, níveis progressivos (de **a-h**) de imunoexpressão para o IGF-1 foram observados em M4, grupo onde as marcações de IGF-1R foram mais expressivas e uniformemente distribuídas por todas as camadas. Aparentemente, a densidade de condrócitos que expressaram IGF-1 diminuiu drasticamente em L4, enquanto a marcação para IGF-1R no mesmo grupo, foi pouco expressiva e variável entre as camadas (Figura 09).

Figura 10 – Imunomarcações celulares de IGF-1 e IGF-1R na cartilagem do PC dos grupos com idade de 10 semanas.

Fonte: (GONÇALVES, 2017).

Legenda: Imunomarcações celulares na cartilagem do PC da mandíbula de camundongos com idade de 10 semanas. **A, B** - C57BL10; **C, D** - *dmd^{mdx}*; **E, F** - *large^{myd}*. Observar os condrocitos imunorreativos (setas espessas), e a ausência de imunorreatividade (setas delgadas). (Barra de calibração: 40µm).

Com relação aos grupos de 10 semanas, as imunomarcações foram expressivas em todas as camadas da cartilagem do PC de C10, tanto para o peptídeo quanto para o seu receptor. Essa imunorreatividade diminuiu em M10, onde houve fraca reatividade em toda a extensão do tecido. Ausência de expressão ou imunomarcações inexpressivas tanto para IGF-1 quanto para IGF-1R, foram predominantes em L10 (Figura 10).

5.2.Aspectos Quantitativos

Nesse item serão descritos os resultados referentes aos cortes submetidos à avaliação histomorfométrica.

5.2.1 Espessura das camadas

Na tabela 1 e figura 11 são observados os dados referentes à espessura total (**t**) da cartilagem do PC e das camadas **a + p**, **c** e **h**.

Tabela 1 – Média ($\pm$ DP) da espessura das camadas da cartilagem do PC dos grupos C4, M4, L4, C10, M10 e L10.

Grupos	Espessura das camadas (μm^2)			
	t	a+p	c	h
C4	194,85 $\pm$ 14,7 ^a	31,54 $\pm$ 1,94 ^a	55,74 $\pm$ 4,16 ^a	106,68 $\pm$ 5,58 ^a
M4	174,95 $\pm$ 7,31 ^a	20,18 $\pm$ 1,44 ^b	44,43 $\pm$ 2,47 ^b	109,45 $\pm$ 4,55 ^a
L4	94,03 $\pm$ 2,68 ^{bc}	17,19 $\pm$ 0,42 ^b	28,79 $\pm$ 1,18 ^c	47,39 $\pm$ 2,49 ^b
C10	113,86 $\pm$ 1,53 ^{bc}	11,94 $\pm$ 1,01 ^c	37,32 $\pm$ 1,17 ^{db}	63,94 $\pm$ 2,26 ^c
M10	111,67 $\pm$ 2,95 ^{bc}	15,34 $\pm$ 0,43 ^c	31,57 $\pm$ 1,88 ^{dc}	63,97 $\pm$ 2,88 ^c
L10	74,07 $\pm$ 0,72 ^{bd}	10,81 $\pm$ 0,17 ^c	15,02 $\pm$ 0,23 ^e	48,14 $\pm$ 0,26 ^{db}

*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Considerando-se o fator **idade**, nota-se que nas faixas etárias abordadas, tanto os grupos L4 e L10 exibiram espessuras menores do que os demais grupos correspondentes (C4 e M4; C10 e M10). Na comparação entre as faixas etárias os grupos C4 e M4 apresentaram **t** significativamente maior que seus correspondentes de 10 semanas (C10 e M10). No entanto, ao se comparar os grupos L4 e L10 não houve diferença significativa (Figura 11A).

Na comparação da espessura das camadas **a+p** notou-se inicialmente que as médias de todos os grupos de 04 semanas foram maiores que os seus correspondentes de 10 semanas. Nos animais com 04 semanas, as médias dos grupos M4 e L4 foram menores do que a do controle; no entanto não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre ambos. Com 10 semanas, muito embora tenha ocorrido uma tendência a um aumento desse parâmetro nos animais do grupo M10, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 11B).

Com relação à camada **c**, as médias de todos os grupos de 04 semanas foram maiores que os seus correspondentes de 10 semanas. Entre os grupos de mesma idade, ocorreu uma diminuição progressiva e estatisticamente significativa dessa camada de C4 para M4 e L4. Contudo, na idade de 10 semanas, muito embora tenha sido observada uma diminuição na mesma ordem (isto é, de C10 para M10 e L10) e o grupo L10 ter exibido uma média correspondente a aproximadamente a metade daquela dos demais grupos, não houve diferença entre os grupos C10 e M10 (Figura 11C).

As maiores médias para a espessura da camada **h** nos grupos de 04 semanas foram encontradas em C4 e M4, que não diferiram estatisticamente entre si. Nessa fase, a espessura de **h** no grupo L4 correspondeu a menos da metade do observado para os demais grupos. Na idade de 10 semanas, médias muito próximas e, portanto, sem diferença estatística, foram verificadas nos grupos C10 e M10 e, embora o grupo L10 também tenha exibido a menor área, a diferença não foi tão marcante quanto ao ocorrido entre os grupos de 04 semanas (Figura 11D).

Figura 11 – Representação gráfica da espessura total das camadas do PC.

Fonte: (GONÇALVES, 2017).

Legenda: Espessura total da cartilagem (A), das camadas articular+pré-condroblástica (a+p) (B), condroblástica (c) (C e hipertrófica (h) (D) que compõem a cartilagem do PC da mandíbula nos grupos C4, C10, L4, L10, M4 e M10. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos.

5.2.2 Densidade e Área dos condrócitos

Os resultados referentes à densidade e área dos condrócitos da camada **c** são expressos na tabela 2 e figura 12.

Tabela 2 – Média ($\pm$ DP) da densidade e da área dos condrócitos de **c** da cartilagem do PC.

Grupos	Densidade de condrócitos (mm ²)	Área (μm ²)
C4	57,56 $\pm$ 2,6 ^a	99,62 $\pm$ 8,62 ^a
M4	45 $\pm$ 2,31 ^b	84,31 $\pm$ 10,5 ^a
L4	14,88 $\pm$ 0,57 ^c	172,3 $\pm$ 9,6 ^b
C10	24,28 $\pm$ 0,79 ^d	135,46 $\pm$ 10,9 ^c
M10	23,52 $\pm$ 1,11 ^d	95,07 $\pm$ 9,8 ^{da}
L10	8,88 $\pm$ 0,24 ^e	152,53 $\pm$ 9,2 ^c

*Médias seguidas por letras diferentes em cada coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na fase de 04 semanas, esse parâmetro foi maior no grupo C4 comparativamente aos grupos M4 e L4; dentre estes, os animais do grupo L4 foram os que exibiram a menor densidade celular. Com 10 semanas, a densidade de condrócitos foi semelhante entre os grupos C10 e M10 e, como na idade de 04 semanas, o grupo L10 foi o que exibiu a menor média para esse parâmetro (Figura 12).

Relativamente à média da área dos condrócitos, observou-se que, com a idade, houve um aumento significativo deste parâmetro em todos os grupos no período de 04 para 10 semanas. Além disso, os animais afetados pela distrofia, mais marcadamente os mutantes *large^{myd}* (L4 e L10) apresentaram a área significativamente maior quando comparados aos seus respectivos controles.

Figura 12 – Representação gráfica da densidade e área dos condrócitos de c.

Fonte: (GONÇALVES, 2017).

Legenda: Densidade (mm²) e área dos condrócitos (μm²) da região central da camada condroblástica (c) do PC da mandíbula nos grupos C4, M4, L4, C10, M10 e L10. As letras (a, b, c, d, e) indicam diferenças significativas entre os grupos.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Confrontados com a literatura consultada, os resultados desta seção serão discutidos respeitando-se nos diferentes itens, os aspectos qualitativos e quantitativos.

6.1 ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA

A avaliação histológica demonstrou que a cartilagem do PC da mandíbula dos animais dos grupos distróficos nas duas idades estudadas exibiu diferentes modificações dos padrões de normalidade tecidual, refletindo em cada grupo o seu estado morfofuncional, a sua viabilidade e, em alguns casos, o estabelecimento de um processo patológico.

Desta forma, nos animais do grupo *dmd^{mdx}*, apesar da cartilagem apresentar aspectos de deformação (como o achatamento e encurvamento das colunas de células), uma diminuição de **t**, e redução marcante de **c**, que foi diretamente proporcional à diminuição da densidade de suas células, as alterações foram sutis e parecem estar associadas ao próprio processo biodinâmico e fisiológico da cartilagem. Tal aspecto está, principalmente, relacionado à paridade inerente a uma comparação entre idades, já que **t** e **c** tiveram valores numéricos diminuídos de 04 para 10 semanas. Nesse sentido, e considerando também que nos camundongos *dmd^{mdx}*, os músculos esqueléticos apresentam uma substancial regeneração das fibras musculares, responsáveis pelos poucos sinais clínicos de fraqueza muscular (DURBEEJ; CAMPBELL, 2002), não se pode afirmar que tais mudanças estruturais sejam decorrentes exclusivamente de uma provável debilidade muscular e conseqüentemente, da deficiente biomecânica da articulação. Isto é plausível, uma vez que algumas características pertencem à plasticidade tecidual e alguns parâmetros de recuperação foram evidentes, como a nítida limitação dos estratos celulares em M10, e a redução progressiva da espessura com valores numéricos muito próximos, quando comparados aos respectivos controles (C4 e C10). Como descrito por Girdler (1997), tais modificações cartilagíneas no decorrer da idade também podem estar relacionadas com a capacidade curativa/adaptativa inerente

deste tecido em responder às injúrias através de regeneração, devido à atividade das células condroprogenitoras de sua fibrocartilagem.

Relativamente aos dados obtidos para os animais *large^{myd}*, há indícios evidentes de que a cartilagem do PC sofreu estresse de alto impacto nas fases aqui abordadas. Corroboram as reduções drásticas das espessuras (total e por camadas), bem como a hipocelulariedade em **c**, indicativos da ocorrência de degeneração cartilágnea secundária à desordem muscular, confirmada pela dificuldade na distinção das camadas, desorganização dos condrócitos e rarefação de células, tanto em L4 quanto em L10. Nesses animais, observações como a teoria da mecanotransdução, que liga a qualidade do músculo esquelético ao osso, podem servir para elucidar tais achados. De fato, ao se considerar tal teoria, ou seja, o mecanismo pelo qual um fenômeno físico, determina uma resposta bioquímica na célula (DUNCAN; TURNER, 1995), é lícito supor que a perda da morfostase da cartilagem do PC dos animais *large^{myd}* indique que a degeneração muscular - e a consequente instabilidade da musculatura afetada – induziu a uma desestruturação determinada pela falta de estímulos condrogênicos responsivos. Tais assertivas concordam com os dados de Miyazaki et al (2016) ao relacionarem a hipofunção muscular ao movimento articular limitado, capaz de induzir uma diminuição da osteogênese. Outra possibilidade, é que a distrofia muscular tenha determinado a perda súbita da capacidade de adaptação articular, uma vez que nos animais *large^{myd}*, com o avanço da idade, a patologia é caracterizada por necrose das fibras musculares e regeneração, proliferação endomisial de tecido conjuntivo e adiposo, e alterações severas nos músculos intrínsecos da língua, que resultam em uma profunda deficiência morfofuncional desse órgão, influenciando sobremaneira a mastigação e a deglutição (HOLZFEIND et al, 2002).

Essa hipótese é reforçada quando se observa a camada **h** desses animais, que exibiu valores muito próximos entre L4 e L10, mantendo-se praticamente iguais e sem redução substancial de sua espessura, indicativo de distúrbios no processo de ossificação endocondral e que, segundo Berchtold et al. (2000) estaria relacionado à homeostase de cálcio, que é crítica para muitos aspectos da função muscular.

Pesquisas recentes têm avaliado o desenvolvimento e a manutenção do fenótipo do condrócito, principalmente porque os tratamentos atuais e futuros para danos na cartilagem incluem implante de células-tronco e condrócitos maduros nos defeitos

teciduais. Estudos *in vitro* de condrócitos mostraram que condições de cultura que incluíam, por exemplo, alta densidade celular e contato célula-célula, parecem manter seu fenótipo e a produção do colágeno (INSALL, 2015).

Analisando-se a área dos condrócitos da camada **c** dos grupos *large^{myd}*, as maiores médias foram observadas nos grupos L4 e L10, ou seja, exatamente nos animais que apresentam fenótipo severo da doença neuromuscular. Tal dado, somado aos eventos secundários que participam da degeneração muscular distrófica – inflamação, apoptose e adaptação vascular prejudicada (DECONINCK; DAN, 2007) – permite associar o dano cartilagíneo a uma hipertrofia compensatória das células remanescentes, necessárias para a manutenção da estrutura cartilagínea primitiva, como resposta à demanda de aumento da função celular devido ao prejuízo do início da ossificação.

Sabe-se que a ativação de determinadas vias de sinalização dos condrócitos, dentre elas principalmente as da MAP quinases, são necessárias para a diferenciação celular hipertrófica e para o crescimento endocondral (PI-3 quinase). Desta forma, tem sido demonstrado que a modulação dessas vias está associada a vários estados patológicos na cartilagem, onde lâminas epifisiais mostraram-se desorganizadas e sofreram diferenciação hipertrófica (BEIER, LOESER, 2010).

A avaliação da ultraestrutura dos condrócitos demonstrou que, nos animais *dmd^{mdx}*, os aspectos de organelas como o RER sinalizam para uma síntese e secreção normais de componentes da matriz extracelular, como também foi observado nos grupos controle. Diferenças significativas foram encontradas no núcleo e nucléolo do grupo *large^{myd}*, o que pode refletir a disfuncionalidade e a falta de capacidade da célula de conservar a sua estabilidade. Dado que o crescimento refere-se às mudanças dimensionais na quantidade de substância viva, que é consequência de divisões celulares ou atividades biológicas, os resultados dos animais *large^{myd}* demonstram que o as alterações de crescimento da cartilagem do PC os torna mais vulneráveis à incidência de processos patológicos nesse tipo de tecido.

6.2 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A destruição da matriz e a perda de componentes são um marco na doença cartilágnea degenerativa (AIGNER et al., 2007). Na presente pesquisa, utilizando-se a técnica do Picrossírius sob luz polarizada, verificou-se entre os grupos certa heterogeneidade quanto à organização espacial e tipo predominante de fibras colágenas da MEC. O aumento de fibras do tipo III em M4 e M10, e principalmente em L4 e L10 sugere a ocorrência, em menor ou maior grau, uma displasia do colágeno, uma vez que a predominância dessas fibras caracterizam uma menor resistência do tecido (BÖNNEMANN et al., 2014). Isso estabelece uma causa para se prever implicações diretas na capacidade biomecânica do tecido cartilágneo, devido à menor resistência às forças de tensão e cisalhamento, não somente pelo arranjo das fibras do tipo III, mas também porque o colágeno regula o aspecto espacial da mineralização, por definir o local para a deposição e crescimento dos cristais de hidroxapatita (CLARKE, 2008). Sendo assim, um arcabouço de fibras colágenas displásico nos animais distróficos, pressupõe prejuízos ao osso, relacionados com uma menor aderência (RUPPEL, MILLER, BURR, 2008).

Todavia, quando se avalia os aspectos ultraestruturais da MEC, é que se identifica a variação na densidade e orientação das fibrilas colágenas. A organização em malha pantográfica ampla, além da redução da densidade fibrilar em *dmd^{mdx}* e, mais marcadamente, a falta de organização das fibrilas de diferentes espessuras em *large^{myd}* corroboram a hipótese de que danos de resistência mecânica sejam esperados na cartilagem desses animais, uma vez que a falta do arranjo convencional das fibrilas determina reação insuficiente frente à ação de uma força que tende a deformar o tecido (FENG et al., 2006).

As propriedades mecânicas da cartilagem dependem não só da rede colágena, mas também estão relacionadas com as proteoglicanas da MEC (MOW, GUO, 2002), envolvidas nos processos de multiplicação e migração celular (MATAVELI et al., 2009; IRVING-ROEDGERS et al., 2010), regulação de proteínas sinalizadoras (ALMEIDA et al., 2001) e interação com outras proteínas fibrosas da matriz (MICHELACCI et al., 1979). Sabe-se que o comprometimento do gel de proteoglicano/colágeno incide sobre a hidratação tecidual e, conseqüentemente, a nutrição celular (URBAN, MCMULLIN,

1985). Pela técnica histoquímica da Safranina-O para análise do proteoglicanas da matriz aqui empregada, notou-se uma maior intensidade nos grupos C4, e M10, indicando uma concentração elevada desses componentes extracelulares nesses animais. Similar ao colágeno, a degradação de proteoglicanas é observada na degeneração precoce da cartilagem (LIN, CHEN, TORZILLI, 2004) o que explica, em parte, a baixa intensidade em todas as camadas de L4. No entanto, a renovação da matriz parece ser o único mecanismo compensador das agressões à cartilagem (CÁCERES et al.; 2000), fato que pode estar associado ao aumento da concentração de proteoglicanas na MEC de L10.

6.3 EXPRESSÕES DO IGF-1 e IGF-1R

Os resultados qualitativos das reações de imuno-histoquímica demonstraram que tanto o IGF-1 quanto o IGF-1R foram fortemente expressos nos animais controle (C4 e C10) nas camadas médias e profundas (**p**, **c** e **h**). Tal observação sugere a ação autócrina/parácrina desses componentes na morfogênese da cartilagem, já que a presença e também esse padrão de condrócitos expressivos seguem aqueles reconhecidos em condições de homeostasia, onde a imunolocalização é baixa na superfície da cartilagem, aumentando nas camadas média e profunda de células. Essa heterogeneidade está diretamente relacionada com o controle diferencial da ação dos Igfs, pois os condrócitos são não-responsivos em condições normais, tornam-se imunorreativos apenas quando o tecido necessita de seu desempenho catalítico (HINTON; CARLSON, 2005), ou seja, no caso do presente estudo, nas regiões onde predominam a multiplicação celular (camada pré-condroblástica) e secreção de matriz cartilágnea (camada condroblástica) (CAVALLI et al., 2015). Ademais, a expressão de IGF-1R sob um ambiente rico em IGF-1 está envolvida no crescimento subsequente da cartilagem (SHIBATA et al, 2012), o que explica as áreas Igfs-positivas da camada hipertrófica – a zona de ossificação endocondral – (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004), onde os Igfs participam do processo de apoptose dos condrócitos (YOKOTA et al, 2008).

No entanto, a distrofia muscular influenciou as expressões proteicas de ambos (ligante e receptor), sendo estas aparentemente discretas em *dmd^{mdx}* e quase

inexpressivas em *large^{myd}*, além de difusamente distribuídas em todas as camadas cartilagíneas dos grupos de 04 e também de 10 semanas. As explicações dos diferentes autores que levam em consideração a modulação dos componentes do sistema Igf através do estímulo mecânico podem esclarecer tais observações já que a fraqueza muscular parece ter relação direta com a redução da imunopositividade do peptídeo tal qual do seu receptor (BARTON et al., 2002). Tal hipótese está fundamentada em resultados de pesquisas que se utilizam da ortopedia funcional dos maxilares para demonstrar que o uso de aparelhos propulsores da mandíbula, ao modificarem a postura da cabeça e aumentarem as tensões musculares na região articular, aumentam o padrão de expressão do IGF-1 estimulando consequentemente a condrogênese (HAJJAR; SANTOS, KIMURA, 2003), diferentemente do observado na presente pesquisa, onde na camada de proliferação condroblástica dos animais distróficos, detectou-se baixa densidade de células imunorreativas.

Avaliações histomorfométricas sobre os efeitos de injeções periódicas locais de IGF-1 em cápsulas articulares de ratos adultos demonstraram um aumento da espessura total da cartilagem, e uma diminuição da área média do osso subcondral (ZHANG et al., 2017). Como no presente trabalho não se avaliou sob o aspecto quantitativo as porcentagens médias de IGF-1 e IGF-1R nas camadas da cartilagem dos diferentes grupos, os dados aqui expostos são sugestivos de que efeitos contrários aos descritos por Wang et al. (2011) ocorram nas cartilagens dos grupos distróficos. Merece destaque principalmente os grupos L4 e L10, já que a confirmada redução das espessuras totais de suas cartilagens, aliada às imunoexpressões diminuídas de IGF-1 e de seu receptor, podem levar a prejuízos quanto ao período de maturação da cartilagem, com formação óssea precoce e deficiente.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e os resultados obtidos, é lícito concluir-se que:

1. Ainda que tenha sido observada uma tendência de modificações na morfologia do tecido cartilagíneo dos animais *dmd^{mdx}*, já que M4 e M10 exibiram camadas cartilagíneas ora semelhantes aos animais do grupo controle, ora regiões semelhantes aos dos grupos formados por mutantes *large^{myd}*, a capacidade de repostas nesses grupos foi satisfatória e capaz de recuperar o padrão de seus componentes estruturais;

2. A morfogênese e a morfostase da cartilagem do PC da mandíbula dos camundongos *large^{myd}* foram alteradas, demonstrado através do certo grau de atipia celular, atrofia tissular e indícios de comprometimento na produção de proteínas por suas células, produzindo uma cartilagem deficiente e com consequente incapacidade de manter o arranjo cartilagíneo característico, como constatados em L4 e L10;

3. Na cartilagem de todos os grupos estudados (C4, C10, M4, M10, L4 e L10), foi detectada por imuno-histoquímica, marcações celulares para IGF-1 e IGF-1R, sugerindo a participação em eventos de proliferação e diferenciação;

4. Sob o aspecto qualitativo, ocorreu alteração do padrão de expressão do IGF-1 e do seu receptor (IGF-1R) na cartilagem do PC dos animais distróficos (grupos *dmd^{mdx}* e *large^{myd}*);

5. Qualitativamente, observou-se um predomínio de fibras colágenas do tipo I nos animais do grupo controle, e uma maior quantidade de fibras do tipo III nos animais dos grupos *large^{myd}*. Os grupos formados por animais *dmd^{mdx}* demonstraram aparente tendência de recuperação do padrão característico do grupo controle (N) através do equilíbrio entre fibras do tipo I e do tipo III, observado nos animais do grupo *large^{myd}*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AIGNER, T.; SÖDER, S.; GEBHARD, P. M.; MCALINDEN, A.; HAAG, J. Mechanisms of Disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis - structure, chaos and senescence. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 3, p. 391-399, 2007.

ANJUM, R.; JAWAD, U.; NASEEM, N. Oro-facial dysfunction in patients with muscular dystrophies. **Pakistan Oral & Dental Journal**, v. 37, n. 1, p. 41-44, 2017.

ALLAMAND, V.; CAMPBELL, K. P.; Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 16, 2459-2467, 2000.

ALMEIDA, P. C.; NANTES, I. L.; CHAGAS, J. R.; RIZZI, C.C.A.; ALARIO, A. F.; CARMONA, E.; JULIANO, L.; NADER, H. B.; TERSARIOL, I. L. S. Cathepsin B activity regulation heparina-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline ph-induced inactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 944-951, 2001.

BALASUBRAMANIAM, R.; SOLLECITO, T. P; STOOPLER, E. T. Oral health considerations in muscular dystrophies. **Special Care in dentistry**, v. 28, n.6, p. 243-253, 2008.

BARNOUTI, Z. P.; OWTAD, P.; SHEN, G.; PETOCZ, P.; DARENDELILER, M. A. arendeliler MA. The biological mechanisms of PCNA and BMP in TMJ adaptive remodeling. **Angle Orthodontist**, v. 81, n. 1, p. 91-99, 2011.

BARTON, E. R., MORRIS, L., MUSARO, A., ROSENTHAL, N., SWEENEY, H. L. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. **The Journal of cell biology**, v. 157, n. 1, p. 137-148, 2002.

BEIER, F.; LOESER, R. F. B. Biology and Pathology of Rho GTPase, PI-3 Kinase-Akt,

and MAP Kinase Signaling Pathways in Chondrocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, n.3, p. 573–580, 2010.

BOLDRINI, S. C. **Efeitos da desnutrição proteica pré e pós-natal e da renutrição pós-natal sobre o crescimento craniofacial de ratos wistar: análise craniométrica, morfoquantitativa e ultraestrutural**. 2003. 68f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

BONEWALD, L. F.; KIEL, D; CLEMENS, T.; ESSER, K; ORWOLL, E; O’KEEFE, R. O.; FIELDING, R. Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. **Journal Bone Mineral Research**, v. 28, n. 9, p. 1857-1865, 2013.

BERCHTOLD, M.W., BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1215-1265, 2000.

BÖNNEMANN, C. G.; WANG, C.H.; QUIJANO-ROY, S.; DECONINCK, N.; BERTINI, E.; FERREIRO, A.; MUNTONI, F.; SEWRY, C. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, v. 24, n. 4, p. 286-311, 2014.

BOTTERON, S.; VERDEBOUT, C. M.; JEANNET, P. Y.; KILIARIDIS, S. Orofacial dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n.1, p. 26–31, 2009.

BULFIELD, G.; SILLER, W. G.; WIGHT, P. A.; MOORE, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 81, n.4, p. 1189-1192, 1984.

BROWNING, C. A.; GREWAL, P. K.; MOORE, C. J.; HEWITT, J. E. A rapid PCR method for genotyping the Large (myd) mouse, a model of glycosylation-deficient congenital muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, n.5, p. 331-335, 2005.

CARLSON, D. S.; McNAMARA, J. A.; GRABER, L.W; HOFFMAN, D. L. Experimental studies of the growth and adaptation of the temporomandibular joint. **Current Advances In Oral Surgery**, v. 3, p. 28-81, 1980.

CÁCERES, S., CUELLAR, C., CASAR, J. C., GARRIDO, J., SCHAEFER, L., KRESSE, H., BRANDAN, E. Synthesis of proteoglycans is augmented in dystrophic mdx mouse skeletal muscle. **European journal of cell biology**, v. 7, n. 3, p. 173-181, 2000.

CAVALLI, M. A.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, J. N. B.; SILVA, J. B.; BOLDRINI, S. C.; LIBERTI, E. A. Evaluation of protein undernourishment on the condylar process of the Wistar rat mandible correlation with insulin receptor expression. *Journal of Applied Oral Science*, v. 23, n. 2, p.135-144, 2015.

CHAI, Y.; MAXSON, R. E. JR. Recent advances in craniofacial morphogenesis. **Developmental Dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 235, n. 9, p. 2353-2375, 2006.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, p. 131-139, 2008.

COPRAY, J. C. V. M.; DIBBETS, J. M. H., KANTOMAA, T. The role of condylar cartilage in the development of the temporomandibular joint. **The Angle Orthodontist**, v.58, n. 4, p. 369-380, 1988.

DARENDELIER, M. A; SHEN, G. The adaptative remodeling of condylar cartilage – a transition from chondrogenesis to osteogenesis. **Journal of dental research**, v. 84, p. 691-699, 2005.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. **Pediatric Neurology**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2007.

DELATTE, M.; VON den HOFF, J. W.; MALTHA, J. C.; KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. Growth stimulation of mandibular condyles and femoral heads of newborn rats by IGF-I. **Archives of Oral Biology**, v. 49, n. 3, p. 165-175, 2004.

DUBOWITZ, V. **Muscle biopsy: A practical approach**. 2a ed. London: Bailliere Tindall, 1985.

DUNCAN, R. L.; TURNER, C. H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. **Calcified Tissue International**, v. 57, n.5, p. 344-58, 1995.

DURBEEJ, M.; CAMPBELL, K. P. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. **Current Opinion Genetics & Development**, v. 12, n. 3, p. 349-61, 2002.

ENOMOTO, A.; WATAHIKI, J.; NAMPO, T.; IRIE, T.; ICHIKAWA, Y.; TACHIKAWA, T.; MAKI, K. Mastication markedly affects mandibular condylar cartilage growth, gene expression, and morphology. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 146, n.3, p. 355-63, 2014.

ERTUK, N.; DOGAN, S. The effect of neuromuscular diseases on the development of dental and occlusal characteristics. **Oral medicine**, v. 22, p. 318-321, 1991.

FENG, H., DANFELTER, M., STRÖMQVIST, B., HEINEGARD, D. Extracellular matrix in disc degeneration. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume**. v. 88, n. 2, p. 25-29, 2006.

FUENTES, M. A.; OPPERMAN, L. A.; BUSCHANG, P.; BELLINGER, L. L.; CARLSON, D. S.; HINTON, R. J. Regulation of cell proliferation in rat mandibular condylar cartilage in explant culture by insulin-like growth factor-1 and fibroblast growth factor-2. **Archives of Oral Biology**, v. 47, n. 9, p. 643-654, 2002.

FUENTES, M. A.; OPPERMAN, L. A.; BUSCHANG, P.; BELLINGER, L. L.; CARLSON, D. S.; HINTON, R. J. Lateral functional shift of the mandible: Part I. Effects on condylar cartilage thickness and proliferation. **American Journal Orthodontic Dentofacial Orthopedic**, v.123, n. 2, p. 153-159, 2003.

GIRDLER, N. M. The role of mandibular condylar cartilage in articular cartilage repair. Nicholas Martin Girdler. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 79, n. 1, p. 28-37, 1997.

GRABER, L. W.; VIG, K. W. L.; **Ortodontia. Princípios e técnicas atuais.** Desenvolvimento e Crescimento Craniofacial: Perspectivas baseadas em evidências. 2012.

GREWAL, P. K.; McLAUGHLAN, J. M., MOORE, C. J., BROWNING, C. A.; HEWITT, J. E. N. Characterization of the LARGE family of putative glycosyltransferases associated with dystroglycanopathies. **Glycobiology**, v. 15, p. 912-923, 2005.

HALLY, A. D. A counting method for measuring the volumes of tissue components in microscopical sections. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, v. 105, p. 503-517, 1964.

HAJJAR, D.; SANTOS, M. F.; KIMURA, E. T; Propulsive appliance stimulates the synthesis of insulin-like growth factors I and II in the mandibular condylar cartilage of young rats. **Archives of Oral Biology**, v. 48, p. 635-642, 2003.

HINTON, R. J.; CARLSON, D. S. Regulation of growth in mandibular condylar cartilage. **Seminars in Orthodontics**, v.11, p. 209–218, 2005.

HOLZFEIND, P. J.; GREWAL, P.K.; REITSAMER, H.A; KECHVAR, J.; LASSMAN, H.; HOEGER, H.; HEWITT, J. E.; BITTNER, R. E. Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission , and neuronal migration defects in the *Large^{myd}* mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle-eye-brain disorders. **Human Molecular Genetics**, v.11, n. 21, p. 2673-2687, 2002.

INSALL, W. N. **Surgery of the knee**. 6 ed. New York: Elsevier, 2015. 2360p.

IRVING-RODGERS, Helen F. et al. Dynamics of extracellular matrix in ovarian follicles and corpora lutea of mice. *Cell and Tissue Research*, v. 339, n. 3, p. 613-624, 2010.

JING, Y.; ZHOU, X.; HAN, X; JING, J.; VON DER MARK, K.; WANG, J.; CROMBRUGGHE, B.; HINTON, R.J.; FENG, J. Q. Chondrocytes Directly Transform into Bone Cells in Mandibular Condyle Growth. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 12, p. 1668-675, 2015.

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

KILIARIDIS, S. Masticatory muscle influence on craniofacial growth. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 53, n.3, p. 196-202, 1995.

KHURANA, T. S.; DAVIES, K. E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 379-390, 2003.

LIN, P. M., CHEN, C. T. C., TORZILLI, P. A. Increased stromelysin-1 (MMP-3), proteoglycan degradation (3B3-and 7D4) and collagen damage in cyclically load-injured articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 6, p. 485-496, 2004.

LOESER, R. F. Growth factor regulation of chondrocyte integrins. Differential Effects of Insulin-Like Growth Factor 1 and Transforming Growth Factor p on $\alpha 1$ Integrin Expression and Chondrocyte Adhesion to Type VI Collagen. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 2, p. 270-276, 1997.

LONGMAN, C; BROCKINGTON, M.; TORELLI, S.; JIMENEZ-MALLEBRERA, C.; KENNEDY, C; KHALIL, N.; FENG, L; SARAN, R. K.; VOIT, T.; MERLINI, L.; SEWRY, C. A.; BROWN, S. C.; MUNTONI, F. Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of α -dytroglycan. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n.21, p. 2853-5861, 2003.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 1968.

LV, X.; LI, Q.; WU, S.; SUN, J. ZHANG, M.; CHEN, Y. J. Psychological stress alters the ultrastructure and increases IL-1 β and TNF- α in mandibular condylar cartilage. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 10, p. 968-976, 2012.

MAOR, G.; SILBERMANN, M.; VON DER MARK, K.; HEINGARD, D.; LARON, ZVI. Insulin enhances the growth of cartilage in organ and tissue cultures of mouse

neonatal mandibular condyle. **Calcified Tissue International**, v. 52, n. 4, 291-299, 1993.

MANDARIM-de-LACERDA, C.A. Manual de Quantificação Morfológica: morfometria, alometria e estereologia. **Rio de Janeiro, CEBIO**, 1991, 98p.

MARTINS, P. C. M.; AYUB-GUERRIERI, D.; MARTINS-BACH, A. B.; ONOFRE-OLIVEIRA, P.; MALHEIROS, J. M.; TANNUS, A. SOUSA, P. L.; CARLIER, P. G.; VAINZOF, M. *Dmd^{mdx}/Large^{myd}*: a new mouse model of neuromuscular diseases useful for studying physiopathological mechanisms and testing therapies. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, p. 1167-1174, 2013.

MATAVELI, F. D. A.; HAN, S. W.; NADER, H. B.; MENDES, A.; KANISHIRO, R.; TUCCI, P.; LOPES, A. C.; SILVA, J. C. C. B.; MAROLLA, A. P. C.; CARVALHO, L. P.; DENAPOLI, P. M. A.; PINHAL, M. A. R. Long-term effects for acute phase myocardial infarct VEGF 165 gene transfer cardiac extracellular matrix remodeling. **Growth Factors**, v. 27, n. 1, p. 22-31, 2009.

MICHELACCI, Y. M.; MOURÃO, P. A.; LAREDO, J.; DIETRICH, C. P. Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage. **Connective Tissue Research**, v. 7, n. 1, p.29-36, 1979.

MISTAKIDIS, I.; CHOLOPOULOS, C.; DIMITRAKOPOULOS, I. The Prospect of Stem Cell-Based Regeneration of the TMJ Disc: Where Have We Gone So Far? **Balkan Journal Stomatology**, v. 14, n.3, p. 100-123, 2010.

MIYAZAKI, M.; YONEMITSU, I.; TAKEI, M.; KURE-HATTORI, I.; ONO, T. The imbalance of masticatory muscle activity affects the asymmetric growth of condylar cartilage and subchondral bone in rats. *Archives of Oral Biology*, v. 63, p. 22-31, 2016.

MOREL-VERDEBOUT, C.; BOTTERON, S.; KILIARIDIS, S. Dentofacial characteristics of growing patients with Duchenne muscular dystrophy: a morphological study. **European Journal of Orthodontics**, v. 29, n. 5, p. 500–507, 2007.

MOSS, M. L. The functional matrix hypothesis of mechanotransduction revisited. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 112, n. 1, p. 8-11 1997.

MOW, V. C.; GUO, X. E. Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 4, p.175-209.

OHLSSON, C.; BENGTSSON, B. A.; ISAKSSON, O.G.; ANDREASSEN, T. T.; SLOOTWEG, M.C.; Growth hormone and bone. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 1, p. 55-79, 1998.

OWTAD, P.; PARK, J. H.; SHEN, G.; POTRES, Z.; DARENDELILER, M. A. The biology of TMJ growth modification: a review. *Journal of Dental research*, v. 92, n. 4, p. 315-321, 2013.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal Neurological Science**, v. 129, n.2, p. 97-105, 1995.

PETROVIC, A. Mechanisms and regulation of mandibular condylar growth. **Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica**, v. 10, n.1, p. 25-34, 1972.

RABIE, A. B.; XIONG, H.; HÄGG, U. Forward mandibular positioning enhances condylar adaptation in adult rats. *European Journal of Orthodontics*, v. 26, p. 353-358, 2004.

RAMIREZ-YAÑEZ, G. O. The mandibular condylar cartilage: a review. **International Journal of Jaw Functional Orthopedics**, v. 1, n. 1, p. 85-94, 2004.

REED, U. C. Doenças neuromusculares. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.1, p. 89-103, 2002.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 987 p.

RUPPEL, M. E.; MILLER, L. M.; BURR, D. B. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 9, p. 1251-1265, 2008.

SALOMÃO, E. C.; BATAGLION, C.; PAVÃO, R. F.; BORGES, M. Atendimento multidisciplinar em paciente portadora de disfunção temporomandibular associada à distrofia muscular. **Reabilitar**, v. 12, p. 18-22, 2001.

SERRANO, M. J.; SO, S.; SVOBODA, K. K. H.; HINTON, R. J. Cell fate mediators notch and twist in mouse mandibular condylar cartilage. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 607-613, 2011.

SHEN, G.; DARENDELILER, M. A. The adaptive remodeling of condylar cartilage – a transition from chondrogenesis to osteogenesis. **Journal Dental Research**, v. 84, n. 8, p. 691-699, 2005.

SHEN, G.; DARENDELILER, M. A. Cephalometric evaluation of condylar and mandibular growth modification: a review. *Orthod Craniofac Research*, v. 9, p. 2-9, 2006.

SHIBATA, S.; FUKUOKA, R.; SATO, R.; ABE, T.; SUZUKI, Y. An *in situ* hybridization study of the insulin-like growth factor system in developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. **European Journal of Histochemistry**, v. 56, n. 2, p. 142-148, 2002.

SIMÕES, W. Crescimento e ATM. In: Maciel NM e cols. **ATM e dores craniofaciais**. 1ª ed. São Paulo: Livraria Editora Santos Ltda., p. 7-17, 2003.

TORRES, L. F.; DUCHEN, L.; W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**, v. 10, n. 2, p.269–299, 1997.

TURNER, R. T.; MARAN, A.; LOTINUN, S.; HEFFERAN, T.; EVANS, G. L. Animal models for osteoporosis. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders; New York**, v.2, n. p. 117-27, 2001.

URBAN, J.P.; MCMULLIN, J. F. Swelling pressure of the intervertebral disc: influence of proteoglycan and collagen contents. **Biorheology**, v. 22, n. 2, p. 145-157, 1985.

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C.; MARTINS, P. C.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animal models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, n.3, p. 241-248, 2008.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 36, n.5, p. 543-555, 2003.

VAN DEN ENGEL-HOEK, L.; ERASMUS, C. E.; HENDRIKS, J. C. M.; GEURTS, A. C. H.; KLEIN, W. M.; PILLEN, S.; SIE, L. T.; DE SWART, B. J. M.; GROOT, I. J. M. Oral muscles are progressively affected in Duchenne muscular dystrophy: implications for dysphagia treatment. **Journal of Neurology**, v. 260, n. 5, p. 1295-1303, 2013.

VAN BRUGGEN, H. W.; VAN DEN ENGEL-HOEK, L.; STEENKS, M.H.; BRONKHORST, E.M.; CREUGERS, N. H. J.; DE GROOT, I. J. M.; KALAYKOVA, S.I. Reduced mandibular range of motion in Duchenne Muscular Dystrophy: predictive factors. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 42, n. 6, p. 430-438, 2015.

VENTURIN, J. S.; SHINTAKU, W. H.; SHIGETA, Y.; OGAWA, T.; LE, B.; CLARK, G. T. Temporomandibular joint condylar abnormality: evaluation, treatment planning and surgical approach. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n.5, p. 1189-1196, 2010.

WANG, Y.; CHENG, Z.; ELALIEH, H. Z.; NAKAMURA, E.; NGUYEN, M. T.; MACKEM, S.; CLEMENS, T. L.; BIKLE, D. D.; CHANG, W. IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 7, p. 1437-1446, 2011.

WANG, L.; LAZEBNIK, M.; DETAMORE, M. S. Hyaline cartilage cells outperform mandibular condylar cartilage cells in a TMJ fibrocartilage tissue engineering application. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n.3, p.346-353, 2009.

WERNER, H.; KATZ, J. The emerging role of the insulin-like growth factors in oral biology. **Journal of Dental Research**, v.83, n.11,p. 832-6, 2004.

WHITMORE, C.; MORGAN, J. What do mouse models of muscular dystrophy tell us about the DAPC and its components? **International Journal of Experimental Pathology**, v.95, n.6, p.365–377, 2014. YOKOTA, T.; SHIMOKAWA, H.; SHIBATA, S.; ITOH, K.; BABA, Y.; OHIA, K. Insulin-like growth factor I regulaties apoptosis in condylar cartilage. **Journal of Dental Research**, v. 87, p. 159-63, 2008.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 2nd. Ed. **Prentice Hall**. USA, 1984.

ZATZ, M. O estudo do genoma humano contribuindo para a compreensão, o diagnóstico e a prevenção de doenças genéticas: o exemplo das doenças neuromusculares. **Revista de Medicina**, v. 7, p. 24-40, 2001.

ZHANG, Z., LI, L., YANG, W., CAO, Y., SHI, Y., LI, X., ZHANG, Q. The effects of different doses of IGF-1 on cartilage and subchondral bone during the repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 25, n, 2, p. 309-320, 2017.