Gisele Miyamura Martins Beber

**Interação músculo-osso: papel do IGF-1 de origem muscular no
esqueleto**

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Helena
de Azevedo Gouveia Ferreira

SÃO PAULO
2021

Gisele Miyamura Martins Beber

**Interação músculo-osso: papel do igf-1 de origem muscular no
esqueleto**

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Helena
de Azevedo Gouveia Ferreira

SÃO PAULO

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Beber, Gisele Miyamura Martins
Interação músculo-osso : papel do IGF-1 de origem
muscular no esqueleto / Gisele Miyamura Martins
Beber. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Cecília Helena de Azevedo Gouveia
Ferreira.

Descritores: 1.Osso e ossos 2.Músculo 3.Fator de
crescimento insulin-like I 4.Estresse mecânico
5.Suspensão de cauda 6.Microtomografia
computadorizada

USP/FM/DBD-006/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu esposo, por toda ajuda, carinho e amor a mim proporcionados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Adão José Carlos Martins pela dedicação que sempre teve com a família. Obrigada por ser um pai amoroso, preocupado e por sempre ter trabalhado muito para que tivéssemos educação e oportunidades. Foi graças ao seu esforço que cheguei até aqui. Te amo.

Agradeço a minha mãe Elza Yoshie Miyamura Martins pelos cuidados e amor dedicados a família. Agradeço por sempre ter pensado e feito muito mais pelos filhos que por você mesma. Obrigada por ser uma grande amiga e apesar da distância estar sempre ao meu lado. Te amo.

Agradeço ao meu esposo Eduardo Henrique Beber por ter me ajudado a realizar os meus grandes sonhos. Obrigada por toda a contribuição durante esses anos de doutorado e obrigada por todo o incentivo e ajuda profissional. Agradeço por ser meu amor, meu amigo, meu companheiro de trabalho e minha inspiração. Te amo.

Obrigada a minha querida orientadora Cecilia Helena de Azevedo Gouveia Ferreira por me receber em seu laboratório e pelas orientações de mestrado e doutorado as quais foram fundamentais para que eu pudesse me realizar profissionalmente. Agradeço por todos os ensinamentos, paciência, dedicação e amizade. Serei eternamente grata a você.

Agradeço ao meu irmão Leandro Miyamura Martins por todo carinho e cuidados dedicados aos nossos pais durante minha ausência. Obrigada por junto com minha cunhada Daniela Alvares ter presenteado nossa família com meu amado sobrinho e afilhado, Lucas Alvares Miyamura Martins.

Obrigada a Família Beber por ter me acolhido e me recebido de uma forma carinhosa todas as vezes em que estive em São Paulo para a realização do meu doutoramento. Tive muita sorte em me tornar parte dessa família.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Bianca Neofiti Papi, Lais Silva Ferreira, Manuela Miranda e, em especial, ao Vitor Nunes. Obrigada pela ajuda nos experimentos deste trabalho e pelos momentos descontraídos que me proporcionaram em São Paulo.

Agradeço de uma forma muito especial, a meu eterno amigo Marcos Vinicius da Silva (*in memoriam*). Agradeço por toda a ajuda na execução do meu mestrado e doutorado, e pelas inúmeras vezes em que me ajudou a estudar Anatomia. Obrigada por ter me trazido alegria e por ter sido um grande e verdadeiro amigo com quem sempre pude contar. Você sempre estará em meu coração.

Obrigada a todos os amigos do laboratório de biologia celular e molecular do músculo estriado, especialmente ao João Guilherme de Oliveira Silvestre e William José da Silva. Agradeço por terem me acolhido no laboratório, pelos ensinamentos e pela ajuda prestada todas as vezes que precisei.

Agradeço ao professor Anselmo Sigari Moriscot pela importante colaboração com este projeto. Obrigada pelos ensinamentos e contribuições em meu exame de qualificação, por ter disponibilizado seu laboratório para a realização dos experimentos, bem como por ceder os animais que foram fundamentais para a realização desse projeto.

Agradeço aos professores Helen Haruka Miyabara e Luis Mochizuki por comporem a minha banca de qualificação e pelas importantes contribuições na execução deste trabalho.

Obrigada ao Professor Rui Curi por ceder todo o material necessário para a realização da técnica de suspensão de cauda, fundamental para a execução deste projeto. Agradeço ainda ao Professor Gabriel Marzuca Nassr, ex aluno de doutorado do prof. Rui, pelos ensinamentos e disponibilidade em me ajudar.

Agradeço ao professor Pedro Duarte por me permitir utilizar o equipamento de microtomógrafo da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Unicamp. Agradeço ainda ao técnico Adriano Martins, por me receber e me orientar no uso do equipamento.

Agradeço ao Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por sempre autorizar minhas idas a São Paulo para a realização deste projeto. Obrigada especialmente aos professores e amigos Andrea Vasconcellos, Eduardo Henrique Beber, Josemberg Baptista, Ricardo Eustáquio, Rogerio Azeredo, Ruy Gusman e Willian Grazi Bautz que sempre se disponibilizaram a ajudar durante meus afastamentos.

Obrigada ao Programa de pós graduação em Fisiopatologia experimental da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) pela oportunidade de realização deste trabalho. Agradeço especialmente a professora Elia Tamaso Espin Garcia Caldini, por disponibilizar temporariamente o uso do seu nome para meu ingresso no Programa de pós graduação.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Interação músculo-osso: Papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto*", registrado sob o protocolo nº **104/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **05/10/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Bianca Neofiti Papi (Pós-graduando), Gisele Miyamura Martins Beber (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Muscle-bone Interaction. Role of IGF-1 from muscle on the skeleton*", protocol nº **104/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/5/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira**

- Team members: *Bianca Neofiti Papi (Graduate Student), Gisele Miyamura Martins Beber (Graduate Student).*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Selvagem FVB</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 meses/months</i>	<i>35</i>
	<i>Selvagem FVB</i>	<i>Macho/male</i>	<i>1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 meses/months</i>	<i>35</i>
	<i>MLC/mlgf-1</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 meses/months</i>	<i>35</i>
	<i>MLC/mlgf-1</i>	<i>Macho/male</i>	<i>1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 meses/months</i>	<i>35</i>

São Paulo, 05 de outubro de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.047.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **104/2016/CEUA**, de 05/10/2016, relativo ao projeto intitulado "**Interação músculo-osso: Papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto**", de responsabilidade da Profa. Dra. **Cecília Helena A. G. Ferreira**, do Departamento de Anatomia, aprovo as seguintes inclusões e conforme detalhamento da solicitação:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Mus musculus	Selvagem FVB	Fêmea	5 meses	1º ano: 7 2º ano: 7
Mus musculus	MLC/mlgf-1	Fêmea	5 meses	1º ano: 7 2º ano: 7
Mus musculus	Selvagem FVB	Macho	5 meses	3º ano: 7 4º ano: 7
Mus musculus	MLC/mlgf-1	Macho	5 meses	3º ano: 7 4º ano: 7

- Metodologia: suspensão de cauda, conforme procedimento descrito na solicitação de 17/03/2017, para analisar se o IGF-1 de origem muscular tem influência no metabolismo ósseo.

São Paulo, 04 de abril de 2017.

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **“Interação músculo-osso: Papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto”**, registrada com o nº **114/16**, sob a responsabilidade de **Cecilia Helena de Azevedo Gouveia Ferreira** e **Gisele Miyamura Martins Beber**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 09.11.16

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-11-2016 Término: 02-11-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Isogênico e Camundongo MLC/mlgf
Nº de animais	70 camundongos isogênicos e 70 camundongos MLC/mlgf
Peso/Idade	de 01 a 13 meses
Sexo	machos/fêmeas
Origem	Biotério do ICB

CEUA-FMUSP, 09 de Novembro de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 21.11.17, **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº **114/16** intitulado **“Interação músculo-osso: Papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto”** apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

- Acréscimo de **28** camundongos isogênicos, sendo 14 machos e 14 fêmeas e **28** camundongos MLC/mlgf, sendo 14 machos e 14 fêmeas – de 01 a 13 meses

Pesquisador Responsável: **CECILIA HELENA DE AZEVEDO GOUVEIA FERREIRA**

CEUA-FMUSP, 21 de Novembro de 2017

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Normalização adotada

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *international Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Interação músculo-osso	1
1.2 Efeitos do IGF-1 no tecido ósseo	8
1.3 Efeitos do IGF-1 no tecido muscular	10
1.4 O IGF-1 como candidato a mediador da interação músculo-osso	12
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivo específico	16
4 MÉTODOS	17
4.1 Uso e manuseio de animais	17
4.1.1 Animais modificados geneticamente	17
4.1.2 Técnica de suspensão de cauda	17
4.1.3 Grupos experimentais	19
4.2 Eutanásia dos animais e coleta de amostras	20
4.3 Área de secção transversal das fibras musculares através da ATPase	21
4.4 Comprimento corporal e comprimentos ósseos	21
4.5 Microtomografia computadorizada (μ CT) do fêmur	21
4.6 Teste biomecânico do fêmur	23
4.7 Análise estatística	24
5 RESULTADOS	25
5.1 Caracterização do fenótipo músculo-esquelético de camundongos TgIGF1 fêmeas e machos	25
5.1.1 Massa corporal	25
5.1.2 Massa muscular	26
5.1.3 Comprimento corporal	28
5.1.4 Comprimentos ósseos	29

5.1.5 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur	32
5.1.6 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur	37
5.1.7 Teste biomecânico do fêmur	40
5.2 Avaliação do impacto do <i>unloading</i> sobre a massa e estrutura ósseas de camundongos TgIGF1.	41
5.2.1 Massa corporal	41
5.2.2 Massa muscular	42
5.2.3 Área de secção transversal das fibras musculares	44
5.2.4 Comprimento corporal	49
5.2.5 Comprimentos ósseos	49
5.2.6 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur	52
5.2.7 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur	54
5.2.8 Teste biomecânico do fêmur	56
6 DISCUSSÃO	57
6.1 Caracterização do fenótipo músculo-esquelético de camundongos fêmeas e machos transgênicos que hiperexpressam IGF-1 em fibras musculares esqueléticas de contração rápida (camundongos TgIGF1).	57
6.2 Avaliação do <i>unloading</i> sobre a massa e estrutura ósseas de camundongos fêmeas e machos TgIGF1.	61
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	68

Lista de abreviaturas e siglas

2D	- Duas dimensões
3D	- Três dimensões
μCT	- Microtomografia Computadorizada
AST	- Área de secção transversal das fibras musculares
B.Ar	- Área da cortical
BMD	- Densidade Mineral Óssea
BMP	- Proteína Morfogenética Óssea
BV/TV	- Volume ósseo/Volume trabecular
C	- Cortical
CO₂	- Dióxido de carbono
Ct.Th	- Espessura cortical
DA	- Grau de anisotropia
DP	- Desvio padrão
EFTP	- Ensaio de Flexão de Três Pontos
FGF23	- Fator de Crescimento Fibroblástico 23
Fig.	- Figura
GH	- Hormônio do crescimento
IGF-I	- Fator de crescimento semelhante à insulina I
IGF-1R	- Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina I
IL	- Interleucina
L5	- Quinta vértebra lombar
OPG	- Osteoprotegerina
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase

PGE₂	- Prostaglandina E2
pH	- Potencial Hidrogeniônico
Po	- Porosidade da cortical
RANK	- Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
RANK-L	- Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
RNA_m	- RNA mensageiro
ROI	- Região de interesse
Selv	- Selvagem
SMI	- Índice do modelo estrutural
T	- Trabecular
TA	- Temperatura Ambiente
T.Ar	- Área perióstica
Tb.N	- Número de trabéculas
Tb.Pf	- Fator de padrão de osso trabecular
Tb.Sp	- Separação entre as trabéculas
Tb.Th	- Espessura trabecular
TG	- Transgênico
TgIGF1	- Transgênico (hiperexpressa IGF-1)
T.Pm	- Perímetro do periósteo
TRAP	- Fosfatase ácida tartrato-resistente

Resumo

Beber GMM. *Interação músculo-osso: papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo; 2021.

Está muito bem estabelecido que há interação mecânica entre os ossos e músculos. Sabe-se que os ossos se adaptam à demanda mecânica, e que a deformação elástica imposta aos ossos pela contração muscular estimula a formação óssea, ao mesmo tempo em que inibe a reabsorção. Entretanto, tem-se levantado a hipótese de que interações não mecânicas também ocorrem entre os ossos e os músculos. Alguns fatores que atuam no tecido ósseo e muscular têm sido sugeridos como possíveis fatores a atuarem na interação músculo-osso não mecânica. Um desses fatores é o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina I), que tem um importante papel no crescimento e desenvolvimento esquelético, além de atuar no desenvolvimento e regeneração muscular. Assim sendo, o presente estudo teve como principal objetivo investigar se o IGF-1 de origem muscular têm efeito na massa, microarquitetura e resistências ósseas. Para tanto, avaliamos o fenótipo esquelético do fêmur de camundongos machos e fêmeas transgênicos que hiperexpressam IGF-1 em fibras musculares esqueléticas de contração rápida (TgIGF1) ao longo do envelhecimento (1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 meses de idade). Além disso, avaliamos o efeito da retirada de carga mecânica (*unloading*), através da técnica de suspensão de cauda, nos ossos e músculos dos camundongos TgIGF1. As fêmeas TgIGF1 apresentaram hipertrofia muscular menos acentuada do que os machos transgênicos. Praticamente não houve diferenças significativas no comprimento ósseo dos camundongos TgIGF1 fêmeas em relação às fêmeas Selvagens (Selv), enquanto os comprimentos longitudinais ósseos foram maiores nos machos (vs. machos Selv). As fêmeas TgIGF1 apresentaram melhorias na microarquitetura óssea trabecular e cortical aos 3 e 5 meses, quando ocorreu hipertrofia muscular. Os machos TgIGF1 apresentaram melhorias nos parâmetros ósseos corticais durante o envelhecimento, quando ocorreu maior perda muscular do que nos machos Selv. O *unloading* foi mais deletério para o osso das fêmeas TgIGF1 em relação às fêmeas Selv, enquanto o músculo das fêmeas TgIGF1 e Selv respondeu de forma similar ao *unloading*. Esses resultados sugerem que: (i) o músculo dos machos é mais sensível aos efeitos hipertróficos do IGF-1 local do que o das fêmeas; (ii) o maior crescimento ósseo nos machos TgIGF1 pode ser decorrente do maior estresse mecânico e/ou de ações parácrinas do IGF-1 muscular; (iii) as melhorias ósseas apresentadas pelas fêmeas TgIGF1 parecem ser resultado de um maior estresse mecânico decorrente da hipertrofia muscular; (iv) o IGF-1 de origem muscular pode ter tido um efeito positivo e parácrino nos parâmetros ósseos corticais dos camundongos TgIGF1 durante o envelhecimento; (v) o IGF-1 de origem muscular depende da contração muscular e/ou de um maior estresse mecânico para exercer as suas ações anabólicas sobre as células musculares.

Descritores: Osso e ossos; Músculo; Fator de crescimento insulin-like I; Estresse mecânico; Suspensão de cauda; Microtomografia computadorizada.

Abstract

Beber GMM. *Muscle-bone interaction: role of IGF-1 of muscle origin in the skeleton* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

It is well established that there is mechanical interaction between bones and muscles. It is known that bones adapt to mechanical demand and that the elastic deformation imposed on bones by muscle contraction stimulates bone formation while inhibiting resorption. However, the hypothesis that non-mechanical interactions between bones and muscles also occur has been raised. Some factors that act on bone and muscle tissues have been suggested as possible factors that act on non-mechanical muscle-bone interaction. One of these factors is IGF-1 (insulin-like growth factor I), which plays an important role in skeletal growth and development, in addition to acting in muscle development and regeneration. Therefore, the present study aimed to investigate whether IGF-1 derived from skeletal muscle affects bone mass, microarchitecture, and resistance. Thus, we evaluated the skeletal phenotype of the femur of male and female transgenic mice that hyperexpress IGF-1 in fast-twitching skeletal muscle fibers (TgIGF1 mice) at 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 months of age. In addition, we evaluated the effect of removing mechanical load (*unloading*), using the tail suspension technique, on the bones and muscles of TgIGF1 mice. TgIGF1 females showed less pronounced muscle hypertrophy than transgenic males. There were practically no significant differences in the bone length of the female TgIGF1 mice in relation to the wild type (WT) females, while the bone longitudinal lengths were greater in males (vs. WT males). The TgIGF1 females showed improvements in trabecular and cortical bone microarchitecture at 3 and 5 months, when muscle hypertrophy was observed. The TgIGF1 males showed improvements in cortical bone parameters during aging, when muscle loss was greater than in WT males. The *unloading* was more harmful to the bones of TgIGF1 females compared to WT females, while the muscle of TgIGF1 and WT females responded similarly to *unloading*. These results suggest that: (i) the muscle of males is more sensitive to the hypertrophic effects of local IGF-1 than that of females; (ii) the higher bone growth in TgIGF1 males may be due to the greater mechanical stress and/or paracrine actions of the muscular IGF-1; (iii) the bone improvements presented by the TgIGF1 females seem to be the result of the greater mechanical stress due to muscle hypertrophy; (iv) IGF-1 derived from muscle may have had a positive and paracrine effect on cortical bone parameters of TgIGF1 mice during aging; (v) IGF-1 of muscle origin depends on muscle contraction and/or greater mechanical stress to exert its anabolic actions on muscle cells.

Descriptors: Bone and bones; Muscle; Insulin-like growth factor I; Stress, mechanical; Hindlimb suspension; Computed microtomography.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Interação músculo-osso

Os sistemas muscular e esquelético são historicamente reconhecidos pelas relações de proximidade e função. Podemos afirmar que ossos e músculos esqueléticos se correlacionam embriologicamente, anatomicamente e mecanicamente. Estudos recentes têm sugerido uma possível interação genética e molecular entre ambos (AVIN et al., 2015).

Acredita-se que a correlação e interação músculo-osso ocorram desde o desenvolvimento embrionário, uma vez que células ósseas e musculares surgem de um mesmo precursor mesenquimal. Nesse sentido, estudos sugerem que ambos os tecidos possam compartilhar determinantes genéticos (AVIN et al., 2015). Tem-se postulado que a contração muscular contribui para o crescimento e desenvolvimento do esqueleto durante o desenvolvimento fetal, o que também ocorre durante o desenvolvimento esquelético pós-natal (BROTTO; JOHNSON, 2014; LAND; SCHOENAU, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008). Sharir e colaboradores demonstraram que ossos de camundongos em desenvolvimento são expostos a forças musculares intrauterinas significativas, que determinam o formato circunferencial dos ossos apendiculares e ainda promovem aceleração do crescimento ósseo (SHARIR et al., 2011).

Anatomicamente, podemos afirmar que a maioria dos músculos esqueléticos tem fixação nos ossos, havendo assim uma ligação física direta entre ambos. Sabe-se que, na junção do tendão muscular com o osso, o tecido superficial do tendão é contínuo com o perióstio, enquanto suas fibras colágenas mais profundas penetram no osso e fundem-se com o colágeno da matriz extracelular óssea. Essa rede contínua e resistente de tecido conjuntivo é essencial para o funcionamento em conjunto dos sistemas muscular e esquelético (TORTORA; NIELSEN, 2019).

Uma das mais claras interações entre ossos e músculos é a mecânica. Em 1867, Meyer e Gulman já afirmavam que o padrão trabecular coincidia com as

rotas de força (teoria das trajetórias). Por volta de 1892, Julius Wolff e outros perceberam que as cargas mecânicas podem afetar a arquitetura óssea. Foi, então, proposta a lei de Wolff, que postula que as forças impostas aos ossos geram modificações em seu tamanho, forma e densidade, ou seja, que o tecido ósseo se adapta à demanda mecânica. Para Wolff, quando o ambiente mecânico em um osso é alterado por trauma, patologia ou mudança no modo de vida, o remodelamento funcional reorienta as trabéculas ósseas de forma que elas se alinhem com as novas trajetórias de tensão principal (ROESLER, 2006; WILLIAMS et al., 1995).

Mais tarde, Harold Frost buscou uma explicação matemática precisa do fenômeno ósseo adaptativo. Através de seus estudos, sugeriu que as forças aplicadas aos ossos eram forças originárias especialmente da contração muscular e propôs uma teoria que postula que a resposta do tecido ósseo ao ambiente mecânico é controlada por um “mecanostato”, que tem como objetivo manter a deformação do tecido ósseo em um nível ótimo, alterando, para tanto, a estrutura desse tecido homeostaticamente (FROST, 1987). Essa teoria mecanostática de Frost, como qualquer sistema de controle homeostático, sugere que há vários componentes independentes, incluindo (i) um estímulo, (ii) sensores capazes de detectá-lo, e (iii) um mecanismo efetor capaz de trazer o sistema de volta à homeostase. Essa teoria postula que vários limiares mecânicos determinam se a massa óssea deve ser adicionada ou retirada do esqueleto. Assim sendo, abaixo de certo limiar de estresse mecânico, o osso é reabsorvido, ou seja, o ‘excesso’ de osso é retirado. Enquanto que, acima de um outro limiar mecânico, a formação óssea ocorre para aumentar a massa e, conseqüentemente, a resistência do tecido ósseo (FROST, 1987, 2003)

Mais recentemente, uma série de evidências demonstrou que a deformação do tecido ósseo, decorrente da sua compressão, tração ou torção, faz com que o líquido intersticial se movimente dentro da rede de canaliculos que contém os processos dendríticos dos osteócitos. Esse fluxo de fluido (“fluid flow”) é detectado pelos osteócitos que, por sua vez, liberam sinais moleculares que irão recrutar e induzir os osteoclastos e osteoblastos a modelarem ou remodelarem o tecido ósseo de acordo com a demanda mecânica,

configurando, assim, um mecanismo de mecanotransdução (HU et al., 2015; KLEIN-NULEND et al., 2013).

A lei de Wolff e a teoria de Frost são sustentadas quando observamos, por exemplo, que o exercício físico de alto impacto promove aumento de massa muscular e, conseqüentemente, aumento de massa óssea, reduzindo o risco de osteoporose (ANDREOLI et al., 2001). Astronautas, por outro lado, demonstram perda de massa muscular e óssea durante viagens espaciais (BALDWIN et al., 2013; KEYAK et al., 2009; NAGARAJA; RISIN, 2013). Já as distrofias musculares, como exemplo, a de Duchenne, além de levarem à degeneração muscular, ocasionam diminuição da densidade mineral óssea, levando à alta incidência de fraturas ósseas (MORGENROTH; HACHE; CLEMENS, 2012).

Além desses exemplos em humanos, modelos animais demonstram que forças provenientes dos músculos, agem, de fato, diretamente sobre os ossos. Algumas técnicas, tais como a suspensão de cauda (que retira o contato dos membros posteriores de um animal com o solo) e a injeção intramuscular de toxina botulínica (que paralisa músculos), são realizadas em animais para anular ou minimizar o estresse mecânico proveniente da contração muscular. Utilizando-se a técnica de suspensão de cauda, geralmente, observa-se redução da massa óssea nos membros posteriores, com diminuição da formação e aumento da reabsorção óssea, após 10 a 14 dias de suspensão (AVIN et al., 2015; BASSO; HEERSCHKE, 2006; ISHIJIMA et al., 2001; NAGARAJA; RISIN, 2013). A injeção de toxina botulínica em animais resulta em rápida perda de massa muscular, seguida de redução de osso trabecular e cortical, sendo que, sete dias após a injeção, é possível observar elevado número de osteoclastos e aumento da expressão do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANK-L), um fator expresso em osteoblastos que ativa a osteoclastogênese e atividade osteoclástica (ALIPRANTIS et al., 2012; AVIN et al., 2015).

Em suma, os estudos descritos demonstram que o osso ajusta a sua massa e arquitetura de acordo com a demanda mecânica, sendo que grande parte dessa demanda é imposta pela contração muscular (SARTORI; SANDRI, 2015; SWIFT et al., 2010). De acordo com essa reconhecida interação

mecânica, espera-se que o declínio da massa e função musculares leve a uma redução da demanda mecânica, com consequente redução da massa óssea. Entretanto, observa-se que as alterações de massa muscular não são rigorosamente acompanhadas de redução de massa óssea e vice-versa, o que sugere que também deva haver um acoplamento bioquímico entre osso e músculo, além do acoplamento mecânico (AVIN et al., 2015).

Estudos têm demonstrado que mesmo sob condições onde as forças mecânicas substanciais não estão sendo produzidas, os músculos parecem ter a capacidade bioquímica intrínseca de secretar fatores que estimulam o crescimento e o reparo ósseo. Harry e colaboradores, por exemplo, demonstraram que a cobertura de sítios de fratura exposta (em tíbias de camundongos), com retalhos de músculo esquelético, tem efeito superior no reparo da fratura do que a cobertura com retalhos de pele e fáscia muscular (HARRY et al., 2008). Mostrou-se, ainda, que a inserção de material semipermeável, que não permitia a migração celular, entre a camada muscular e o sítio de fratura de fêmur de ratos leva a um importante retardo na resolução da fratura (UTVÅG; GRUNDNES; REIKERÅS, 1998). Posteriormente, esse modelo foi refinado, utilizando-se membranas de nitrocelulose, com poros de tamanho variado, que permitiam a passagem de moléculas de 3.5 kDa a 50 kDa a passar do músculo ao osso e vice-versa, mas excluía a passagem de células. Independentemente do tamanho do poro, o reparo da fratura era prejudicado pela presença da membrana, o que sugere que o contato celular direto (célula-célula) é importante para facilitar o reparo de fraturas ósseas (KAUFMAN et al., 2008). Em conjunto, esses estudos sugerem que o músculo possa prover células para o sítio de fratura que, por sua vez, facilitam o reparo ósseo. Ao mesmo tempo, considera-se que sinais provenientes do sítio de fratura sejam necessários para recrutar essas células musculares. Assim sendo, esses experimentos não excluem a possibilidade de que fatores tróficos e/ou moléculas sinalizadoras provenientes das células musculares, ou mesmo ósseas, sejam requeridas para o reparo ósseo (BIKLE et al., 2015)

Atualmente, é bastante reconhecido que os ossos e músculos produzem fatores que são liberados na corrente sanguínea atuando em tecidos próximos

ou distantes, desempenhando, portanto, funções endócrinas (BROTTO; JOHNSON, 2014)

Nos últimos dezoito anos, uma série de estudos levou à construção do conceito de que os ossos atuam como órgãos endócrinos, uma vez que produzem pelos menos dois fatores, o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) e a osteocalcina, os quais são capazes de modificar o funcionamento de órgãos distantes. O FGF23, sintetizado principalmente pelos osteócitos, atua nos rins, estimulando a excreção de fosfato e suprimindo a síntese de vitamina D (QUARLES, 2012). A osteocalcina, produzida principalmente pelos osteoblastos, demonstra um importante papel no metabolismo energético, influenciando a produção de insulina pelas células β do pâncreas e a sensibilidade dos adipócitos à insulina (LEE et al., 2007; LEE; KARSENTY, 2008). Além desses fatores, o tecido ósseo produz uma série de fatores que atuam de forma autócrina ou parácrina na própria regulação da fisiologia óssea, tais como o RANK-L, já citado anteriormente; a osteoprotegerina (OPG) e esclerostina (BROTTO; JOHNSON, 2014).

O reconhecimento dos músculos esqueléticos como órgãos endócrinos e secretores ocorreu somente nas duas últimas décadas (KUREK et al., 1997). Uma série de estudos vem demonstrando que o músculo esquelético é um órgão secretor de citocinas e outros peptídeos, denominados miocinas, que têm ações autócrinas, parácrinas e endócrinas (PRATESI; TARANTINI; DI BARI, 2013). A primeira miocina identificada foi a miostatina, um membro da família TGF- β (*transforming growth factor* β), também conhecida como fator de crescimento e diferenciação 8 (GDF-8). A miostatina é um dos mais potentes inibidores da proliferação e hipertrofia das células musculares esqueléticas (MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997; PEDERSEN, 2013). Têm-se demonstrado que o treinamento de força ou exercícios aeróbicos atenuam a expressão de miostatina, o que parece mediar a hipertrofia muscular. De fato, demonstrou-se que a inativação do gene da miostatina (*Mstn*) em camundongos leva a um fenótipo de alta massa muscular (MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997). Viu-se que a deficiência de miostatina também aumenta a formação óssea, sendo postulado que provavelmente isto ocorra devido aos efeitos do estresse mecânico sobre o osso. Entretanto, um estudo recente

demonstrou que a miostatina também tem efeito direto em células da linhagem osteoclástica, acelerando a osteoclastogênese mediada pelo Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANK-L). Desta forma, esses estudos sugerem que a miostatina possa atuar na interação músculo-osso (DANKBAR et al., 2015).

Além da miostatina, sabe-se que o músculo esquelético é capaz de secretar outras miocinas. As interleucinas (IL) 7 e 15 são citocinas secretadas pelos músculos esqueléticos que também atuam no metabolismo ósseo. A IL 7 é considerada uma citocina osteoclástica, pois a sua hiperexpressão induzida por ovariectomia aumenta a reabsorção e diminui a formação óssea, enquanto que o aumento dos níveis de IL 15 na circulação sanguínea leva ao aumento de massa óssea (LI et al., 2019). A irisina, um fator produzido pelo músculo esquelético que é aumentado em resposta ao exercício físico, além de promover melhorias importantes na estrutura do osso cortical, induz ainda, a formação óssea *in vitro*, promovendo aumento da diferenciação de osteoblastos (COLAIANNI et al., 2014, 2016). Desta forma, esses estudos sugerem que as ILs 7 e 15 e a irisina, também possam ser possíveis fatores a atuarem na interação músculo-osso.

Assim como os músculos secretam fatores que atuam nos ossos, estes também secretam fatores que atuam nos músculos (LI et al., 2019). A osteocalcina, a proteína não colágena mais abundante da matriz extracelular óssea e sintetizada pelos osteoblastos, parece ser um desses fatores. Além de desempenhar um papel importante no metabolismo energético, demonstrou-se, recentemente, que atua no músculo esquelético através do receptor da osteocalcina (*Gprc6a*). Nesse sentido, foi observado que animais com deleção gênica de *Gprc6a* apresentam diminuição de massa muscular. Viu-se, ainda, que animais *knockouts* do gene da fosfatase tirosina (*Esp*), um inibidor da função da osteocalcina, apresentam aumento de massa muscular (LI et al., 2019). Além disso, sabe-se que a administração crônica de osteocalcina melhora a massa muscular em idosos (MERA et al., 2016). Camundongos deficientes de esclerostina, um fator secretado principalmente por osteócitos maduros, demonstram volume ósseo trabecular aumentado e diminuição de massa muscular, sugerindo assim que embora seja claro os efeitos nos dois

tecidos, a esclerostina parece atuar de forma antagônica (LI et al., 2019). A prostaglandina E2 (PGE₂) é secretada em grande escala pelos osteócitos (BONEWALD, 2019). Brotto e colaboradores demonstraram que o aumento de PGE₂, em resposta a tensão de cisalhamento do fluxo de fluido acelera, a proliferação de mioblastos e a diferenciação, sugerindo que a sinalização de PGE₂ do osso pode ser importante para a miogênese muscular (MO et al., 2012, 2015). Sendo assim, esses estudos sugerem que a osteocalcina, a esclerostina e o PGE₂ também podem ser possíveis fatores a atuarem na interação músculo-osso.

Além das miocinas, da osteocalcina, esclerostina e PGE₂, existem outros fatores que também têm potencial de mediar uma possível interação músculo-osso em função de serem expressos tanto no tecido ósseo quanto muscular, promovendo efeitos nesses dois tecidos. Dois exemplos são o IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) e as BMPs (*bone morphogenetic proteins*). O IGF-1 é um fator de crescimento que tem ações anabólicas tanto no tecido ósseo quanto muscular (BIKLE et al., 2015). Já as BMPs têm papel fundamental na formação óssea, mas também controlam a miogênese e manutenção da massa muscular no adulto (SARTORI; SANDRI, 2015).

Em suma, os estudos apresentados sugerem a existência de interações entre ossos e músculos, sendo a relação mecânica a mais evidente. Entretanto, uma grande questão que tem ganhado destaque nos últimos anos é se o músculo se comunica com o osso (e vice-versa) independentemente da influência mecânica. Nesse sentido, os estudos descritos nesta introdução sustentam a existência de possíveis interações celulares e moleculares (moléculas sinalizadoras ósseas e musculares), além da existência de uma possível interação hormonal entre músculo e osso, visto que ambos os tecidos são reconhecidos como órgãos endócrinos. Sendo assim, acredita-se que possam existir fatores de acoplamento entre as células musculares e ósseas, que participem do controle da morfofisiologia, tanto do tecido ósseo quanto muscular. Até o momento, nenhuma interação bioquímica e molecular concreta entre esses tecidos foi elucidada, sendo essa uma área de intensa investigação nos últimos anos.

1.2 Efeitos do IGF-1 no tecido ósseo

O hormônio somatotrópico ou de crescimento (GH) é produzido pela hipófise anterior e possui a capacidade de promover o crescimento de quase todos os tecidos do corpo humano. O GH leva o fígado e outros tecidos a realizarem a produção de pequenas proteínas conhecidas como somatomedinas ou fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), os quais promovem o crescimento dos tecidos. Dentre as somatomedinas descritas, possivelmente, a mais importante é a somatomedina C ou IGF-1 (GUYTON; HALL, 2006).

Em torno de 75% da produção de IGF-1 são provenientes do fígado, entretanto, outros tecidos também são capazes de produzir este fator, onde ações parácrinas e endócrinas podem ocorrer (BIKLE et al., 2015).

Sabe-se que os IGFs são sintetizados por osteoblastos, condrócitos e osteócitos e são depositados na matriz óssea, sendo o IGF-1 o tipo predominante no osso adulto (ZHAO et al., 2000). Por outro lado, sabe-se que o osso é um dos maiores órgãos-alvo de IGF-1, o qual é considerado essencial para o desenvolvimento e crescimento do esqueleto, como também para a manutenção da massa óssea pós-natal. (PERRINI et al., 2010).

Diversos estudos demonstram que o IGF-1 é fundamental para o crescimento ósseo pré e pós natal (SHINAR et al., 1993; ZHANG et al., 2002; ZHAO et al., 2000). Foi observado que embriões de camundongos deficientes de IGF-1 apresentam diminuição da mineralização óssea, redução da proliferação e diferenciação de condrócitos, além de aumento da apoptose de condrócitos na cartilagem de crescimento de ossos longos, ressaltando assim, a importância do IGF-1 para o desenvolvimento esquelético durante a vida fetal (WANG et al., 2006).

Estudos utilizando animais com inativação gênica global de IGF-1 revelaram um crescimento longitudinal ósseo e uma expansão periosteal prejudicados. Por outro lado, animais com inativação gênica do IGF-1 especificamente de origem hepática demonstraram redução de 75% nos níveis circulantes de IGF-1 e nenhuma alteração significativa no crescimento ósseo (SHENG et al., 2014). Em conjunto, esses achados sugerem que, apesar da

maior parte da produção de IGF-1 se originar do fígado, a produção local deste fator é mais importante para o tecido ósseo do que a hepática.

Um estudo demonstrou que camundongos com 4 semanas de idade, com inativação gênica de IGF-1 especificamente em osteócitos, apresentaram uma diminuição no comprimento longitudinal do fêmur em virtude da diminuição da espessura da lâmina epifisial e da sua zona hipertrófica, sugerindo assim, a importância do IGF-1 de origem osteocítica no crescimento ósseo pós-natal (SHENG et al., 2013).

Zhao e colaboradores demonstraram que animais que hiperexpressam IGF-1 em osteoblastos não apresentam aumento dos níveis séricos de IGF-1 ou do crescimento linear ósseo, mas apresentam aumentos na densidade mineral óssea. A análise histomorfométrica do fêmur distal demonstrou aumentos na taxa de formação óssea, no volume trabecular, e na ocupação das lacunas de osteócitos, sem aumento do número de osteoblastos e osteoclastos. Isso demonstra que o IGF-1 produzido localmente pelos osteoblastos exerce efeitos anabólicos primariamente aumentando a atividade das células osteoblásticas existentes (ZHAO et al., 2000). Assim sendo, o IGF-1 não é só importante para o crescimento ósseo, mas também para a regulação da formação óssea pós-natal.

Sabe-se que o IGF-1 também é essencial para a manutenção da massa óssea ao longo do envelhecimento. Foi demonstrado que a diminuição gradual da secreção de GH e IGF-1 a partir dos 30 anos de idade é acompanhada de diminuição na densidade mineral óssea e de atrasos na mineralização óssea, além de redução na diferenciação e proliferação de osteoblastos e aumento na apoptose de células osteoblásticas, induzindo assim, a osteoporose e, consequentemente, o aumento do risco de fraturas (PERRINI et al., 2010).

Estudos demonstram que o excesso de carga mecânica sob os ossos aumenta a expressão de IGF-1 em osteócitos e osteoblastos (KUBOTA et al., 2013; LEAN et al., 1996; REIJNDERS et al., 2007). Considerando o fato de que o excesso ou falta de carga sob os ossos possuem impacto sobre o remodelamento ósseo e que este processo também é regulado pela sinalização de IGF-1, Kubota et al avaliaram a resposta do esqueleto à deficiência do receptor de IGF-1 em osteoblastos, utilizando animais com

inativação gênica do receptor de IGF-1 nesse tipo celular (*igf-1-1r^{-/-}*). Os autores observaram que os animais *igf-1-1r^{-/-}* apresentam diminuição de osso cortical e de formação óssea periosteal e endosteal, e uma maior perda de massa óssea em função da redução do estresse mecânico (*unloading*) do que os animais selvagens. Demonstraram, ainda, que na retomada do estresse mecânico, (*reloading*) a formação óssea periosteal não é recuperada. Desta forma, sugere-se que o receptor de IGF-1 em osteoblastos maduros exerce um papel crucial na formação periosteal óssea do esqueleto em resposta à carga mecânica (KUBOTA et al., 2013).

1.3 Efeitos do IGF-1 no tecido muscular

O tecido muscular esquelético é composto por células musculares alongadas, cilíndricas e multinucleadas, referidas como fibras musculares (ROSS; PAWLINA, 2008). Sabe-se que, para a formação destas fibras musculares durante o desenvolvimento embrionário, ocorre a proliferação e diferenciação de mioblastos, sendo que ambos os processos são mediados por IGF-1 (FLORINI; EWTON; COOLICAN, 1996; DUAN; REN; GAO, 2010; BIKLE et al., 2015). Os IGFs também desempenham papéis importantes na hipertrofia e regeneração muscular pós-natal. Demonstrou-se que, após lesão muscular aguda, há aumento da produção local de IGF-1, sem alterações nos níveis circulantes, o que sugere que ações autócrinas ou parácrinas de IGF-1 ocorrem durante a regeneração muscular esquelética (BAMMAN et al., 2001; DUAN; REN; GAO, 2010).

As células satélite são encontradas na periferia da fibra muscular, sendo importantes para crescimento e regeneração muscular (TORTORA; NIELSEN, 2019). Estudos demonstram que o IGF-1 promove a proliferação e diferenciação das células satélite, permitindo-lhes fundir-se com fibras musculares existentes, e reparar regiões musculares danificadas (BARTON et al., 2002).

Estudos em animais demonstram que altos níveis de IGF-1, seja por infusão ou pelo aumento da expressão deste fator de crescimento em animais

transgênicos, promovem importante hipertrofia muscular esquelética (ADAMS; MCCUE, 1998; MUSARÒ et al., 2001).

Sabe-se que o IGF-1 também é essencial para a manutenção da massa muscular ao longo do envelhecimento, visto que a diminuição gradual da secreção de GH e IGF-1 a partir dos 30 anos de idade, além de afetar o metabolismo ósseo, também afeta o tecido muscular, promovendo um aumento da apoptose de miócitos e uma diminuição da área de secção transversal das fibras musculares, provocando, assim, uma perda progressiva na massa e força muscular (BARTON-DAVIS et al., 1998; PERRINI et al., 2010)

Barton-Davis e colaboradores demonstraram que a hiperexpressão de IGF-1 no músculo de ratos idosos preservou as características morfológicas e funcionais de seus músculos, os quais se assemelharam aos músculos de ratos adultos jovens. Os autores sugeriram que tais características ocorreram devido à melhora da regeneração muscular em função da ativação de células satélite pelo IGF-1 secretado pelas fibras musculares. Isso demonstra a importância de tal fator para a prevenção da perda muscular promovida pelo envelhecimento (BARTON-DAVIS et al., 1998).

Estudos revelam, ainda, o potencial terapêutico de IGF-1 em modelos animais de doenças neuromusculares, sendo que a hiperexpressão ou o tratamento crônico com este fator de crescimento foram capazes de melhorar o dano muscular observado na distrofia muscular e na esclerose lateral amiotrófica (BARTON-DAVIS et al., 1998; SCICCHITANO; RIZZUTO; MUSARÒ, 2009).

Estudos com roedores demonstraram a importância da produção local do IGF-1 para a manutenção da massa muscular esquelética, sendo observada uma clara hipertrofia muscular em roedores que apresentaram hiperexpressão generalizada de IGF-1 em fibra muscular esquelética (BANU; WANG; KALU, 2003; BARTON-DAVIS et al., 1998; COLEMAN et al., 1995). Musaro e colaboradores criaram um modelo animal de camundongos que hiperexpressam IGF-1 preferencialmente em fibras de contração rápida (MLC/mlgf-1). A hipertrofia muscular nestes animais já é observada a partir dos 10 dias de idade e se torna ainda mais evidente com o passar da idade. Aos 6 meses de idade, é possível observar um aumento no peso úmido dos músculos

quadríceps femoral, tríceps braquial, gastrocnêmio e extensor longo dos dedos, sendo este último, acompanhado por um aumento significativo de força muscular. Viu-se que este aumento de massa muscular foi acompanhado por aumento da área de secção transversal das fibras musculares e por aumento do diâmetro das fibras de contração rápida (MUSARÒ et al., 2001). Vale ser dito que os animais MLC/mlgf-1 não apresentaram aumentos significativos nas quantidades de gordura corporal ou hipertrofia cardíaca, sugerindo que não ocorreram perturbações sistêmicas nesses animais (MUSARÒ et al., 2001).

Apesar dos animais MLC/mlgf-1 apresentarem hipertrofia muscular, eles não se mostraram menos responsivos à perda de massa muscular induzida pelo desuso (PIERNO et al., 2014). Pierno e colaboradores induziram o desuso através da suspensão de cauda dos animais MLC/mlgf-1, para retirar a descarga de peso das patas traseiras (*hindlimb unloading*). Surpreendentemente, observaram que o desuso causou uma maior redução de peso corporal nos animais MLC/mlgf-1 do que nos animais selvagens. Essa redução de peso corporal foi acompanhada por diminuição significativa de massa muscular do gastrocnêmio, sóleo e tibial anterior, bem como redução da área de secção transversal e do diâmetro das fibras musculares. Assim sendo, apesar da hiperexpressão de IGF-1 causar hipertrofia muscular esquelética, ela não é capaz de reverter a atrofia muscular decorrente do desuso muscular. Por outro lado, parâmetros funcionais que geralmente se apresentam alterados em condições de desuso, incluindo propriedades musculares elétricas e contráteis, foram significativamente melhorados pela hiperexpressão de IGF-1 nos músculos (PIERNO et al., 2014). Sendo assim, esses estudos, em conjunto, sugerem que o IGF-1 de origem muscular possa ser um fator importante a atuar na melhoria da massa muscular na senescência e na atenuação da fragilidade muscular relacionada ao desuso muscular (MUSARÒ et al., 2001; PIERNO et al., 2014).

1.4. O IGF-I como candidato a mediador da interação músculo-osso

Há mais de uma década, estudos vêm sugerindo possíveis interações músculo-osso via IGF-1. Alzghoul e colaboradores verificaram que a

eletroporação e a expressão ectópica de IGF-1 dentro do músculo gastrocnêmio e sóleo promoveram hipertrofia muscular e inibiram parâmetros de osteopenia na tíbia e fíbula associados com a redução de carga mecânica (*unloading*) no membro posterior. Isso sugere que os fatores de crescimento sintetizados no músculo possam atuar no osso (ALZGHOUL et al., 2004).

Somando-se esses achados aos conhecidos efeitos do IGF-1 nos tecidos ósseo e muscular (relatados em tópicos anteriores), levanta-se a hipótese de que o IGF-1 possa ser um forte candidato a atuar, de forma parácrina, na interação músculo-osso (KAJI, 2016; BIKLE et al., 2015; DAVIS et al., 2015; KAJI, 2014; PERRINI et al., 2010).

Modelos animais bastante interessantes para se investigar possíveis interações músculo-osso via IGF-1 são camundongos que hiperexpressam esse fator no músculo esquelético. Kalu et al (BANU; WANG; KALU, 2003) avaliaram os ossos de camundongos machos que hiperexpressam IGF-1 em fibras musculares esqueléticas (hIGF-1), com o objetivo de determinar os efeitos de uma massa muscular aumentada no osso. Esses autores observaram que os camundongos transgênicos heterozigotos apresentavam maior peso corporal, peso muscular e área muscular quando comparados aos camundongos selvagens. Essas alterações musculares foram acompanhadas por maior peso e comprimento da tíbia e fêmur, e por aumentos na área, conteúdo mineral, densidade mineral e espessura do osso cortical da diáfise do fêmur e tíbia, além de aumentos no perímetro periosteal. Somando-se a isso, observaram aumentos na área de osso trabecular e na área óssea total da metáfise distal do fêmur, sem aumentos no conteúdo e na densidade mineral óssea. Com esses achados, os autores concluíram que a massa óssea aumentada nos animais que hiperexpressam IGF-1 está associada com ossos maiores e com efeitos mais importantes no osso puramente cortical. Nesse estudo, entretanto, não foi considerada uma possível interação músculo-osso via IGF-1 muscular.

Um outro modelo de camundongos que hiperexpressam IGF-1 nos músculos esqueléticos são os camundongos MLC/mlgf-1. Como já comentado anteriormente, esses animais hiperexpressam IGF-1 mais especificamente nos músculos com predominância de fibras de contração rápida e apresentam

hipertrofia muscular a partir dos 10 dias de idade, o que, por sua vez, se torna ainda mais evidente com o passar da idade (MUSARÒ et al., 2001). A avaliação do fenótipo ósseo e muscular desses animais poderá contribuir para o entendimento de um possível papel do IGF-1 de origem muscular no osso. Nesse sentido, algumas perguntas são levantadas: Os animais transgênicos têm maior massa óssea ao longo da vida? A hiperexpressão de IGF-1 muscular aumenta o pico de massa óssea e/ou limita a perda óssea que ocorre em função da idade? Os animais MLC/mlgf-1 são resistentes à perda de massa muscular e óssea que ocorre na retirada de carga mecânica (*unloading*) das patas traseiras? Os tecidos ósseo e muscular apresentam as mesmas respostas à hiperexpressão de IGF-1 em camundongos fêmeas e machos? As respostas a essas questões deverão contribuir para o entendimento de um possível papel do IGF-1 de origem muscular na regulação da morfofisiologia óssea e, portanto, na interação músculo-osso.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças músculo-esqueléticas são a causa mais comum de debilidades crônicas ao redor do mundo (CONNELLY; SUPANGAN, 2006; CONNELLY; WOOLF; BROOKS, 2006). A perda de massa óssea e a atrofia muscular representam grandes problemas que acometem indivíduos imobilizados, indivíduos submetidos a microgravidade e a população idosa, levando, assim, a uma maior propensão para quedas e fraturas, aumento da morbidade e mortalidade (MITCHELL et al., 2012; BIKLE et al., 2015).

A osteoporose leva a um importante aumento do risco de fraturas, bem como a sarcopenia, uma vez que resulta em baixo equilíbrio, elevando o risco de quedas. Desta forma, a combinação de osteoporose e sarcopenia, potencializa o risco de fraturas (BONEWALD et al., 2013).

Sendo assim, um melhor entendimento de como prevenir e tratar a perda de massa óssea e muscular em função da idade, desuso e doenças se faz extremamente necessário.

Para tanto, é importante que entendamos quais mecanismos são responsáveis pela sincronização e acoplamento das massas ósseas e muscular. Como é bem sabido, essas massas apresentam alta correlação ao longo da vida, tanto em função da idade como em função do estresse mecânico e de doenças. Entretanto, apesar de ser evidente que esse acoplamento exista, os seus mecanismos são praticamente desconhecidos e apenas nos últimos anos começaram a ser investigados.

Dessa forma, a investigação de um possível papel do IGF-1 de origem muscular no esqueleto poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela interação músculo-osso e, a longo prazo, para o desenvolvimento de terapias mais eficazes de prevenção e tratamento da perda de massa óssea e muscular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se o IGF-1 que tem origem no músculo esquelético tem efeito na massa, microarquitetura e resistência ósseas.

3.2 Objetivos específicos

- a- Caracterizar o fenótipo esquelético (massa, microarquitetura e resistência ósseas) de camundongos fêmeas e machos transgênicos que hiperexpressam IGF-1 em fibras musculares esqueléticas de contração rápida (camundongos TgIGF1), do 1º mês ao 13º mês de vida dos animais;
- b- Avaliar o impacto da retirada da descarga de peso (*unloading*) sobre a massa óssea e muscular dos membros posteriores dos camundongos TgIGF1.

4 MÉTODOS

4.1 Uso e manuseio de animais

Todos os protocolos aplicados ao uso e manuseio de animais estão de acordo com os termos estabelecidos pelos Comitês de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (nº de protocolo 104/2016) e da Faculdade de medicina (nº de protocolo 114/16) da Universidade de São Paulo.

4.1.1 Animais modificados geneticamente

Camundongos transgênicos TgMLC/mlgf-1 que hiperexpressam IGF-1 em fibras musculares de contração rápida (TgIGF1) foram gerados em background FVB como previamente descrito (MUSARÒ et al., 2001). Esses animais foram trazidos ao Brasil pelo Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot, Professor Titular do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da USP, com quem estabelecemos colaboração para a realização deste estudo. Foram estudados camundongos machos e fêmeas TgIGF1 e os seus controles selvagens (FVB) com 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 meses de idade.

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas sob o ciclo/escuro de 12h/12h, com acesso à água e a ração *ad libitum*.

4.1.2 Técnica de suspensão de cauda

Esta técnica foi utilizada para retirar a descarga de peso corporal das patas posteriores dos camundongos, ao que nos referiremos como *unloading* neste estudo. A técnica consiste em suspender a parte posterior do corpo do animal, para retirar o contato das suas patas traseiras com o solo, através de um cabo conectado à base da sua cauda, através de fitas adesivas, em uma

extremidade; e conectado ao teto da gaiola, por ganchos, na outra extremidade. O complexo cauda-cabo-gancho-teto permite que somente as extremidades dianteiras do animal toquem o piso da gaiola. No presente estudo, a cauda foi suspensa de forma que o grau entre a superfície do piso e o eixo longitudinal do corpo do animal fosse de 30° (grau de suspensão = 30°). A estrutura permitiu que os animais suspensos tivessem liberdade para caminhar usando suas extremidades dianteiras, permitindo, dessa forma, a locomoção, obtenção de água e comida (Fig.1). Camundongos TgIGF1 e selvagens fêmeas e machos de 4 meses e meio de idade foram submetidos a esta técnica por 14 dias consecutivos.

Para a realização da técnica, estabelecemos uma colaboração com o grupo do Prof. Dr. Rui Curi, professor titular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB – USP. Todo o material necessário para a suspensão de cauda foi cedido pelo grupo do Prof. Rui e todas as instruções necessárias para a realização dos experimentos foram fornecidas pelo Dr. Gabriel Nasri Marzuca Nassr, Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de La Frontera, Chile, e ex-aluno de doutorado do Prof. Rui. O Prof. Gabriel implementou o modelo de suspensão de cauda no ICB e o utilizou durante todo o seu doutorado (MARZUCA-NASSR et al., 2016). Vale dizer que essa técnica é amplamente utilizada por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo (CUNNINGHAM et al., 2018; MAUREL et al., 2016; PIERNO et al., 2014; FERREIRA; CRISSEY; BROWN, 2011; SAKATA et al., 1999).

Figura 1 - Foto dos camundongos fêmeas em suspensão de cauda.

4.1.3 Grupos experimentais

Em uma primeira etapa do estudo, foi feita a caracterização do fenótipo ósseo e muscular dos animais. Para tanto, 51 camundongos fêmeas selvagens (Selv), 52 camundongos fêmeas transgênicos (TgIGF1), 44 camundongos machos selvagens e 42 camundongos machos transgênicos foram agrupados em função das seguintes idades: 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 meses de idade, sendo utilizados de 5 a 9 animais por idade.

Em uma segunda etapa do estudo, foi avaliado o impacto do *unloading* no tecido ósseo e muscular dos membros posteriores dos animais. Para tanto, camundongos machos e fêmeas foram divididos em: **Selv controle:** camundongos não suspensos (n=5-6); **Selv suspenso:** camundongos submetidos à suspensão de cauda (n=6); **TgIGF1 controle** (n=5-8); **TgIGF1 suspenso** (n=5-9). As tabelas 1 e 2 resumizam os grupos de animais utilizados.

TABELA 1. Grupos experimentais dos animais selvagens e TgIGF1.

Idade (meses) Grupos	1		3		5		7		9		11		13	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Selv	8	5	6	6	5	7	7	7	9	7	9	5	7	7
TgIGF1	9	5	6	5	6	6	8	5	7	6	9	6	6	9

Selv.: Selvagens. **TgIGF1:** Transgênicos. **F** – Fêmea. **M** – Macho. n=5-9.

TABELA 2. Grupos experimentais dos animais selvagens e **TgIGF1** controles e submetidos à suspensão de cauda (*unloading*)

Idade (meses) Grupos	5 meses	
	F	M
Selv controle	6	5
Selv suspenso	6	6
TG controle	8	5
TG suspenso	9	5

Selv: Selvagem. F – Fêmea. M – Macho. n=5-9.

Logo após o sacrifício, tecidos e órgãos foram coletados para as análises descritas a seguir.

4.2 Eutanásia dos animais e coleta de amostras

Os camundongos foram eutanasiados por exposição a dióxido de carbono (CO₂) e, em seguida, o sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa e agulha heparinizada com 10 µl de heparina (liquemine 25.000 µl/5ml). O sangue coletado foi incubado a 37 °C, por 10 minutos, e em seguida centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente (TA). O soro foi isolado e imediatamente congelado para posterior análise se necessário.

Os músculos tibial anterior e quadríceps direito foram coletados, pesados em balança analítica de precisão (Denver Instrument M-220D) para aferição de massa úmida, em seguida foram seccionados transversalmente e colocados em isopentano resfriado por 60 (tibial anterior) e 90 (quadríceps) minutos. Em seguida, foram congelados para posterior análise. A quinta vértebra lombar (L5) e o fêmur, a tíbia, o úmero e o rádio direitos foram coletados, dissecados e armazenados em solução salina 0,9% e, em seguida, congelados.

4.3 Área de secção transversal das fibras musculares através da ATPase

Logo após o sacrifício dos animais, foram coletados os músculos quadríceps femoral e tibial anterior direitos, que após pesados, foram seccionados transversalmente e colocados em isopentano resfriado por 60 (tibial anterior) e 90 (quadríceps) minutos sendo em seguida congelados em -80° C. Para processamento, os músculos (congelados) foram cortados em secções transversais de 10 µm em criostato (CM1850 UV; Leica, Nussloch, Germany). Os cortes foram pré-incubados em solução alcalina (10.31) e ácida (4.31) com intuito de verificar as diferenças de sensibilidade de pH da enzima ATPase presentes nos diferentes tipos de fibras encontrados nos músculos em questão. Em seguida, fotomicrografias dos cortes corados foram adquiridos no microscópio Zeiss e as imagens capturadas pelo programa Zen 2.3 lite. A área de secção transversal (AST) e a composição total relativa de cada tipo de fibra foram obtidas através do software de imagem Image Pro-Plus. O padrão de coloração do tipo de fibra do pH 10.31 (claras - fibras tipo I; escuras - fibras tipo II) foi comparado com o padrão de coloração reversa (claras – fibras tipo II; escuras - fibras tipo I) nos cortes corados no pH 4.31.

4.4 Comprimento corporal e comprimentos ósseos

Após o sacrifício, o comprimento corporal foi aferido em centímetros (cm), pela medida da distância entre a ponta do focinho até a base da cauda. Mediu-se, também, o comprimento do fêmur, tibia, úmero e rádio direitos e do corpo vertebral de L5 com um paquímetro eletrônico digital (Vonder).

4.5 Microtomografia computadorizada (µCT) do fêmur

Parâmetros em duas e três dimensões (2D e 3D, respectivamente) dos ossos foram obtidos através de um Microtomógrafo Skyscan 1174 (Desktop X-ray microtomograph), e analisados com o auxílio do programa CT-Analyser (versão 1.10, Skyscan, Artselaar, Bélgica). A região de interesse (*region of interest-ROI*) dos fêmures foi padronizada com base no comprimento do osso.

Para a análise de osso trabecular, inicialmente, o comprimento total de cada fêmur foi dividido em quatro partes iguais: 1ª, 2ª, 3ª e 4ª partes. Em seguida, o comprimento da 1ª parte foi dividido por 3, onde o terço proximal desta divisão foi selecionada para análise (ROI). Este procedimento foi adotado a fim de excluir a lâmina epifisial das análises e selecionar uma região onde há predomínio de osso trabecular (Fig. 2T).

Os parâmetros trabeculares analisados foram: volume trabecular (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número de trabéculas (Tb.N), fator do padrão trabecular ósseo (Tb.Pf), um índice de conectividade trabecular; índice do modelo estrutural (SMI), que indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas), o grau de anisotropia (DA) e a densidade mineral óssea (BMD).

O Tb.Pf é um índice de conectividade trabecular. Baixos índices de Tb.Pf indicam melhor conectividade da estrutura trabecular (HAHN et al., 1992).

O SMI indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas, em forma de placas). Este parâmetro é importante na análise da estrutura trabecular, uma vez que a deterioração do osso trabecular, em função do envelhecimento ou doença, é caracterizada pela conversão de trabéculas achatadas para cilíndricas. O predomínio de trabéculas cilíndricas resulta em um maior valor de SMI e em trabéculas menos resistentes ao estresse mecânico (HILDEBRAND; RÜEGSEGG, 1997).

O DA é a medida da simetria em 3 dimensões. No caso do osso, que é um material não contínuo, repleto de estruturas (trabéculas) orientadas em diferentes direções, a mensuração do DA reflete a capacidade de reagir diferentemente a cargas vindas de sentidos diferentes. Quanto menos simétrico o objeto, maior o DA. Com relação ao osso, quanto maior o DA (maior a assimetria), melhor será a sua resposta a diferentes forças mecânicas.

Para a análise do osso cortical do fêmur, os parâmetros foram obtidos e analisados com o mesmo aparelho e programa descritos anteriormente e, assim como no osso trabecular, a região de interesse (ROI) do osso cortical foi padronizada com base no comprimento do osso. Dessa forma, o comprimento total de cada fêmur foi dividido em quatro partes iguais: 1ª, 2ª, 3ª e 4ª partes. Em seguida, o comprimento da 2ª parte foi dividido por 3, onde o terço médio

desta divisão foi selecionada para análise (ROI). Este procedimento foi realizado a fim de adotar uma região onde há predominância de osso cortical no fêmur (Fig. 2C)

Os parâmetros em 2D do fêmur foram obtidos e analisados com o mesmo aparelho e programa descrito anteriormente.

Os parâmetros corticais analisados foram: Área total, delimitada pelo periósteo (Tt.Ar); perímetro do periósteo (Ps.Pm); área cortical (Ct.Ar); área medular (Ma.Ar); perímetro do endósteo (Ec.Pm); espessura cortical (Ct.Th); porosidade cortical (Po) e densidade mineral óssea (BMD).

Os parâmetros trabeculares e corticais (e as suas respectivas siglas), utilizados neste estudo, seguiram as diretrizes do *Journal of Bone and Mineral Research* e da *American Society for Bone and Mineral Research* (BOUXSEIN et al., 2010).

Figura 2 - Esquema de seleção das áreas de interesse. **T.** Osso trabecular. **C.** Osso cortical.

4.6 Teste biomecânico do fêmur

Parâmetros biomecânicos do fêmur direito foram obtidos pelo Ensaio de Flexão de Três Pontos (EFTP), realizado em um sistema para teste de materiais Instron, modelo 3344 (Instron Corporation, MA, USA). Durante o ensaio, as extremidades dos fêmures foram apoiadas em duas bigornas, sendo que a distância entre ambas variou conforme o tamanho dos ossos (comprimento do osso/2). Uma força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no ponto médio entre os dois apoios, no sentido ântero-

posterior no fêmur, por uma haste de extremidade triangular a uma velocidade constante de 05 mm/min até o momento de ruptura do osso (Fig. 3).

Figura 3 - Foto do osso no equipamento para a realização do teste de flexão de três pontos.

Para estabilizar o espécime ósseo, uma pré carga (5% da carga máxima média) foi aplicada ao osso antes do teste real. A força aplicada e o deslocamento da haste foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento (Bluehill lite, versão 2.25). Foram avaliados os seguintes parâmetros biomecânicos: Carga máxima (N), que corresponde à maior força aplicada durante o ensaio, referindo-se à força máxima à qual o osso é capaz de resistir; rigidez (N/mm), que corresponde à rigidez óssea, e a tenacidade (J), que é a energia necessária para fraturar o osso, refletindo a capacidade do osso de resistir a uma fratura.

4.7 Análise Estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios entre dois grupos de animais foi testada através do teste-t (Student t-test). Para comparações entre mais de dois grupos de animais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Para avaliar as variações dos parâmetros em função do tempo, utilizamos a regressão polinomial de segunda ordem. Para comparar essas variações entre os grupos, as curvas resultantes das regressões polinomiais foram comparadas entre si. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média (DP). As regressões polinomiais, as comparações entre as curvas, os demais testes estatísticos e a construção dos gráficos foram feitas utilizando o *software* Graphpad Prism 8.4.3.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do fenótipo músculo-esquelético de camundongos TgIGF1 fêmeas e machos

5.1.1 Massa corporal

As fêmeas TgIGF1 apresentaram massa corporal significativamente maior do que as fêmeas selvagens (entre 10% a 15%) aos 3, 5, 9 e 11 meses de idade (Fig. 4A). De maneira similar, os machos TgIGF1 apresentaram massa corporal significativamente maior do que os selvagens (entre 9% a 19%) aos 5, 9 e 13 meses de idade (Fig. 4B). Tanto para as fêmeas como para os machos, a curva de variação de massa corporal em função da idade foi similar entre os camundongos selvagens e transgênicos.

Figura 4 - Massa corporal dos camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv). (A) Fêmeas. (B) machos. Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=5-9$ por grupo). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ versus Selv. A linha pontilhada mostra a curva de variação da massa corporal em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1.

5.1.2 Massa muscular

Sabendo-se que os camundongos TgIGF1 machos apresentam hipertrofia em músculos com predominância de fibras de contração rápida a partir dos 10 dias de idade (MUSARO et al., 2001), avaliamos se há alterações na massa dos músculos quadríceps e tibial anterior das fêmeas TgIGF1. Observamos um aumento significativo na massa do músculo quadríceps aos 3 (23%), 5 (25%) e aos 9 (26%) meses de idade, como também um aumento significativo na massa do músculo tibial anterior aos 3 (25%), 5 (20%) e 11 (18%) meses de idade nas fêmeas TgIGF1 quando comparadas às fêmeas selvagens (Fig. 5A e C). Através da regressão polinomial de segunda ordem, pudemos observar que a curva de variação da massa muscular em função da idade difere significativamente entre os camundongos fêmeas Selv e TgIGF-1, tanto para o músculo quadríceps ($p < 0,0034$), quanto para o músculo tibial anterior (0,0064). Nota-se que a hiperexpressão de IGF-1 nas fibras musculares do tipo II leva a um maior pico de massa muscular, que tende a ser prematuro em comparação ao observado nas fêmeas selvagens, tanto para o quadríceps quanto para o tibial anterior. Por outro lado, a redução da massa muscular, que ocorre após o pico ser atingido, é mais acentuada nas fêmeas transgênicas do que nas fêmeas selvagens para os dois músculos.

Com relação aos machos, observamos diferenças ainda mais evidentes entre selvagens e transgênicos. Os machos TgIGF1 apresentaram maior massa no músculo quadríceps aos 3 (17%), 5 (30%), 7 (39%), 9 (32%) e aos 11 (52%) meses de idade; o que também foi observado no tibial anterior aos 5 (38%), 7 (35%), 9 (18%), 11 (28%) e 13 (36%) meses de idade em relação aos machos selvagens (Fig. 5B e D). Também de forma ainda mais evidente do que nas fêmeas, a curva de variação da massa muscular em função da idade difere significativamente entre os machos Selv e TgIGF-1, tanto para o músculo quadríceps ($p < 0,0001$), quanto para o músculo tibial anterior ($p < 0,0001$). Assim como nas fêmeas, a hiperexpressão de IGF-1 nas fibras musculares do tipo II leva a um maior pico e a uma redução (após o pico ser atingido) mais acentuada da massa muscular do quadríceps nos camundongos transgênicos do que nos camundongos selvagens. Já no músculo tibial anterior, a

hiperexpressão de IGF-1 nas fibras musculares do tipo II também promoveu um maior ganho de massa muscular, sendo que a mesma se manteve elevada até o final do estudo, quando os animais apresentavam 13 meses de idade. Esses dados sugerem que os músculos dos machos são mais sensíveis aos efeitos hipertróficos da hiperexpressão local de IGF-1 do que as fêmeas.

Figura 5 - Massa muscular dos camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv). (A e C) Fêmeas. (B e D) Machos. (A e B) Músculo quadríceps. (C e D) Músculo tibial anterior (C). As massas dos músculos quadríceps e tibial anterior foram expressas em g/comprimento (mm) do fêmur e tibia, respectivamente. Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=5-9 por grupo). $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação da massa muscular em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$).

5.1.3 Comprimento corporal

Não houve diferença significativa no comprimento corporal das fêmeas TgIGF1 quando comparadas às selvagens em nenhuma das idades avaliadas (Fig. 6A). Já os machos TgIGF1 apresentaram comprimento corporal maior do que os selvagens (6%) aos 9 meses de idade (Fig. 6B). Através da regressão polinomial de segunda ordem, observamos que, o padrão de crescimento corporal foi o mesmo entre as fêmeas selvagens e transgênicas. Por outro lado, a curva de crescimento corporal diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os machos selvagens e TgIGF1. Vale ainda observar que as fêmeas cresceram aproximadamente 1.6 cm e os machos 1.8 cm do 1º ao 13º mês.

Figura 6 - Comprimento corporal dos camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv). (A) Fêmeas. (B) machos. Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=5-9$ por grupo). $p > 0,05$ e $*p < 0,05$. As linhas pontilhadas mostram a curva de comprimento corporal em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença e duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 ($p < 0,05$).

5.1.4 Comprimentos ósseos

Surpreendentemente, o comprimento de todos os ossos analisados das fêmeas TgIGF1 se mostraram menores (entre 3% a 20%) do que aqueles das fêmeas selvagens no 1º mês de vida (Fig. 7). Entretanto, foi observado um maior comprimento da tíbia (Fig. 7B) nas fêmeas TgIGF1, em relação às selvagens, aos 9 (3%) e 11 (1%) meses de idade; como também do úmero (Fig. 7C) aos 11 meses de idade (2%). Já os machos TgIGF1, quando comparados aos selvagens, mostraram um maior comprimento do fêmur aos 5 (4%) e 7 (2%) meses de idade; da tíbia, aos 5 (3%), 7 (2%) e 13 (2%) meses de idade; e do úmero, aos 13 (3%) meses de idade (Fig. 8). Através da regressão polinomial de segunda ordem, notamos que a curva de crescimento ósseo em função da idade foi similar para os animais selvagens e transgênicos, tanto nas fêmeas como nos machos. Isso foi observado em todos os ossos investigados, com exceção da tíbia, onde houve um maior crescimento ósseo nos animais TgIGF1 quando comparados aos animais selvagens, tanto em machos como nas fêmeas.

Figura 7 - Comprimento dos ossos dos camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv) fêmeas. Comprimento do (A) fêmur, (B) tíbia, (C) úmero, (D) rádio e (E) quinta vértebra lombar (L5). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=5-9 por grupo). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação da massa muscular em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença e duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 (p < 0,05).

Figura 8 - Comprimento dos ossos dos camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv) machos. Comprimento do (A) fêmur, (B) tíbia, (C) úmero, (D) rádio e (E) quinta vértebra lombar (L5). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=5-9$ por grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação da massa muscular em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença e duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 ($p<0,0001$).

5.1.5 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur

No 1º mês de vida, observamos, através da microtomografia computadorizada em 3D da metáfise distal do fêmur, alterações negativas nos parâmetros ósseos trabeculares (Fig. 9), como diminuição significativa do BV/TV (15%), Tb.N (11%) e BMD (12%), e aumentos significativos da Tb.Sp (18%) e da porosidade (4%) nas fêmeas TgIGF1 quando comparados às fêmeas selvagens. Entretanto, nas idades posteriores, foram observadas melhorias nesses mesmos parâmetros ósseos, sendo observados maior BV/TV, aos 3 (52%) e 5 (38%) meses de idade; Tb.Th, aos 9 (8%) meses de idade; Tb.N, aos 3 (50%) e 5 (25%) meses de idade; DA, aos 9 (33%) meses de idade; e BMD, aos 5 (6%) meses de idade, nas fêmeas TgIGF1 em relação às selvagens. Ainda indicando melhorias, foram observados menor Tb.Sp, aos 3 (12%) meses de idade; Tb.Pf, aos 3 (29%) e 5 (24%) meses de idade; SMI, aos 3 (12%) e 5 (10%) meses de idade; e porosidade, aos 3 (19%) e 5 (3%) meses de idade nas fêmeas TgIGF1. A figura 10B ilustra as melhorias observadas nos animais TgIGF1 aos 5 meses de idade. Através da regressão polinomial de segunda ordem, observamos que a curva de variação dos parâmetros trabeculares em função da idade se mostrou diferente quanto à DA e porosidade, entre as fêmeas transgênicas e Selv. Quanto ao DA, pudemos observar uma menor queda em função da idade nos animais TgIGF1 em relação aos Selv (Fig. 9G). Por outro lado, foi observado um atraso no aumento da porosidade em função da idade nos animais TgIGF1 quando comparados aos animais selvagens (Fig. 9H).

Com relação aos machos, observamos que praticamente não houve diferenças significativas nos parâmetros trabeculares dos animais TgIGF1 quando comparados aos selvagens (Fig. 11). Entretanto, os animais TgIGF1 apresentaram um aumento de 7% na BMD aos 7 meses de idade e uma diminuição de 9% aos 13 meses de idade, quando comparados aos selvagens. Apesar de praticamente não existir diferenças significativas entre os camundongos transgênicos e selvagens machos, a curva de variação dos parâmetros trabeculares em função da idade foi ligeiramente, mas

estatisticamente diferente em BV/TV, Tb.N, porosidade e BMD. Essas diferenças foram observadas no início da curva, quando ocorre uma queda mais brusca de BV/TV e Tb.N dos animais TgIGF1, como também um aumento mais abrupto de porosidade quando comparado aos animais selvagens. Através da curva, ainda foi possível observar que, nos animais TgIGF1, o pico da BMD é atingido prematuramente, ocorrendo em seguida uma queda prematura quando comparados aos animais selvagens. De qualquer forma, as curvas de variação dos parâmetros trabeculares demonstram que esses parâmetros se comportam de maneira semelhante entre os animais transgênicos e selvagens ao longo do envelhecimento.

Figura 9 - Parâmetros de μCT do osso trabecular do fêmur de camundongos TgIGF1 e selvagens (Selv) fêmeas. (A) BV/TV (volume ósseo/volume trabecular), (B) Tb.Th (espessura trabecular), (C) Tb.Sp (separação entre as trabéculas) (D) Tb.N (número de trabéculas), (E) Tb.Pf (Fator de padrão do osso trabecular), (F) SMI (Índice de modelo estrutural), (G) DA (Grau de Anisotropia), (H) Porosidade e (I) BMD (Densidade Mineral Óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=5-9$ por grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação dos parâmetros em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença e duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 ($p<0,01$).

Figura 10 - Secção transversal do fêmur de camundongos fêmeas selvagens (Selv) e transgênicas (TgIGF1) obtidas através da microtomografia computadorizada. (A) Selv – 5 meses de idade. (B) TgIGF1 – 5 meses de idade.

Figura 11 - Parâmetros de μCT do osso trabecular do fêmur de camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv) machos. (A) BV/TV (volume ósseo/volume trabecular), (B) Tb.Th (espessura trabecular), (C) Tb.Sp (separação entre as trabéculas) (D) Tb.N (número de trabéculas), (E) Tb.Pf (Fator de padrão do osso trabecular), (F) SMI (Índice de modelo estrutural), (G) DA (Grau de Anisotropia), (H) Porosidade e (I) BMD (Densidade Mineral Óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=5-9$ por grupo). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação dos parâmetros em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença e duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 ($p < 0,05$).

5.1.6 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur

Através da microtomografia computadorizada em 2D da diáfise do fêmur (Fig. 12), observamos uma menor área total delimitada pelo perióstio (Tt.Ar), um menor perímetro do perióstio (Ps.Pm) e uma menor área de osso cortical (Ct.Ar) nas fêmeas transgênicas (13%, 5% e 13%, respectivamente) em relação às selvagens no 1º mês de vida. Por outro lado, observamos aumentos significativos na T.Ar (13%), Ps.Pm (6%), Ct.Ar (12%), perímetro do endóstio (Ec.Pm; 63%), área medular (Ma.Ar; 47%) e BMD (1%) aos 3 meses de idade. Observamos também aumentos significativos na Tt.Ar (8%), Ps.Pm (6%), Ct.Ar (8%) aos 5 meses de idade, e ainda aumentos significativos de Tt.Ar (12%) aos 9 meses de idade e Ps.Pm (8%) e área medular (Ma.Ar; 166%) aos 11 meses de idade, demonstrando, assim, melhorias nos parâmetros corticais ósseos aos 3, 5 e 11 meses de idade nos animais TgIGF1 quando comparados aos selvagens. As curvas de variação dos parâmetros corticais Tt.Ar, Ps.Pm e Ct.Ar em função da idade foram significativamente diferentes entre as fêmeas Selv e TgIGF1, sendo observado um aumento prematuro do Tt.Ar e Ct.Ar nos animais TgIGF1 quando comparados aos selvagens. Quanto ao Ps.Pm, observamos que se manteve estável nas fêmeas TgIGF1, enquanto que, nas selvagens, observa-se uma queda do primeiro ao quinto mês (Fig 12A, B e C). Apesar dessas diferenças, o comportamento dos parâmetros corticais ao longo da idade foi bastante similar entre as fêmeas Selv e transgênicas, especialmente entre os 5 e 13 meses de idade.

Com relação aos machos, observamos que os animais TgIGF1 (vs. selvagens) apresentam maior Ma.Ar (38%) e Ec.Pm (45%), aos 5 meses de idade; e maior Tt.Ar (7%) e Ct.Ar (7%), aos 7 meses de idade. Essas diferenças se tornaram mais evidentes aos 13 meses de idade, quando foi observado maior Tt.Ar (17%), Ps.Pm (12%) (Ct.Ar (17%), Ma.Ar (162%), Ec.Pm (162%) nos animais transgênicos quando comparados aos seus controles. A curva de variação dos parâmetros ósseos corticais em função da idade diferiu significativamente entre selvagens e TgIGF1. Foi observado um aumento gradual do Tt.Ar, Ps.Pm e Ct.Ar até os 13 meses de vida nos animais TgIGF1,

enquanto que, nos machos selvagens, esses parâmetros pouco variaram ao longo do envelhecimento. A Ma.Ar e Ec.Pm mostraram uma tendência a queda ao longo dos meses nos animais selvagens e TgIGF1, entretanto, esses parâmetros apresentaram elevação gradual entre o 11º e 13º mês apenas nos machos TgIGF1.

Figura 12 - Parâmetros de μ CT do osso cortical do fêmur de camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv) fêmeas. (A) Tt.Ar (área total), (B) Ps.Pm (perímetro do perióstio), (C) Ct.Ar (área da cortical), (D) Ct.Th (espessura da cortical), (E) Ma.Ar (área medular), (F) Ec.Pm (perímetro do endóstio) e (G) BMD (densidade mineral óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=5-9$ por grupo). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação dos parâmetros em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença e duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 ($p < 0,01$).

Figura 13 - Parâmetros de μ CT do osso cortical do fêmur de camundongos TgIGF1 e Selvagens (Selv) machos. (A) Tt.Ar (área total), (B) Ps.Pm (perímetro do periósteo), (C) Ct.Ar (área da cortical), (D) Ct.Th (espessura da cortical), (E) Ma.Ar (área medular), (F) Ec.Pm (perímetro do endósteo) e (G) BMD (densidade mineral óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=5-9 por grupo). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação dos parâmetros em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença e duas linhas demonstram haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1 (p<0,001 e p<0,0001).

5.1.7 Teste biomecânico do fêmur

A partir do teste de flexão de três pontos (Fig. 14), observamos menor carga máxima (103%) e rigidez (60%) no fêmur de camundongos fêmeas transgênicas de 1 mês de vida, mas uma maior tenacidade (78%) aos 11 meses de idade. A curva de variação dos parâmetros biomecânicos em função da idade também não diferiu entre as fêmeas Selv e TgIGF1. Entretanto, podemos observar que o pico de resistência óssea ocorre por volta do 7º mês de vida das fêmeas selvagens e transgênicas.

Figura 14 - Parâmetros biomecânicos do fêmur de camundongos TgIGF1 e selvagens (Selv) fêmeas. A análise foi feita através do teste de flexão de três pontos. **(A)** Carga máxima. **(B)** Rigidez. **(C)** Tenacidade óssea. Os valores são expressos como média ± DP (n=5-9 por grupo). $p > 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ versus Selv. As linhas pontilhadas mostram a curva de variação dos parâmetros em função da idade, determinada pela regressão polinomial de segunda ordem. Uma linha demonstra não haver diferença entre os animais Selv e TgIGF1.

5.2 Avaliação do impacto do *unloading* sobre a massa e estrutura ósseas de camundongos TgIGF1.

Para essa avaliação, selecionamos animais com 5 meses de idade, uma vez que, nesta idade, observamos as maiores diferenças entre os animais selvagens e transgênicos, tanto relacionados à massa óssea, quanto às massas corporal e muscular.

5.2.1 Massa corporal

Nota-se que o *unloading* não promoveu diferenças significativas na massa corporal dos animais selvagens e TgIGF1, tanto em fêmeas quanto em machos. Entretanto, observa-se uma tendência a diminuição da massa corporal em ambas as linhagens, após 3 a 14 dias em suspensão de cauda (Fig. 15).

Figura 15 - Efeito do *unloading* na massa corporal dos camundongos TgIGF1 e selvagens (Selv). (A e B) Fêmeas. (C e D) Machos. (A) Animais Selv controles (Selv-C) e suspensos (Selv-S). (B) Animais TgIGF1 controles (TgIGF1-C) e suspensos (TgIGF1-S). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP ($n=5-9$ por grupo). $p>0,05$.

5.2.2 Massa muscular

Foi avaliada a massa dos músculos quadríceps e tibial anterior dos animais selvagens e TgIGF1 controles e suspensos a fim de verificar o impacto do *unloading* nesse parâmetro. Com relação às fêmeas, observa-se uma menor massa nos músculos quadríceps e tibial anterior dos animais selvagens (14% e 13%, respectivamente) e TgIGF1 suspensos (18% e 14%, respectivamente) quando comparados aos seus controles (Fig. 16 A e B), o que demonstra que o *unloading* afetou de forma similar as fêmeas Selv e TgIGF1. Como esperado, a massa do quadríceps e tibial anterior nas fêmeas TgIGF1 controles mostrou-se maior do que a dos respectivos animais selvagens (26% e 24%, respectivamente), confirmando a hipertrofia muscular nas fêmeas transgênicas aos 5 meses de idade. Diferentemente das fêmeas, os camundongos machos se mostraram mais resistentes à perda de massa muscular induzida pela suspensão de cauda. Nos machos, observamos apenas uma tendência a diminuição da massa dos músculos quadríceps e tibial anterior nos animais selvagens suspensos quando comparados aos seus controles (Fig. 16 C e D). Nos machos transgênicos, a suspensão de cauda causou diminuição apenas na massa do músculo quadríceps (13%). De forma mais importante do que nas fêmeas, observamos maior massa do quadríceps e tibial anterior nos machos TgIGF1 controles do que nos respectivos animais selvagens (27 e 29%, respectivamente), o que corrobora os dados da caracterização do fenótipo músculo-esquelético (em função da idade) e reforça a ideia de que os músculos dos machos são mais sensíveis aos efeitos hipertróficos da hiperexpressão local de IGF-1 do que os músculos das fêmeas.

Figura 16 - Efeito do *unloading* na massa muscular dos camundongos TgIGF1 e selvagens (Selv). Camundongos (A e B) fêmeas e (C e D) machos foram submetidos ao *unloading* nas patas posteriores por suspensão de cauda por 14 dias. Massa dos músculos (A e C) quadríceps e (B e D) tibial anterior dos animais controles e suspensos. A massa do músculo quadríceps e tibial anterior foi expressa em g/comprimento do fêmur e tibia (mm), respectivamente. Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=5-9 por grupo). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus controle.

5.2.3 Área de secção transversal das fibras musculares

Para investigar os determinantes da maior massa muscular nos animais TgIGF1 (versus selvagens) e os determinantes da menor massa muscular nos animais suspensos, foi analisada a área de secção transversal das fibras dos músculos tibial anterior e quadríceps (Fig. 17 A-D). Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas, houve uma clara tendência a uma menor área de secção transversal nas fibras de ambos os músculos dos animais selvagens e transgênicos suspensos em relação aos controles (não suspensos), além de tendência a maior área de secção transversal nos animais TgIGF1 em relação aos selvagens (Fig. 17 e 18). Podemos observar, ainda, que não houve diferença na composição de fibras musculares entre os grupos estudados, sendo observada predominância de fibras do tipo II no m. quadríceps femoral como também de fibras tipo IIb, IIdb e IId no m. tibial anterior dos animais estudados (Fig. 17E e F).

Assim como nas fêmeas, a suspensão de cauda promoveu uma clara tendência a redução significativa na AST das fibras do músculo quadríceps e tibial anterior dos machos selvagens e transgênicos, entretanto, essas reduções não atingiram o limiar de significância (Fig. 19 e 20).

Com relação ao m. quadríceps femoral, foi observado uma maior AST das fibras do tipo II dos animais TgIGF1 controles quando comparados aos selvagens controles (54%, $p < 0,05$); já com relação às fibras do tipo I desse músculo, não foi possível a realização estatística devido ao fato de que nem todos os animais avaliados apresentaram esse tipo de fibra no material coletado. Com relação ao m. tibial anterior, apesar de não terem sido observados resultados significativos, foram observadas tendências que sugerem que as alterações observadas na massa muscular (Fig. 16) tenham ocorrido devido a alterações na AST das fibras musculares. A Fig. 19 demonstra ainda que não houve diferença na composição de fibras musculares entre os grupos estudados, sendo observada predominância de fibras do tipo II no m. quadríceps femoral como também de fibras tipo IIb, IIdb e IId no m. tibial anterior dos animais estudados.

Figura 17 - Efeito do *unloading* na área de secção transversal e composição das fibras musculares de camundongos fêmeas. Os animais foram submetidos ao *unloading* por 14 dias. Área de secção transversal das fibras musculares do tipo I (A) e do tipo II (B) do m. quadríceps femoral. (E) Composição de cada tipo de fibra do m. quadríceps femoral (tipo I e tipo II). Área de secção transversal das fibras tipo IIB (C) e IIdb/IId (D) do m. tibial anterior. (F) Composição de cada tipo de fibra do m. tibial anterior (tipo IIB e IIdb/IId). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=3 por grupo). $p>0,05$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$ versus controle.

Figura 18 - Fibras musculares em secção transversal (ATPase) dos camundongos fêmeas. Fibras do músculo quadríceps femoral dos animais selvagens controle (A) e suspenso (C) e dos animais TgIGF1 controle (B) e suspenso (D). Fibras do músculo tibial anterior dos animais selvagens controle (E) e suspenso (G) e dos animais TgIGF1 controle (F) e suspenso (H).

Figura 19 - Efeito do *unloading* na área de secção transversal e composição das fibras musculares de camundongos machos. Os animais foram submetidos ao *unloading* por 14 dias. Área de secção transversal das fibras musculares do tipo II (A) do m. quadríceps femoral. (D) Composição de cada tipo de fibra do m. quadríceps femoral (tipo I e tipo II). Área de secção transversal das fibras tipo IIB (B) e IIdb/IID (C) do m. tibial anterior. (E) Composição de cada tipo de fibra do m. tibial anterior (tipo IIB e IIdb/IID). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=3 por grupo). $p>0,05$, $p<0,05$ e $****p<0,0001$ versus controle.

Figura 20 - Fibras musculares em secção transversal (ATPase) dos camundongos machos. Fibras do músculo quadríceps femoral dos animais selvagens controle (A) e suspenso (C) e dos animais TgIGF1 controle (B) e suspenso (D). Fibras do músculo tibial anterior dos animais selvagens controle (E) e suspenso (G) e dos animais TgIGF1 controle (F) e suspenso (H).

5.2.4 Comprimento corporal

A suspensão de cauda (*unloading*) não afetou o comprimento corporal dos animais selvagens e TgIGF1 tanto das fêmeas como dos machos aos 5 meses de idade (Fig. 21).

Figura 21 - Comprimento corporal dos camundongos fêmeas e machos submetidos ao *unloading* por 14 dias. O comprimento corporal refere-se à medida linear desde o focinho até a base da cauda do animal. Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=5-9 por grupo). $p > 0,05$.

5.2.5 Comprimentos ósseos

Mais uma vez como nas fêmeas, a suspensão de cauda (*unloading*) não afetou os comprimentos ósseos dos machos selvagens e TgIGF1 aos 5 meses de idade, sendo observado apenas aumentos significativos do comprimento do fêmur (4%) e do úmero (3%) nos animais TgIGF1 controles quando comparados aos selvagens controles como observado em resultados anteriores (Fig. 8).

Figura 22 - Comprimento ósseo de camundongos fêmeas submetidos ao *unloading* por 14 dias. O Comprimento dos ossos foi medido da extremidade da epífise proximal a epífise distal através de um paquímetro. Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=6-9 por grupo).

Figura 23 - Comprimento ósseo de camundongos machos submetidos ao *unloading* por 14 dias. O Comprimento dos ossos foi medido da extremidade da epífise proximal a epífise distal através de um paquímetro. Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=5-6 por grupo).

5.2.6 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur

Através da microtomografia computadorizada em 3D da metáfise distal do fêmur, observamos que o *unloading* foi deletério para o osso trabecular das fêmeas transgênicas, enquanto pouco afetou o osso trabecular das fêmeas selvagens (Fig. 24). Os animais TgIGF1 suspensos demonstraram diminuições significativas de BV/TV (98%), Tb.Th (20%), Tb.N (58%) e BMD (22%), como também, aumentos significativos de Tb.Pf (46%) e Po (3%) quando comparados aos seus respectivos controles (TgIGF1 não suspensos). Já os animais selvagens suspensos apresentaram diminuição significativa apenas do Tb.Th (17%), quando comparados aos animais selvagens não suspensos. Por outro lado, os animais TgIGF1 controles (não suspensos) apresentaram maior BV/TV e menor porosidade do que os selvagens controles, conforme já observado em resultados anteriores (Fig. 9).

Figura 24 - Parâmetros de microtomografia computadorizada do osso trabecular dos camundongos fêmeas submetidos à suspensão de cauda por 14 dias. A análise foi feita na metáfise distal do fêmur de camundongos fêmeas selvagens (Selv) e TgIGF1 controles e suspensos. (A) BV/TV (volume ósseo/volume trabecular), (B) Tb.Th (espessura trabecular), (C) Tb.Sp (separação entre as trabéculas), (D) Tb.N (número de trabéculas) (E) Tb.Pf (Fator de padrão do osso trabecular), (F) SMI (Índice de modelo estrutural), (G) DA (Grau de Anisotropia), (H) Porosidade e (I) BMD (Densidade mineral óssea). Todos os valores são expressos como média ± DP (n=6-9 por grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus controle.

Figura 25 - Secção transversal do fêmur de camundongos fêmeas selvagens (Selv) e transgênicas (TgIGF1) submetidas ao *unloading* por 14 dias. As imagens foram obtidas através da microtomografia computadorizada. (A) Selv controle. (B) Selv suspenso. (C) TgIGF1 controle. (D) TgIGF1 suspenso.

5.2.7 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur

Através da microtomografia computadorizada em 2D da diáfise do fêmur, observamos que a suspensão de cauda (*unloading*) foi deletéria apenas para os camundongos fêmeas transgênicos, e não para as fêmeas selvagens. Sendo assim, foram observadas menor Tt.Ar (14%), Ct.Ar (13%) e Ct.Th (10%) (Fig. 26) nas fêmeas transgênicas suspensas em relação às não suspensas. Conforme já observado neste estudo (Fig. 12), os animais TgIGF1 controles apresentaram melhorias nos parâmetros corticais ósseos quando comparados aos selvagens controles.

Figura 26 - Parâmetros de microtomografia computadorizada do osso cortical dos camundongos fêmeas submetidos ao *unloading* por 14 dias. A análise foi feita na diáfise do fêmur de camundongos fêmeas selv e TgIGF1 controles e suspensos. (A) Tt.Ar (área perióstica), (B) Ps.Pm (perímetro do perióstio), (C) Ct.Ar (área da cortical), (D) Ct.Th (espessura da cortical), (E) Ma.Ar (área medular), (F) Ec.Pm (perímetro do endóstio), (G) Po (porosidade) e (H) BMD (densidade mineral óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=6-9 por grupo). $p>0,05$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$ versus controle.

5.2.8 Teste biomecânico do fêmur

Através do teste de flexão de três pontos, observamos que o *unloading* não afetou a resistência óssea a fraturas (observada através da carga máxima e tenacidade) e a rigidez óssea, tanto nos animais selvagens quanto transgênicos, apesar de uma tendência a efeitos deletérios nos animais selvagens (Fig. 27). Pudemos, ainda, observar que os animais transgênicos suspensos e não suspensos apresentaram maior resistência óssea (carga máxima) dos que os respectivos selvagens.

Figura 27 - Parâmetros biomecânicos do fêmur de camundongos fêmeas submetidos ao *unloading* por 14 dias. A análise foi feita através do teste de flexão de três pontos de camundongos fêmeas selv e TgIGF1 controles e suspensos. **(A)** Carga máxima. **(B)** Rigidez. **(C)** Tenacidade óssea. Os valores são expressos como média $\pm$ DP (n=6-9 por grupo). $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus Selv.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do fenótipo músculo-esquelético de camundongos fêmeas e machos transgênicos que hiperexpressam IGF-1 em fibras musculares esqueléticas de contração rápida (camundongos TgIGF1).

Além da conhecida interação mecânica entre o tecido ósseo e muscular, estudos recentes têm revelado evidências de que há interações bioquímicas e parácrinas entre células ósseas e musculares. Entretanto, os fatores envolvidos nessas interações não mecânicas são praticamente desconhecidos (KARSENTY; MERA, 2018; KAUFMAN et al., 2008).

Considerando-se a importância que o IGF-1 tem para a formação e desenvolvimento dos ossos e, ainda, a relevância que este mesmo fator possui no crescimento e regeneração muscular, estudos têm sugerido o IGF-1 como um forte candidato a atuar na interação músculo-osso não mecânica (BIKLE et al., 2015; KAWAO; KAJI, 2015). Nesse sentido, este trabalho tem como principal objetivo investigar se o IGF-1 de origem muscular tem efeito na massa, microarquitetura e resistência ósseas. Para tanto, inicialmente, realizamos a caracterização do fenótipo ósseo de camundongos TgIGF1, que hiperexpressam IGF-1 em fibras musculares esqueléticas de contração rápida (fibras do tipo II). Considerando-se a possibilidade de diferentes respostas do sistema músculo-esquelético à hiperexpressão muscular de IGF-1 entre machos e fêmeas, devido às suas conhecidas diferenças hormonais e estruturais, foram investigados inicialmente, neste estudo, camundongos dos dois sexos.

Além da caracterização do fenótipo ósseo, também investigamos o fenótipo dos músculos tibial anterior e quadríceps femoral, a fim de confirmar a hipertrofia muscular já demonstrada nos camundongos TgIGF1 machos (MUSARÒ et al., 2001), e verificar se essa característica também é encontrada em fêmeas, o que não havia sido investigado anteriormente.

Pudemos observar que as fêmeas TgIGF1 apresentam aumento da massa muscular (23 a 26%) aos 3, 5 e 9 meses de idade (Fig. 5A e C), o que sugere hipertrofia muscular. Entretanto, o aumento de massa muscular foi mais importante nos machos (17 a 52%), o que foi observado dos 3 aos 11 meses de idade (Fig. 5B e D). Musaro e colaboradores (MUSARÒ et al., 2001) observaram aumentos de massa muscular nos camundongos TgIGF1 machos aos 2, 6 e 20 meses de idade, acompanhados por maior AST e diâmetro transversal das fibras musculares do tipo II. No presente estudo, observamos uma clara tendência a maior AST nas fibras do tipo II, tanto do músculo quadríceps quanto do tibial anterior nos camundongos transgênicos fêmeas aos 5 meses de idade; enquanto que, nos machos, esse aumento foi significativo nas fibras do tipo II do músculo quadríceps. Em conjunto, esses achados sugerem que as fibras tipo II dos machos são mais sensíveis ao efeito hipertrófico da superexpressão de IGF-1 do que as fibras musculares das fêmeas.

A hipertrofia muscular observada neste estudo é, provavelmente, o fator determinante do aumento da massa corporal observada nos camundongos TgIGF1, machos e fêmeas (Fig. 4), uma vez que Musaro e colaboradores demonstraram que esses animais transgênicos não possuem aumentos de gordura corporal (MUSARÒ et al., 2001).

Para a caracterização do fenótipo ósseo dos camundongos TgIGF1 fêmeas e machos, inicialmente realizamos as medidas de comprimento corporal, seguida dos comprimentos longitudinais ósseos do fêmur, tibia, úmero, rádio e comprimento do corpo vertebral (L5), uma vez que é sabido que o IGF-1 possui efeitos importantes na lâmina epifisial (GOVONI et al., 2007a, 2007b; WANG et al., 2006, 2011). Não foram detectadas diferenças significativas no comprimento corporal das fêmeas TgIGF1 em relação às selvagens (Fig. 6A). Por outro lado, foi observado um aumento significativo no comprimento corporal, aos 9 meses de idade, e uma curva de crescimento ligeiramente mais acentuada nos machos transgênicos em relação aos selvagens (Fig. 6B). Observamos, ainda, aumentos significativos no comprimento longitudinal do fêmur e tibia aos 5, 7 e 13 meses de idade e do úmero aos 13 meses de idade nos animais TgIGF1 machos quando

comparados aos seus respectivos controles (Fig. 8), sendo que aumentos bem menos evidentes foram observados nos comprimentos ósseos das fêmeas (Fig. 7). Esses achados corroboram os achados de Banu e colaboradores, que também observaram aumentos do comprimento longitudinal ósseo do fêmur e da tíbia em camundongos machos que apresentavam hiperexpressão de IGF-1 muscular esquelético (h-IGF-1) (BANU; WANG; KALU, 2003). Os autores sugeriram que esses aumentos ocorreram devido à maior tensão aplicada sobre o osso pelos músculos hipertrofiados, mas não levantaram a hipótese de uma possível ação parácrina do IGF-1 de origem muscular no crescimento ósseo. Como já discutido, animais TgIGF1 machos apresentam uma hipertrofia muscular mais acentuada do que as fêmeas transgênicas, o que poderia justificar o maior crescimento longitudinal ósseo nos machos do que nas fêmeas. Entretanto, é possível que o IGF-1 de origem muscular tenha tido um efeito parácrino e positivo no crescimento longitudinal ósseo dos camundongos machos transgênicos, o que permanece para ser melhor investigado. Por outro lado, pudemos observar que o comprimento de L5 e de todos os ossos longos estudados (fêmur, tíbia, úmero e rádio) foram significativamente menores nos camundongos fêmeas transgênicos em relação às fêmeas selvagens no primeiro mês de vida. Nesta idade, a massa muscular não se mostrou diferente entre os camundongos Selv e TgIGF-1. Assim sendo, é possível que a hiperexpressão de IGF-1 tenha interferido negativamente no crescimento longitudinal dos ossos das fêmeas.

Com relação à microarquitetura óssea do fêmur, analisada por microtomografia computadorizada, pudemos observar melhorias nos parâmetros trabeculares (maior BV/TV, Tb.N e menor Tb.Pf, SMI e porosidade) e corticais (maior Tt.Ar, Ps.Pm, Ct.Ar) das fêmeas TgIGF1 em relação às fêmeas selvagens. Essas melhorias ocorreram predominantemente quando os animais apresentavam 3 e 5 meses, momento em que esses animais apresentaram hipertrofia do músculo quadríceps femoral, o que sugere que a hipertrofia muscular, e não a hiperexpressão muscular de IGF-1, foi a responsável pelas melhorias ósseas nas fêmeas. Assim sendo, esses achados sugerem uma interação músculo-osso mecânica e não parácrina ou bioquímica nos animais transgênicos. Já os camundongos TgIGF1 machos, muito embora

tenham apresentado expressiva hipertrofia muscular, não demonstraram melhorias em nenhum dos parâmetros ósseos trabeculares do fêmur, mas sim em parâmetros do osso cortical. Esses achados mostraram que o tecido ósseo trabecular das fêmeas é mais sensível do que o dos machos à hipertrofia muscular determinada pela hiperexpressão de IGF-1. De acordo com a teoria mecanostática proposta por Frost (1987, 2003), diferentes limiares mecânicos determinam se a massa óssea deve diminuir (reabsorção) ou aumentar (formação). Dessa forma, nossos achados sugerem que o limiar para aumento de massa óssea das fêmeas é menor do que o dos machos, o que justifica os resultados das fêmeas e a ausência de efeitos na massa óssea dos machos – provavelmente o limiar mecânico dos machos não foi atingido.

Pudemos observar, ainda, que a hiperexpressão de IGF-1 praticamente não modificou a curva de variação dos parâmetros ósseos trabeculares em função da idade nos camundongos fêmeas e machos. Tanto os camundongos selvagens quanto transgênicos apresentaram redução do BV/TV e Tb.Th e aumento do Tb.Th, SMI e Tt.Ar do 1º ao 5º mês de idade, o que está de acordo com o que foi previamente descrito para camundongos selvagens (Glatt, Canalis et al. 2007). Esses achados demonstram que o IGF-1 de origem muscular não contribui para a melhoria e não desacelera a piora da estrutura óssea trabecular que ocorrem em função da idade, tanto nas fêmeas quanto nos machos. Por outro lado, a curva de variação dos parâmetros ósseos corticais em função da idade demonstrou modificações positivas nos camundongos transgênicos fêmeas e machos. Nas fêmeas, a hiperexpressão muscular de IGF-1 resultou em uma acentuação da curva (maior ganho) de Tt.Ar, Ps.Pm e Ct.Ar nos primeiros meses de idade. Por outro lado, a deterioração desses parâmetros em função do envelhecimento não foi minimizada nas fêmeas transgênicas. Em contraste, nos machos, observamos um efeito positivo da hiperexpressão de IGF-1 no envelhecimento do osso cortical do fêmur. Pudemos observar ganhos em parâmetros corticais dos camundongos transgênicos especialmente do 7º ao 13º mês de vida, enquanto que os camundongos selvagens apresentaram ligeiras reduções nos seus parâmetros ósseos corticais nesse período. Esses dados sugerem que a hiperexpressão muscular de IGF-1 minimiza a deterioração da microarquitetura

óssea cortical em machos. Considerando-se que a perda de massa do músculo quadríceps do 7º ao 13º mês foi mais acentuada nos machos transgênicos do que nos selvagens, é possível que o efeito positivo do IGF-1 nos parâmetros corticais do fêmur não tenha sido resultado do maior estresse mecânico decorrente da hipertrófica muscular induzida pelo IGF-1, mas que tenha ocorrido em função de uma ação positiva e parácrina do IGF-1 sobre o osso cortical.

Um resultado intrigante, que também sugere uma ação do IGF-1 muscular sobre o osso, independente da sua ação de induzir a hipertrofia muscular, foi o achado de que vários parâmetros da microarquitetura trabecular e cortical foram negativamente afetados pela hiperexpressão de IGF-1 no primeiro mês de vida dos camundongos fêmeas. Isso também foi observado quanto ao comprimento dos ossos (fêmur, tíbia, rádio, úmero e L5 menores) e quanto à resistência a fratura (menor carga máxima e rigidez). Considerando-se que não houve diferença de massa muscular entre as fêmeas selvagens e transgênicas no primeiro mês de vida, é possível que, nesta etapa da vida, o IGF-1 de origem muscular afete negativamente e paracrinamente o esqueleto das fêmeas.

6.2 Avaliação do *unloading* sobre a massa e estrutura ósseas de camundongos fêmeas e machos TgIGF1.

Para confirmar se as melhorias na microarquitetura óssea dos camundongos fêmeas TgIGF1 foram uma resposta ao aumento do estresse mecânico promovido pela maior massa muscular dos camundongos transgênicos, e não um efeito do IGF-1 de origem muscular, procuramos minimizar o estresse mecânico produzido pela contração muscular utilizando a técnica de suspensão de cauda. Para essa avaliação, selecionamos animais com 5 meses de idade, uma vez que, nesta idade, observamos as maiores diferenças entre as fêmeas selvagens e transgênicas, tanto relacionados à massa óssea, quanto às massas corporal e muscular.

A técnica de suspensão de cauda em roedores é um modelo consolidado que vem sendo utilizado em vários estudos ao redor do mundo

(CUNNINGHAM et al., 2018; FERREIRA; CRISSEY; BROWN, 2011; MAUREL et al., 2016; PIERNO et al., 2014; SAKATA et al., 1999). Tal modelo demonstra sua eficiência na indução da atrofia muscular das patas traseiras, como também na diminuição de massa óssea, entre 10 a 14 dias de experimento (AVIN et al., 2015).

Embora não tenha atingido o limiar de significância, observamos uma tendência à diminuição da massa corporal nos animais suspensos selvagens e transgênicos fêmeas e machos (Fig. 15), o que deve ser uma consequência da diminuição da massa muscular das patas traseiras desses animais.

Com relação às fêmeas, observamos uma diminuição significativa na massa dos músculos quadríceps e tibial anterior após duas semanas de suspensão de cauda (Fig. 16A e B), o que corrobora os achados de diversos estudos que utilizaram a técnica de suspensão de cauda por 14 dias consecutivos (CUNNINGHAM et al., 2018; MARZUCA-NASSR et al., 2016; PIERNO et al., 2014). A perda de massa muscular em função do *unloading* foi similar entre as fêmeas selvagens e transgênicas. Já nos machos, apenas os transgênicos apresentaram redução significativa da massa muscular, observada somente no quadríceps femoral (Fig. 16C). Esta perda mais evidente de massa muscular nos animais TgIGF1 machos corrobora os resultados de Pierno e colaboradores, que também observaram uma maior atrofia muscular induzida pelo *unloading* nesses animais (PIERNO et al., 2014). Assim sendo, a hiperexpressão de IGF-1 teve um efeito negativo na massa muscular em resposta ao *unloading*. Em conjunto, esses achados sugerem que o IGF-1 de origem muscular depende da contração muscular e/ou de um maior estresse mecânico para exercer as suas ações anabólicas sobre as células musculares dos machos.

Observamos, ainda, uma maior porcentagem de perda de massa muscular derivada do *unloading* no quadríceps quando comparado ao tibial anterior, tanto nos animais selvagens como transgênicos fêmeas e machos (Fig 16). Se considerarmos que o músculo quadríceps é formado por um conjunto de quatro músculos, onde um deles, o vasto intermédio, é dotado predominantemente de fibras do tipo I e que o músculo tibial anterior é composto predominantemente por fibras do tipo II, nossos resultados

corroboram estudos que demonstram que os músculos de predominância de fibras tipo II, como o tibial anterior, são menos propensos a perda de massa muscular quando induzidos a atrofia através da técnica de suspensão de cauda (BALDWIN et al., 2013; PIERNO et al., 2014).

Para verificarmos se as alterações na massa muscular dos animais TgIGF1 controles e suspensos ocorreram devido a alterações nas fibras musculares, realizamos o ensaio histoquímico de ATPase (Fig. 18 e 20). A técnica é utilizada para distinguir fibras musculares de contração rápida, lenta e seus subtipos e ainda possibilita a aferição da AST das fibras musculares. Nos machos, a AST do músculo quadríceps mostrou-se significativamente maior nos camundongos transgênicos do que nos selvagens, o que corrobora os achados de Musaro et al (PIERNO et al., 2014). Nas fêmeas transgênicas, observamos uma clara tendência a maior AST nas fibras do tipo II do músculo quadríceps e tibial anterior em relação àquelas das fêmeas selvagens. Embora não tenhamos detectado diferenças significativas, o *unloading* também promoveu uma clara tendência a redução da AST das fibras do tipo II tanto do quadríceps quanto do tibial anterior, especialmente nas fêmeas.

A ATPase em nosso trabalho também possibilitou distinguir alguns tipos de fibras musculares e suas porcentagens (Fig. 17 e 19). É sabido que o músculo quadríceps femoral apresenta quantidade predominante de fibras musculares do tipo II, sendo o mesmo encontrado em nossos resultados tanto em fêmeas quanto em machos (MARTINS, 2015). Embora trabalhos demonstrem uma mudança de fibras de fibras do tipo I para fibras do tipo II na suspensão de cauda, não observamos tal diferença no m. quadríceps femoral, o que pode ser explicado devido ao músculo em questão possuir pequena quantidade de fibras tipo I, visto que essa alteração é normalmente observada em músculos com predominância de fibras tipo I, como o sóleo (DESAPHY, 2001; PIERNO et al., 2014). Com relação ao m. tibial anterior, observamos a presença das fibras tipo IIB, IIDB e IID em fêmeas e machos, o que corrobora os resultados de Augusto e colaboradores que também observaram predominância de fibras do tipo IIB e IIDB no m. tibial anterior de camundongos adultos (AUGUSTO; PADOVANI; CAMPOS, 2004).

Com relação às análises ósseas, apesar de estudos demonstrarem possíveis impactos negativos no crescimento longitudinal ósseo de roedores submetidos a 14 dias de suspensão de cauda, não detectamos nenhum efeito, o que é explicado pela idade dos animais deste estudo. Aos 5 meses de idade, a lâmina epifisial é pouco ativa e o crescimento longitudinal ósseo é quase que inexistente (BASSO; HEERSCHKE, 2006; ZERATH et al., 1997).

Como na primeira etapa deste estudo observamos que somente as fêmeas TgIGF1 apresentaram melhorias na microarquitetura óssea trabecular em relação às fêmeas selvagens, e que os machos transgênicos apresentaram algumas melhorias apenas no osso cortical, avaliamos o impacto do *unloading* somente na microarquitetura óssea das fêmeas nesta segunda etapa do estudo.

Vimos que a hiperexpressão muscular de IGF-1 não protegeu a microarquitetura óssea dos efeitos deletérios do *unloading*. Na verdade, as fêmeas transgênicas foram mais sensíveis do que as fêmeas selvagens aos efeitos negativos do *unloading* na microarquitetura do osso trabecular e cortical do fêmur. Enquanto que o *unloading* por 14 dias causou apenas uma redução na espessura das trabéculas da metáfise distal do fêmur das fêmeas selvagens, as fêmeas transgênicas apresentaram redução no BV/TV, Tb.Th, Tb.N. e BMD, além de aumento na porosidade e Tb.Pf do osso trabecular e diminuição da Tt.Ar, B.A e Ct.Th no osso cortical da diáfise femoral (Fig. 24 e 26). Assim sendo, a hiperexpressão de IGF-1 no músculo esquelético, não minimizou o efeito deletério do *unloading* na microarquitetura óssea trabecular e cortical do fêmur, mas sim, o intensificou. Considerando-se que o *unloading* promoveu perda de massa muscular de forma similar nas fêmeas TgIGF1 e selvagens, esses resultados, em conjunto, sugerem que, em situação de *unloading*, o efeito negativo do IGF-1 na microarquitetura óssea trabecular e cortical não depende da massa muscular, mas sim de ações parácrinas do IGF-1 de origem muscular sobre o osso.

Esses achados sugerem, ainda, que efeitos anabólicos do IGF-1 sobre o osso talvez dependam de um determinado nível de estresse mecânico. Isso talvez explique o fato das fêmeas TgIGF1 de 30 dias apresentaram piora em vários parâmetros da microarquitetura trabecular e cortical em relação às

fêmeas selvagens, o que também foi observado quanto ao comprimento dos ossos (fêmur, tíbia, rádio, úmero e L5 menores) e quanto à resistência a fratura (menor carga máxima e rigidez). Vale dizer que, até os 15 dias de idade, os camundongos se movimentam relativamente pouco pela gaiola.

Pudemos observar, ainda, que o *unloading* por 14 dias não foi capaz de afetar as propriedades biomecânicas do fêmur dos camundongos selvagens e transgênicos. Assim sendo, as alterações estruturais observadas nos 14 dias de *unloading* nos camundongos transgênicos não foram suficientes para alterar as propriedades biomecânicas do osso.

7 CONCLUSÕES

- A hiperexpressão de IGF-1 nas fibras musculares do tipo II também promove hipertrofia muscular em camundongos fêmeas, entretanto, o efeito é mais brando do que aquele observado nos machos.
- A hiperexpressão de IGF-1 nas fibras musculares do tipo II causou um maior crescimento longitudinal ósseo nos machos, o que não foi observado nas fêmeas. Esse efeito pode ser decorrente de um maior estresse mecânico decorrente da maior massa muscular, mas não exclui um possível efeito parácrino e positivo do IGF-1 de origem muscular no crescimento ósseo.
- Nas fêmeas, a hiperexpressão de IGF-1 não afetou a massa muscular no primeiro mês de vida, mas teve um efeito negativo no comprimento dos ossos, o que sugere um efeito parácrino e negativo do IGF-1 no crescimento ósseo no início da vida pós-natal.
- A hiperexpressão de IGF-1 nas fibras musculares do tipo II resultou em melhorias na microarquitetura do osso trabecular apenas nas fêmeas e em idades em que apresentaram hipertrofia muscular (3 e 5 meses de idade), o que sugere que o maior estresse mecânico, e não o IGF-1 em si, foi a responsável pelas melhorias ósseas trabeculares observadas nas fêmeas.
- A hiperexpressão de IGF-1 nas fibras musculares do tipo II não contribuiu para a melhoria e não desacelerou a piora da estrutura óssea trabecular que ocorrem em função da idade, tanto nas fêmeas quanto nos machos.
- A hiperexpressão muscular de IGF-1 resultou em melhorias na microarquitetura do osso cortical nos primeiros meses de idade das fêmeas (com exceção do primeiro mês de vida), enquanto teve um efeito positivo no envelhecimento do osso cortical dos machos.

- É possível que o efeito positivo do IGF-1 nos parâmetros corticais do fêmur dos camundongos machos durante o envelhecimento tenha ocorrido em função de uma ação positiva e parácrina do IGF-1, e não em função do maior estresse mecânico decorrente da hipertrófica muscular induzida pelo IGF-1, uma vez que houve perda de massa muscular nessa etapa.
- A hiperexpressão muscular de IGF-1 intensificou a perda de massa muscular decorrente do *unloading* nos machos, o que sugere que o IGF-1 de origem muscular depende da contração muscular e/ou de um maior estresse mecânico para exercer as suas ações anabólicas sobre as células musculares.
- A hiperexpressão de IGF-1 no músculo esquelético das fêmeas, não minimizou o efeito deletério do *unloading* na microarquitetura óssea trabecular e cortical do fêmur, mas sim, o intensificou. Esse efeito não parece ser decorrente de influências mecânicas, mas sim parácrinas do IGF-1 de origem muscular sobre o osso, uma vez que a perda de massa muscular em função do *unloading* foi similar entre as fêmeas transgênicas e selvagens.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. R.; MCCUE, S. A. Localized Infusion of IGF-I Results in Skeletal Muscle Hypertrophy in Rats. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 84, n. 5, p. 1716–1722, maio 1998.
- ALIPRANTIS, A. O. et al. Transient Muscle Paralysis Degrades Bone via Rapid Osteoclastogenesis. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 26, n. 3, p. 1110–1118, mar. 2012.
- ALZGHOUL, M. B. et al. Ectopic Expression of IGF-I and Shh by Skeletal Muscle Inhibits Disuse-Mediated Skeletal Muscle Atrophy and Bone Osteopenia in Vivo. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 221–223, jan. 2004.
- ANDREOLI, A. et al. Effects of Different Sports on Bone Density and Muscle Mass in Highly Trained Athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 4, p. 507–511, abr. 2001.
- AUGUSTO, V.; PADOVANI, C. R.; CAMPOS, G. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. v. 21, n. 2, p. 89–94, 2004.
- AVIN, K. G. et al. Biomechanical Aspects of the Muscle-Bone Interaction. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–8, fev. 2015.
- BALDWIN, K. M. et al. Alterations in Muscle Mass and Contractile Phenotype in Response to Unloading Models: Role of Transcriptional/Pretranslational Mechanisms. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 284, 11 out. 2013.
- BAMMAN, M. M. et al. Mechanical Load Increases Muscle IGF-I and Androgen Receptor mRNA Concentrations in Humans. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 3, p. E383-390, mar. 2001.
- BANU, J.; WANG, L.; KALU, D. N. Effects of Increased Muscle Mass on Bone in Male Mice Overexpressing IGF-I in Skeletal Muscles. **Calcified Tissue International**, v. 73, n. 2, p. 196–201, ago. 2003.
- BARTON, E. R. et al. 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, 1 abr. 2002.
- BARTON-DAVIS, E. R. et al. Viral Mediated Expression of Insulin-like Growth Factor I Blocks the Aging-Related Loss of Skeletal Muscle Function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15603–15607, 22 dez. 1998.

BASSO, N.; HEERSCHE, J. N. M. Effects of Hind Limb Unloading and Reloading on Nitric Oxide Synthase Expression and Apoptosis of Osteocytes and Chondrocytes. **Bone**, v. 39, n. 4, p. 807–814, out. 2006.

BIKLE, D. D. et al. Role of IGF-I Signaling in Muscle Bone Interactions. **Bone**, v. 80, p. 79–88, nov. 2015.

BONEWALD, L. Use It or Lose It to Age: A Review of Bone and Muscle Communication. **Bone**, v. 120, p. 212–218, mar. 2019.

BONEWALD, L. F. et al. Forum on Bone and Skeletal Muscle Interactions: Summary of the Proceedings of an ASBMR Workshop. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 9, p. 1857–1865, set. 2013.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 7 jun. 2010.

BROTTO, M.; JOHNSON, M. L. Endocrine Crosstalk between Muscle and Bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 2, p. 135–141, jun. 2014.

COLAIANNI, G. et al. Irisin Enhances Osteoblast Differentiation *In Vitro*. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

COLAIANNI, G. et al. Crosstalk Between Muscle and Bone Via the Muscle-Myokine Irisin. **Current Osteoporosis Reports**, v. 14, n. 4, p. 132–137, 2016.

COLEMAN, M. E. et al. Myogenic Vector Expression of Insulin-like Growth Factor I Stimulates Muscle Cell Differentiation and Myofiber Hypertrophy in Transgenic Mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 20, p. 12109–12116, 19 maio 1995.

CONNELLY, L. B.; SUPANGAN, R. The Economic Costs of Road Traffic Crashes: Australia, States and Territories. **Accident; Analysis and Prevention**, v. 38, n. 6, p. 1087–1093, nov. 2006.

CONNELLY, L. B.; WOOLF, A.; BROOKS, P. Cost-Effectiveness of Interventions for Musculoskeletal Conditions. In: JAMISON, D. T. et al. (Ed.). **Disease Control Priorities in Developing Countries**. 2nd. ed. Washington (DC): World Bank, 2006.

CUNNINGHAM, H. C. et al. Age-Dependent Bone Loss and Recovery during Hindlimb Unloading and Subsequent Reloading in Rats. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 19, n. 1, p. 223, 18 jul. 2018.

DANKBAR, B. et al. Myostatin Is a Direct Regulator of Osteoclast Differentiation and Its Inhibition Reduces Inflammatory Joint Destruction in Mice. **Nature Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1085–1090, set. 2015.

DAVIS, K. M. et al. Muscle-Bone Interactions during Fracture Healing. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 15, n. 1, p. 1–9, mar. 2015.

DESAPHY, J.-F. Skeletal muscle disuse induces fibre type-dependent enhancement of Na⁺ channel expression. **Brain**, v. 124, n. 6, p. 1100–1113, 1 jun. 2001.

DUAN, C.; REN, H.; GAO, S. Insulin-like Growth Factors (IGFs), IGF Receptors, and IGF-Binding Proteins: Roles in Skeletal Muscle Growth and Differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 344–351, 1 jul. 2010.

FERREIRA, J. A.; CRISSEY, J. M.; BROWN, M. An Alternant Method to the Traditional NASA Hindlimb Unloading Model in Mice. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 49, 10 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3197292/>>. Acesso em: 24 out. 2018.

FLORINI, J. R.; EWTON, D. Z.; COOLICAN, S. A. Growth Hormone and the Insulin-like Growth Factor System in Myogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 5, p. 481–517, out. 1996.

FROST, H. M. Bone “Mass” and the “Mechanostat”: A Proposal. **The Anatomical Record**, v. 219, n. 1, p. 1–9, set. 1987.

FROST, H. M. Bone’s Mechanostat: A 2003 Update. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 275, n. 2, p. 1081–1101, dez. 2003.

GOVONI, K. E. et al. Disruption of Insulin-like Growth Factor-I Expression in Type IIalphaI Collagen-Expressing Cells Reduces Bone Length and Width in Mice. **Physiological Genomics**, v. 30, n. 3, p. 354–362, 20 ago. 2007a.

GOVONI, K. E. et al. Conditional Deletion of Insulin-like Growth Factor-I in Collagen Type Ialpha2-Expressing Cells Results in Postnatal Lethality and a Dramatic Reduction in Bone Accretion. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5706–5715, dez. 2007b.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAHN, M. et al. Trabecular Bone Pattern Factor--a New Parameter for Simple Quantification of Bone Microarchitecture. **Bone**, v. 13, n. 4, p. 327–330, 1992.

HARRY, L. E. et al. Comparison of the Healing of Open Tibial Fractures Covered with Either Muscle or Fasciocutaneous Tissue in a Murine Model. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 26, n. 9, p. 1238–1244, set. 2008.

HILDEBRAND, T.; RÜEGSEGG, P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 15–23, 1 jan. 1997.

HU, M. et al. Dynamic Fluid Flow Induced Mechanobiological Modulation of in Situ Osteocyte Calcium Oscillations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 579, p. 55–61, 1 ago. 2015.

ISHIJIMA, M. et al. Enhancement of Osteoclastic Bone Resorption and Suppression of Osteoblastic Bone Formation in Response to Reduced Mechanical Stress Do Not Occur in the Absence of Osteopontin. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 3, p. 399–404, 5 fev. 2001.

KAJI, H. Interaction between Muscle and Bone. **Journal of Bone Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 29–40, fev. 2014.

KAJI, H. Effects of Myokines on Bone. **BoneKEy Reports**, v. 5, p. 826, 2016.

KARSENTY, G.; MERA, P. Molecular Bases of the Crosstalk between Bone and Muscle. **Bone**, v. 115, p. 43–49, out. 2018.

KAUFMAN, H. et al. The Biological Basis of the Bone-Muscle Inter-Relationship in the Algorithm of Fracture Healing. **Orthopedics**, v. 31, n. 8, p. 751, ago. 2008.

KAWAO, N.; KAJI, H. Interactions between Muscle Tissues and Bone Metabolism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 5, p. 687–695, maio 2015.

KEYAK, J. H. et al. Reduction in proximal femoral strength due to long-duration spaceflight. **Bone**, v. 44, n. 3, p. 449–453, 1 mar. 2009.

KLEIN-NULEND, J. et al. Mechanosensation and transduction in osteocytes. **Bone, The Osteocyte**, v. 54, n. 2, p. 182–190, 1 jun. 2013.

KUBOTA, T. et al. Insulin-like Growth Factor-1 Receptor in Mature Osteoblasts Is Required for Periosteal Bone Formation Induced by Reloading. **Acta Astronautica**, v. 92, n. 1, p. 73–78, nov. 2013.

KUREK, J. B. et al. The Role of Leukemia Inhibitory Factor in Skeletal Muscle Regeneration. **Muscle & Nerve**, v. 20, n. 7, p. 815–822, jul. 1997.

LAND, C.; SCHOENAU, E. Fetal and Postnatal Bone Development: Reviewing the Role of Mechanical Stimuli and Nutrition. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 107–118, fev. 2008.

LEAN, J. M. et al. Osteocytic Expression of mRNA for C-Fos and IGF-I: An Immediate Early Gene Response to an Osteogenic Stimulus. **The American Journal of Physiology**, v. 270, n. 6 Pt 1, p. E937-945, jun. 1996.

LEE, N. K. et al. Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456–469, 10 ago. 2007.

LEE, N. K.; KARSENTY, G. Reciprocal Regulation of Bone and Energy Metabolism. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 161–166, jul. 2008.

LI, G. et al. Muscle-bone Crosstalk and Potential Therapies for Sarco-osteoporosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 9, p. 14262–14273, set. 2019.

MARTINS, A. **CARACTERIZAÇÃO IN SITU DOS ORIENTADORES DE AXÔNIO POR REPULSÃO (RGMs) NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA, E**

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MEMBRO A (RGMa) DURANTE A MIOGÊNESE EM CAMUNDONGOS. 2015. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

MARZUCA-NASSR, G. N. et al. Effects of High EPA and High DHA Fish Oils on Changes in Signaling Associated with Protein Metabolism Induced by Hindlimb Suspension in Rats. **Physiological Reports**, v. 4, n. 18, 2016.

MAUREL, D. B. et al. Beta-Catenin Haplo Insufficient Male Mice Do Not Lose Bone in Response to Hindlimb Unloading. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, 13 jul. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943721/>>. Acesso em: 24 out. 2018.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of Skeletal Muscle Mass in Mice by a New TGF-Beta Superfamily Member. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 83–90, 1 maio 1997.

MERA, P. et al. Osteocalcin Is Necessary and Sufficient to Maintain Muscle Mass in Older Mice. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 10, p. 1042–1047, out. 2016.

MITCHELL, W. K. et al. Sarcopenia, Dynapenia, and the Impact of Advancing Age on Human Skeletal Muscle Size and Strength; a Quantitative Review. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 260, 2012.

MO, C. et al. Prostaglandin E₂: From Clinical Applications to Its Potential Role in Bone- Muscle Crosstalk and Myogenic Differentiation. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 223–229, 1 nov. 2012.

MO, C. et al. Prostaglandin E₂ Promotes Proliferation of Skeletal Muscle Myoblasts via EP4 Receptor Activation. **Cell Cycle**, v. 14, n. 10, p. 1507–1516, 19 maio 2015.

MORGENROTH, V. H.; HACHE, L. P.; CLEMENS, P. R. Insights into bone health in Duchenne muscular dystrophy. **BoneKEY reports**, v. 1, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727795/>>. Acesso em: 31 out. 2018.

MUSARÒ, A. et al. Localized Igf-1 Transgene Expression Sustains Hypertrophy and Regeneration in Senescent Skeletal Muscle. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 195–200, fev. 2001.

NAGARAJA, M. P.; RISIN, D. The Current State of Bone Loss Research: Data from Spaceflight and Microgravity Simulators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 5, p. 1001–1008, maio 2013.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a Secretory Organ. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1337–1362, jul. 2013.

PERRINI, S. et al. The GH/IGF1 Axis and Signaling Pathways in the Muscle and Bone: Mechanisms Underlying Age-Related Skeletal Muscle Wasting and Osteoporosis. **The Journal of Endocrinology**, v. 205, n. 3, p. 201–210, jun. 2010.

PIERNO, S. et al. Paracrine Effects of IGF-1 Overexpression on the Functional Decline Due to Skeletal Muscle Disuse: Molecular and Functional Evaluation in Hindlimb Unloaded MLC/Mlgf-1 Transgenic Mice. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e65167, 2014.

PRATESI, A.; TARANTINI, F.; DI BARI, M. Skeletal Muscle: An Endocrine Organ. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism: The Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 11–14, jan. 2013.

QUARLES, L. D. Skeletal Secretion of FGF-23 Regulates Phosphate and Vitamin D Metabolism. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 8, n. 5, p. 276–286, 17 jan. 2012.

REIJNDERS, C. M. A. et al. Effect of Mechanical Loading on Insulin-like Growth Factor-I Gene Expression in Rat Tibia. **The Journal of Endocrinology**, v. 192, n. 1, p. 131–140, jan. 2007.

ROESLER, C. R. de M. **Adaptação mecânica do osso em torno de implantes ortopédicos** Tese de doutorado, , 2006. .

ROSS; PAWLINA. **Histologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SAKATA, T. et al. Trabecular Bone Turnover and Bone Marrow Cell Development in Tail-Suspended Mice. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 9, p. 1596–1604, set. 1999.

SARTORI, R.; SANDRI, M. BMPs and the Muscle-Bone Connection. **Bone**, v. 80, p. 37–42, nov. 2015.

SCICCHITANO, B. M.; RIZZUTO, E.; MUSARÒ, A. Counteracting Muscle Wasting in Aging and Neuromuscular Diseases: The Critical Role of IGF-1. **Aging**, v. 1, n. 5, p. 451–457, 13 maio 2009.

SHARIR, A. et al. Muscle Force Regulates Bone Shaping for Optimal Load-Bearing Capacity during Embryogenesis. **Development**, v. 138, n. 15, p. 3247–3259, 1 ago. 2011.

SHENG, M. H.-C. et al. Disruption of the Insulin-like Growth Factor-1 Gene in Osteocytes Impairs Developmental Bone Growth in Mice. **Bone**, v. 52, n. 1, p. 133–144, jan. 2013.

SHINAR, D. M. et al. Differential Expression of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF-II Messenger Ribonucleic Acid in Growing Rat Bone. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1158–1167, mar. 1993.

SWIFT, J. M. et al. Simulated Resistance Training during Hindlimb Unloading Abolishes Disuse Bone Loss and Maintains Muscle Strength. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 3, p. 564–574, mar. 2010.

TORTORA; NIELSEN. **Principios de Anatomia Humana**. 14^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

UTVÅG, S. E.; GRUNDNES, O.; REIKERÅS, O. Effects of Lesion between Bone, Periosteum and Muscle on Fracture Healing in Rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 69, n. 2, p. 177–180, abr. 1998.

WANG, Y. et al. Insulin-like Growth Factor-I Is Essential for Embryonic Bone Development. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4753–4761, out. 2006.

WANG, Y. et al. IGF-1R Signaling in Chondrocytes Modulates Growth Plate Development by Interacting with the PTHrP/Ihh Pathway. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 7, p. 1437–1446, jul. 2011.

WILLIAMS, P. L. et al. **Gray Anatomia**. 37^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

ZERATH, E. et al. TGF-Beta2 Prevents the Impaired Chondrocyte Proliferation Induced by Unloading in Growth Plates of Young Rats. **Life Sciences**, v. 61, n. 24, p. 2397–2406, 1997.

ZHANG, M. et al. Osteoblast-Specific Knockout of the Insulin-like Growth Factor (IGF) Receptor Gene Reveals an Essential Role of IGF Signaling in Bone Matrix Mineralization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44005–44012, 15 nov. 2002.

ZHAO, G. et al. Targeted Overexpression of Insulin-like Growth Factor I to Osteoblasts of Transgenic Mice: Increased Trabecular Bone Volume without Increased Osteoblast Proliferation. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2674–2682, jul. 2000.