JODONAI BARBOSA DA SILVA

Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilagíneo do processo condilar da mandíbula de camundongos mdx

São Paulo
2013

JODONAI BARBOSA DA SILVA

Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilagíneo do processo condilar da mandíbula de camundongos mdx

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

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti

São Paulo
2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2816
FMVZ

Silva, Jodonai Barbosa da
Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilagíneo do processo condilar da mandíbula de camundongos mdx / Jodonai Barbosa da Silva. – 2013.
95 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Liberti.

1. Cartilagem condilar da mandíbula. 2. Camundongos mdx. 3. IGF-I. 4. IGF-IR. 5. Colágeno. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilaginoso do processo condilar da mandíbula em camundongos mdx", protocolado sob o nº 2175/2011, utilizando 20 (vinte) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Silvia de Campos Boldrini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 04/5/2011.

We certify that the Research "Absence of dystrophin on mdx mice mandibular condylar process development", protocol number 2175/2011, utilizing 20 (twenty) mice, under the responsibility Profa. Dra. Silvia de Campos Boldrini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/04/2011.

São Paulo, 05 de maio de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

UNAERP

Comitê de Ética em Pesquisa

Ribeirão Preto, 29 de outubro de 2010

Prezado(a) Senhor(a) Prof(a) Dr.(a) Odair Alfredo Gomes

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado "**AVALIAÇÃO MORFOQUANTITATIVA DOS EFEITOS DA DISTROFIA MUSCULAR NO CÓRTEX CEREBRAL E NO PLEXO MIOENTÉRICO DE CAMUNDONGOS MDX**" tendo como pesquisador(a) Prof(a) Dr(a) Odair Alfredo Gomes, registrado sobre o **ComÉt: 046/2010.**

Temos a ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Profª Drª Luciana Rezende Alves de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Jodonai Barbosa

Título: Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilagíneo do processo condilar da mandíbula de camundongos mdx

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

Data:___/___/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:**_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:**_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

“Não importa o tanto que você sabe... O importante é o quanto você se destina a aprender”.

Autor desconhecido

DEDICATÓRIA

A minha querida mãe, Maria Lúcia Barbosa da Silva, que sempre batalhou, quase que literalmente, para que eu estudasse, mesmo diante de muitas dificuldades enfrentadas... A minha irmã Jéssica Gomes que sempre me deu apoio para seguir estudando, a minha Avó Gercina Barbosa que também é uma mãe, às minhas tias Maria Barbosa e Joana Barbosa por sempre me apoiarem...

Serei sempre grato às mulheres da minha vida!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus por sempre me proteger de coisas ruins, por colocar as pessoais certas ao meu lado, algumas citadas abaixo, e por sempre me dar forças para seguir caminhando.

As amigas Any Kelly Gomes, que me aperreia por mais de seis anos, e Franceliusa Delys que foram muito importantes no início do mestrado, e antes do mestrado também, pois lá em Natal elas sempre me apoiaram... Valeu “cabeções”...

A uma amiga muito querida que sempre me apoiou na decisão de vir estudar em São Paulo, que me ajudou em muitos momentos difíceis longe da família e em momentos de felicidades também, muito obrigado Mayara Saatman.

A Naianne Kelly Clebis, por me proporcionar a oportunidade de ser monitor em sua disciplina por quase quatro anos... Serei eternamente grato por esta oportunidade...

A Joice Naiara Bertaglia por ter me ajudado muito na minha pesquisa e tarefas do laboratório... Com ela comprovei algo: Não tirar conclusões sobre uma determinada pessoa sem antes conhecê-la...

A Malu Motta pelo apoio e as palavras carinhosas em momentos complicados, mais uma amiga que conquistei aqui em São Paulo! Obrigado Malu!

Um agradecimento mais que especial... Apesar do pouco tempo de convívio com ela, mas esse curto período foi o suficiente para conhecê-la... Uma verdadeira mãezona que sempre estava disposta a ajudar todos a qualquer hora sem pensar duas vezes... Sempre recebia todos com um sorriso enorme! Lembro-me do primeiro dia que a conheci, cheguei todo envergonhado e com medo, porém depois de poucos minutos conversando com ela, me senti bem e aliviado, porque tive a certeza que iria conviver ao lado de uma pessoa de coração gigante... E iria aprender muitas coisas ao seu lado, pois sabia que ela era uma anatomista de verdade... Ela

preocupava-se com meu lado “pesquisador”, porém confiava no meu potencial como um “pré-aprendiz” de Anatomista... Algo interessante foi sua preocupação com o meu primeiro inverno aqui em São Paulo, ela falava: Jó coloca uma blusa que está muito frio! Olha Edson, ele está sem blusa; daí o Liberti falava meio bravo: Oh moleque, coloca a blusa! Eu colocava rapidinho e ficava morrendo de calor...

Então, essa é a lembrança que ficou da professora Silvia: Uma Anatomista mãezona que se preocupava com tudo e com todos... Serei muito grato à professora Silvia de Campos Boldrini (*in memorian*).

Outra pessoa que merece um agradecimento especial é o “seu” Liberti! Confesso que tinha medo dele no início do mestrado porque ele tinha “cara” de bravo, porém a professora Silvia falava assim: Jó, isso é só o jeito dele, na verdade ele tem o coração muito molinho, molinho. No início foi difícil acreditar nisso, mas com o tempo confirmei que ela tinha razão... Comecei a admirá-lo no final da minha graduação, pois quando o conheci melhor, ele se tornou meu ídolo, pois além de ser um grande Anatomista, ele é um homem de bom coração, de caráter, amigo, paizão... Um exemplo a ser seguido! Lembro-me uma vez que participei de uma aula dele (músculos da mastigação), ministrei aula junto com ele e, ainda, fui chamado de discípulo dele! “armaria”, quase num dormi nesse dia! Muito obrigado Edson Aparecido Liberti por todos os ensinamentos sobre a anatomia e sobre coisas da vida... Pode ter a certeza de que eu sempre irei defender a bandeira e causa da Escola Anatômica do Bovero, da qual o senhor faz parte... Onde quer que eu esteja, sua causa anatômica será disseminada!

AGRADECIMENTOS

Aos colegas de laboratório, Ariane Sardo, Giovanna Campos, Natália Camargo, Aline Bobna, Aline Gonçalves, Cristina Bolina, Flávio Tampelini, Eduardo Beber, Gisele Martins, Marcelo Cavalli, Josemberg Baptista, Paulo Henrique, Regina Bolina, Valquíria Mariotti, Thelma Parada, Ricardo Eustáquio, Liliana Ribeiro, Lígia Pelosi, Lidia Cruz, Josy Rosa e demais membros do LAFACC que me ajudaram durante esses anos de mestrado. Aos colegas da “Vet” Aline Ambrogi, Maria Angélica, Marcos Vinícius, Paulo Ramos.

Ao Ricardo Bandeira por ter me ajudado sempre que precisei, sua ajuda foi muito importante durante a execução do meu trabalho...

A amiga Bruna Caixeta pela ajuda e ensinamentos no início do mestrado e pelo auxilio fora do laboratório também, muito obrigado doida!

A Cleide Rosana Duarte Prisco por fazer as análises estatísticas do meu trabalho.

Ao meu amigo Cezar Zarza que tanto me ajudou aqui em São Paulo...

Aos técnicos de Histologia do ICB III, Marta Maria da Silva Righetti, Sônia Regina Yokomizo e Kelly Patrícia Nery Borges. Aos funcionários do Biotério do ICB III, Renivaldo de Souza e ao Fábio França. Aos técnicos do laboratório de anatomia humana, Everton Luis Pavan Torres, José Adão Mendes que sempre me ajudaram no laboratório de aulas práticas e ao Adevair Urenha Alves por ter me ajudado durante as dissecações e nas aulas práticas de anatomia humana.

Aos funcionários do Programa de Pós Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ, Maicon Silva, Jaqueline Santana, Ednaldo (Índio) e Ronaldo Agostinho pelo auxilío e aos funcionários da Biblioteca da FMVZ Fernanda Cezar e a Neusa Kazue Habe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxilio financeiro durante a realização do mestrado.

RESUMO

SILVA, J. B. **Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilagíneo do processo condilar da mandíbula de camundongos mdx.** [Influence of absence of dystrophin on development of cartilage of the mandibular condyle of mdx mice]. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença de caráter hereditário recessivo ligado ao cromossomo X, que determina a ausência da distrofina, a responsável pela progressiva degeneração muscular observada no DMD. Embora não expresse o fenótipo, a camundongo mdx apresenta a ausência da distrofina e o mais comum modelo animal experimental para estudar as repercussões da DMD em muitos órgãos. Este estudo foi realizado na cartilagem do processo condilar da mandíbula de mdx, um importante sítio de crescimento craniofacial. Assim, o PC dos mdx de 4 (G1) e 10 (G2) semanas e dos respectivos controles (camundongos C57BL/10 mice) foram avaliados usando as técnicas de microscopia de luz (H.E, Picrosirius e Safranina-O) e de imunohistoquímica (IGF-I e IGF-IR). Em ambos os grupos, não houve diferença estatisticamente significante na área do PC e comparação aos controles. O número de e a área dos condrócitos, bem como, a quantidade de matriz extracelular (MEC) foram menores nos grupos mdx. A imunorreatividade para ambos, IGF-I e IGF-IR, proporcionalmente maiores nos grupos mdx. Os dados quantitativos e a predominância do colágeno tipo I nos grupos mdx, sugere um processo precoce de envelhecimento na cartilagem do PC desses animais.

Palavras-chave: Cartilagem condilar da mandíbula. Camundongos mdx. IGF-I. IGF-IR. Colágeno.

ABSTRACT

SILVA, J. B. **Influence of dystrophin absence on cartilage development of mandibular condyle of mdx mice.** [Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilagíneo do processo condilar da mandíbula de camundongos mdx]. 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a recessive hereditary disease linked to X-chromosome that determines the dystrophin absence, the responsible for progressive muscle degeneration observed in DMD. Although not exhibit the phenotype, the MDX mouse reveal absence of dystrophin and is the most common experimental animal model for DMD studies in many organs. This study was performed in the articular cartilage of the mandibular condylar process (PC) of MDX, an important site of craniofacial growth. Thus the PC of MDX and respective controls (C57BL/10 mice) were evaluated at the ages of 4 (G1) and 10 (G2) weeks using light microscopy (H.E, Picrosirius e Safranin-O) and immunohistochemical (IGF-I e IGF-IR) techniques. In both groups, there was no statistical significant difference in PC area of the mdx and the respective controls. The number and area of the chondrocytes, as well as the amount of extracellular matrix (MEC) were lower in MDX groups. The immunoreactivity for both, IGF-I and IGF-IR, were proportionally higher im MDX groups. The quantitative data and the predominance of collagen type I fibers in the MDX groups suggest a premature aging process of the PC in these animals.

Keywords: Cartilage of the mandibular condyle. mdx mice. IGF-I. IGF-IR. Collagen

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Média do peso dos animais dos grupos Controle (C4, C10) e Experimental (E4, E10)..... 57

Tabela 2 Número de condrócitos da camada condroblástica nos grupos Controle e Experimental..... 61

Tabela 3 Médias do número de condrócitos imunorreativos ao IGF-I e da correlação com o número total, nos grupos Controle e Experimental..... 64

Tabela 4 Médias do número de condrócitos imunorreativos ao IGF-IR e da correlação com o número total, nos grupos Controle e Experimental..... 66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Camundongo C57BL/10 (A) e gaiola onde os animais foram mantidos (B)..... 43

Figura 2 Etapas da obtenção do PC nos diferentes grupos (C4, C10, E4 e E10). A) material cirúrgico utilizado; B) Animal posicionado ao lado de uma régua utilizado para a determinação de seu comprimento. Notar a proporção da cabeça; C) Exposição do arco zigomático (seta amarela) e do músculo masseter (seta vermelha); E) Exposição do ramo da mandíbula (seta amarela) e da articulação temporomandibular (círculo), após remoção do arco zigomático e do m. masseter; F) Exposição da fossa mandibular (seta amarela) e do PC (seta vermelha), após incisão na capsula articular (seta preta); G) PC (seta preta) removido, evidenciando-se o seu revestimento cartilagíneo (seta amarela)..... 45

Figura 3 Determinação da área da cartilagem do PC..... 48

Figura 4 Campo microscópico da parte média da cartilagem condilar da mandíbula, com o sistema teste de 80 pontos. (Safranina-O. Barra de calibração 50 µm)..... 49

Figura 5 Parte central do PC evidenciando as camadas constituintes da cartilagem articular. Notar os condrócitos (x) assinalados na camada condroblástica (c). (a- camada articular; pc- camada pré-condroblástica; h- camada hipertrófica. (HE. Barra de calibração: 50 µm)..... 51

Figura 6 Exemplo da determinação da área de três condrócitos da camada condroblástica do PC nos grupos C4 (a), C10 (b), E4 (c) e E10 (d), e em maior aumento um exemplo da medição da área de um condrócitos (Barra de calibração 10 µm). (HE. Barra de calibração: 50 µm)..... 52

Figura 7 Padrões estabelecidos para a avaliação em imunohistoquímica para o IGF-I e o IGF-IR. Células intensamente reativas (**); fracamente reativas (*) e não reativas (seta). (Barra de calibração: 25 µm)..... 53

Figura 8 Camadas constituintes do PC: a- camada articular; pc- camada pré-condroblástica; h- camada hipertrófica. (HE. Barra de calibração: 50 µm)..... 54

Figura 9 Padrão de distribuição das fibras colágenas dos tipos I (amarela, laranja e vermelha) e III (verde) nas diferentes

camadas da cartilagem do PC. (a- articular; pc- pré-condroblástica; c- condroblástica; h- hipertrófica). (Barra de calibração: 50 µm)..... 53

Figura 10 Representação gráfica da Média do Peso Corporal dos animais MDX (E4, E10) e C57BL/10 (C4, C10)..... 58

Figura 11 Média da área total da cartilagem do PC nos grupos MDX (E4, E10) e C57BL/10 (C4, C10)..... 59

Figura 12 Padrão de distribuição da área dos condrócitos da cartilagem do PC (μm^2)..... 60

Figura 13 Área dos condrócitos total da cartilagem do PC (μm^2). Houve diferença estatisticamente significante entre MDX e controle ($p<0,001$) e entre 4 e 10 semanas ($p=0,046$)..... 60

Figura 14 Número de condrócitos da região central da camada condroblástica..... 62

Figura 15 Médias da porcentagem ocupada pela MEC na cartilagem do PC..... 63

Figura 16 Média do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I nos diferentes grupos..... 65

Figura 17 Média da correlação do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I com o número total estimado de condrócitos, nos diferentes grupos..... 65

Figura 18 Média do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I nos diferentes grupos..... 67

Figura 19 Média da correlação do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I com o número total estimado de condrócitos, nos diferentes grupos..... 67

Figura 20 Camadas constituintes do PC na fase de 4 semanas dos grupos Controle (A, B) e mdx (C, D). Destaque para as diferenças entre as camadas condroblástica (c) e hipertrófica (h). As setas indicam a camada articular. (HE. Barra de calibração: 20 µm)..... 68

Figura 21 Camadas constituintes do PC na fase de 10 semanas dos grupos Controle (A, B) e mdx (C, D). Destaque para as diferenças entre as camadas condroblástica (c) e hipertrófica (h) e entre a pré-condroblástica do controle (A) e mdx (D). As setas indicam a camada articular. (HE. Barra de calibração: 20 µm)..... 70

Figura 22 Distribuição das fibras de colágeno dos tipos I (amarelo, laranja, vermelho) e III (verde) nas camadas a, pc e c (em conjunto, acima da linha tracejada). Notar a maior espessura e das camadas e o predomínio das fibras do tipo III no grupo controle (A), e a menor espessura e predomínio das fibras do tipo I no grupo mdx (B). (Picrosirius sob luz polarizada. Barra de calibração: 25 µm)..... 72

Figura 23 Distribuição das fibras de colágeno dos tipos I e III nas camadas a, pc e c (em conjunto, acima da linha tracejada). Notar o predomínio das fibras do tipo III no grupo controle 10 semanas (A), e das fibras do tipo I no grupo mdx 10 semanas (B). (Picrosirius sob luz polarizada. Barra de calibração: 25 µm)..... 73

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

a – Camada articular

AADM – Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular

AMP – Adenosina monofosfato

ATM – Articulação temporomandibular

c – Camada condroblástica

C10 – Controle 10 semanas

C4 – Controle 4 semanas

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratórios

DAB – Diaminobenzidine tetrahydrochloride

DMD – Distrofia muscular de Duchenne

E10 – Experimental 10 semanas

E4 – Experimental 4 semanas

FMVZ/ USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

GDP – Guanosina difosfato

GRMD – Golden Retriever Muscular Dystrophy

h – Camada hipertrófica

Hcl – Ácido Clorídrico

IGF-I – fator de crescimento semelhante à insulina I

IGF-IR – Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina I

igG – Imunoglobulina G

kD – Kilodalton

mdx – Camundongo com distrofia muscular ligada ao cromossomo X

MEC – Matriz extracelular

PBS – Solução Salina Tamponada

pc – Camada pré-condroblástica

PC – Processo condilar da mandíbula

UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 23
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 29
2.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE..... 30
2.2 PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DE MEMBRANA..... 32
2.3 DISTROFIA MUSCULAR E MÚSCULOS DA MASTIGAÇÃO..... 32
2.4 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO CONDILAR DA MANDÍBULA..... 33
2.5 CARTILAGEM CONDILAR..... 34
2.6 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA E SEU RECEPTOR..... 36
2.7 MODELOS DE ANIMAIS DE DISTROFIA MUSCULAR..... 37
3 PROPOSIÇÃO..... 39
4 MATERIAIS E MÉTODO..... 41
4.1 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS E FORMAÇÃO DOS GRUPOS. 42
4.1.1 ESTRATÉGIA PARA A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS..... 43
4.2 OBTENÇÃO DO PROCESSO CONDILAR DA MANDÍBULA (PC)..... 44
4.3 MICROSCOPIA DE LUZ..... 45
4.3.1 TÉCNICAS ROTINEIRAS..... 46
4.3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA..... 46
4.4 ESTUDO QUANTITATIVO..... 47
4.4.1 ÁREA DA CARTILAGEM DO PC 48
4.4.2 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DA MATRIZ CARTILAGÍNEA DO PC..... 48
4.4.3 NÚMERO ESTIMADO DE CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC..... 51
4.4.4 ÁREA DOS CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC..... 52
4.4.5 IMUNORREATIVIDADE..... 52
4.5 ESTUDO QUALITATIVO..... 53
4.5.1 DESCRIÇÃO DAS CAMADAS DA CARTILAGEM DO PC..... 53
4.5.2 TIPIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS NA CARTILAGEM DO PC..... 54
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 55
5 RESULTADOS..... 56
5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA..... 57
5.1.1 PESO DOS ANIMAIS..... 57
5.1.2 ÁREA DA CARTILAGEM DO PC..... 58
5.1.3 ÁREA DOS CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC..... 59

5.1.4 NÚMERO DE CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC..... 61
5.1.5 ÁREA DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)..... 62
5.1.6 IMUNOHISTOQUÍMICA..... 63
5.1.6.1 NÚMERO DE CONDRÓCITOS IMUNORREATIVOS AO IGF-I E CORRELAÇÃO COM O NÚMERO TOTAL..... 63
5.1.6.2 NÚMERO DE CONDRÓCITOS IMUNORREATIVOS AO IGF-IR E CORRELAÇÃO COM O NÚMERO TOTAL..... 65
5.2 ANÁLISE QUALITATIVA..... 67
5.2.1 EVIDENCIAÇÃO DAS CAMADAS DA CARTILAGEM DO PC..... 67
5.2.2 TIPIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS..... 71
6 DISCUSSÃO..... 74
7 CONCLUSÕES..... 81
REFERÊNCIAS..... 83

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença de caráter hereditário recessivo ligado ao cromossomo X, que resulta em miopatia grave, caracterizada por progressiva degeneração muscular (BACCARI et al., 2007). Nos portadores de DMD há a falta ou mesmo a redução da expressão da proteína chamada distrofina, o que leva a redução do complexo de proteínas ligadas a distrofina, causando alterações e/ou destruição entre o citoesqueleto e a matriz extracelular da membrana plasmática, levando a ruptura e necrose de fibras musculares (MATSUMURA; CAMPBELL, 1994; TINSLEY et al., 1994).

Tem sido descrito que a distrofina apresenta um papel estrutural, pois atua como uma ligação entre a actina do citoesqueleto e a matriz extracelular (ERVASTI; CAMPBELL, 1991; 1993) e, quando associada à glicoproteína atua na maturação dos receptores de membrana nas junções neuromusculares (PILGRAM et al., 2010).

Muitos estudos avaliaram os efeitos da DMD sobre os músculos esqueléticos e, consequentemente, sobre a ação no aparelho locomotor (HAYES, et al., 1993; REZVANI et al., 1995; CORNU, et al., 2001; KONHILAS et al., 2005; MARDEN et al., 2005; RATEL et al., 2006) influenciando, inclusive, a mecânica cardiorrespiratória (NIGRO et al., 1990; BOLAND et al., 1996; GOMEZ-MERINO; BACH JR, 2002; FINSTERER; STÖLLBERGER, 2003; ISHIHATA, 2003; FINSTERER, 2006). Segundo UEKI et al. (2007) é possível observar fraqueza também na musculatura da mastigação, podendo em decorrência dessa situação desenvolver-se disfagia ou dificuldades na alimentação, em decorrência de distúrbios estruturais e neurológicos envolvidos no processo da deglutição (AMERICAN SPEECH-LANGUAGE-HEARING ASSOCIATION, 2004). De fato, em pacientes com DMD as dificuldades durante a deglutição iniciam-se na primeira década de vida, a partir dos 18 anos de idade e, tende a agravar com o avançar da idade (PANE et al., 2006).

Pesquisas em humanos e animais têm demonstrado que os músculos da mastigação, como o masseter e temporal, quando enfraquecidos, alteram o posicionamento da mandíbula em relação à maxila (MOSS; RANKOW, 1968; SUBTELNY, 1970; WEIJS; HILLEN, 1984; VAN SPRONSEN et al., 1992), e pelo fato de alguns músculos estarem atrofiados e/ou necrosados como observa-se na DMD, pode ocorrer um desequilíbrio entre os músculos da mastigação e os da musculatura da face, prejudicando desta forma, o crescimento e o desenvolvimento craniofacial (KREIBORG et al., 1978).

Conforme Penarrocha et al. (1990) o equilíbrio entre os músculos da face e os da mastigação é importante na manutenção e, também, no desenvolvimento da morfologia do esqueleto cefálico sugerindo, desta forma, que a DMD pode prejudicar o desenvolvimento craniofacial.

Várias estruturas estão envolvidas no processo de crescimento craniofacial, dentre elas o processo condilar da mandíbula (PC), cuja remodelação ocorre por meio de um processo de aposição óssea (ENLOW, 1968; 1975). Nakano et al. (2009) destacaram a importância do PC no crescimento facial observando que após a remoção unilateral do mesmo, ocorreu a diminuição do crescimento da mandíbula como um todo.

A ontogênese do PC é diferente das outras cartilagens, por se desenvolver depois do período pós-natal, esta possui uma fibrocartilagem que é periférica, que confere cobertura de tecido conjuntivo fibroso, e outra hialina que é mais central (MIZOGUCHI et al., 1990) o que torna essa cartilagem estruturalmente e funcionalmente diferenciada em comparação as demais cartilagens dos membros e da cartilagem epifisial ou placa do crescimento (HINTON; CARLSON, 2005). Sabe-se ainda, que as cartilagens primárias e secundárias diferem-se também quanto à síntese de determinados fatores de crescimento e a expressão de alguns receptores (TAJIMA et al., 1998; VISNAPUU et al., 2002).

O crescimento e desenvolvimento craniofacial, do qual o PC é um importante sítio, é estimulado por alguns fatores intrínsecos como, por exemplo, a carga genética e hormonal (ZHOU et al., 2005) e por fatores extrínsecos como os mecânicos, nutricionais e físicos (NEWMAN et al., 1982; MOYERS, 1991; CHAI).

Dentre os fatores intrínsecos destaca-se o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), o qual exerce importante ação sobre o crescimento de diversos tecidos, entre eles, o tecido ósseo. Neste tecido, o IGF-I promove o crescimento longitudinal de ossos longos por estimular a ossificação da cartilagem epifisial (FORTIER et al., 2011) e também, o crescimento cartilagíneo das superfícies articulares dos ossos (OHLSSON; VIDAL, 1998).

No metabolismo do tecido cartilagíneo, o IGF-I atua no equilíbrio entre as ações catabólicas e anabólicas que ocorrem em sua estrutura (SUN et al., 2008) tendo sido detectado na superfície da cartilagem articular do PC (VISNAPUU et al., 2001). Assim, pesquisadores como MAOR et al. (1993A) avaliando os efeitos do IGF-I sobre a cartilagem do PC verificaram que a adição de IGF-I *in vitro* tem efeito sobre a proliferação das células cartilagíneas.

Segundo Bojrk e Helm (1967), durante os períodos pré-púbere e púbere, a mandíbula apresenta crescimento bastante expressivo e linear em ambos os sexos, decorrentes da ação hormonal aumentada nesta época da vida. A literatura sugere que, por tratar-se de cartilagem mista, os mecanismos que estimulam a proliferação das células cartilagíneas do PC, podem estar intimamente relacionados com aqueles que influenciam a proliferação celular nas cartilagens cranianas (como por exemplo, a sincondrose esfeno-occipital) e nos discos epifisiais (FUENTES et al*.,* 2002), Logo, pode-se inferir que se forem detectadas alterações no PC, outras estruturas como os discos epifisiais de ossos longos também são comprometidas, determinando sérios prejuízos à saúde e à qualidade de vida dos portadores de DMD.

De acordo com Eckardt e Harzer (1996) e Cudny (1978) o tamanho do crânio de indivíduos portadores de DMD é menor, quando comparado com aqueles de indivíduos não portadores da doença, o que foi comprovado por Matsuyuki et al. (2006), sugerindo que devido ao enfraquecimento da musculatura a sua ação no crânio é comprometida e, consequentemente, o desenvolvimento craniofacial.

Para Stutzmann e Petrovic (1985) as cartilagens possuem mecanismos intrínsecos que controlam e ativam a síntese de pré-condroblastos, estruturas importantes para o seu desenvolvimento. Tais mecanismos podem ser influenciados por fatores externos como a força ou estresse mecânico, o que

reforça a hipótese de que a cartilagem do PC (assim como as demais do organismo) sofre alterações decorrentes da fraca ação muscular em portadores de DMD.

Em estudos realizados em laboratórios de pesquisa, os efeitos da DMD no organismo são avaliados em modelos animais como o camundongo mdx, no qual a mutação genética é espontânea. Esse espécime tem sido empregado como referência, não somente para uma melhor compreensão da patogênese da DMD, mas também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (WELLS; WELLS, 2005; BANKS; CHAMBERLAIN, 2008). Outro modelo como os cães da raça Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) é também utilizado (COLLINS; MORGAN, 2003; JAZEDJE et al., 2009); entretanto, deve-se ressaltar que esses animais apresentam fenótipo bastante variado da doença (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008) enquanto os camundongos mdx exibem somente o genótipo.

Apesar de cada modelo animal apresentar limitações, juntos eles são essenciais para o desenvolvimento de diversas estratégias terapêuticas que buscam um substituto para a distrofina, ou uma barreira para a degeneração muscular e consequente progressão da doença (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008). Todavia, mesmo com estudos tanto em animais, como em seres humanos e *in vitro*, não há ainda nos dias de hoje, um tratamento eficaz para a cura da DMD (BANKS; CHAMBERLAIN, 2008).

Contudo, não existem muitos achados científicos em que descrevam como o tecido cartilagíneo se desenvolve em portadores de DMD. A maioria dos estudos avalia apenas o componente muscular (SANDRI et al., 1995; MARDEN et al., 2005;). Embora os camundongos mdx não expressem o fenótipo característico da DMD, alguns autores observaram que este animal apresentava níveis séricos elevados de enzimas sarcoplasmáticas e alterações morfológicas semelhantes aos portadores de DMD (BULFIELD et al., 1984), como severa degeneração muscular nos membros, presença de fibrose e de deposição de tecido adiposo (BRIDGES, 1984). Ainda segundo Bridges (1984) em animais de 8 a 30 semanas pode-se observar regeneração muscular o que, em longo prazo, minimizaria os efeitos da falta de distrofina sobre aquele tecido, sendo este o fato que levaria os animais a não expressarem o fenótipo de portadores de DMD.

Assim, no presente estudo deu-se preferência ao camundongo mdx pela viabilidade e disponibilidade no meio científico, e pela homogeneidade fenotípica, o que proporciona maior confiabilidade aos resultados.

Portanto, neste estudo foram analisados animais com 4 e 10 semanas de idade, ou seja, animais pré-puberes e pós-puberes com o objetivo de avaliar como o desenvolvimento cartilagíneo do PC ocorre nestes animais. Assim, os camundongos com 4 semanas de idade, considerados jovens, apresentariam elevada carga hormonal em relação aos animais de 10 semanas de idade considerados adultos jovens. Como descrito anteriormente, sabe-se que o desenvolvimento cartilagíneo, em especial da estrutura objeto deste estudo (PC) é diretamente influenciado por fatores intrínsecos, como a ação hormonal, e por fatores extrínsecos, como a ação muscular (ação mecânica) em conjunto, influenciariam diretamente o processo de desenvolvimento craniofacial.

Segundo Ghafari e Cowin (1989) diminuição da massa muscular do masseter, um importante músculo que atua no desenvolvimento do côndilo da mandíbula, foi observada em animais mdx. Da mesma forma Eckardt e Harzer (1996) e Cudny (1978) verificaram diminuição do tamanho do crânio em animais portadores de DMD. Assim, acreditamos que estas alterações musculares possam comprometer o desenvolvimento normal do PC, já que mudanças craniofaciais já foram identificadas.

Desta forma, estudos que elucidem as repercussões da ausência da distrofina, característica de portadores de DMD, sobre os aspectos morfológicos envolvidos no desenvolvimento cartilagíneo (craniofacial ou de outras articulações), são fundamentais para a melhoria da qualidade de vida desses portadores, pois os resultados dessa pesquisa poderiam dar suporte a novos estudos que visem à melhoria das condições clínicas desses indivíduos. Ainda, baseados no fato de que na diminuição de estresse mecânico decorrente da menor potência muscular dos indivíduos portadores da DMD poderia interferir com a dinâmica do crescimento craniofacial, o presente estudo visa o entendimento do processo de desenvolvimento da cartilagem do PC em um modelo de distrofina muscular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nessa revisão de literatura serão abordados aspectos relevantes produzidos pela comunidade cientifica sobre o assunto deste projeto de pesquisa.

2.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Em uma reunião da Sociedade Real de Medicina e Cirúrgica em 1851, Edward Meryon, um médico inglês, apresentou as características clínicas de uma determinada doença que iniciava na infância e que acometia a musculatura esquelética, deixando-as fracas e, em consequencia disso, os portadores moriam muito cedo (MERYON, 1851). Meryon (1851) notou que essa doença tinha origem familiar e acometia apenas os meninos. Investigando mais sobre tal condição, foram realizadas biopsias nas medulas espinais de indivíduos que morreram em decorrência desta e constatou-se que a mesma não estava alterada, logo, concluiu que o os tratos e glânglios não estava associado com o surgimento dessa fraqueza muscular e que se tratava de uma doença de natureza puramente miogênica (EMERY; EMERY, 1995). Afim de obter mais informações dessa enfermidade, Meryon utilizou técnicas histológicas para avançar ainda mais nas caracteristicas desta. Então, ele constatou que a membrana muscular estava desorganizada e rompida, sarcomeros distorcidos e com aspecto granulado (EMERY, 2001). Essa foi uma descoberta muito importante e inovadora para aquela época, apesar de ter permanecido negligenciada por muito tempo por razões desconhecidas. Entretanto, após 16 anos se passarem esta doença foi associada ao francês Guillaume Benjamin Amand Duchenne que Bach (2000) cita como alguém que esconde o

mérito de outros autores e traz para si a glória por “descobertas” feitas pelo próprio. Duchenne utilizou as descobretas de Meryon como base, estabeleceu características clínicas e histológicas para caracterizá-la, seu trabalho, “*Recherches sur la paralysie muscularie pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclerosique*”, foi publicado em 1868 (EMERY, 2002).

A musculatura estriada esquelética é um tecido de extrema relevância para diversas funções metabólicas, esse tecido, como outro qualquer, está susceptível a alguns padecimentos, como por exemplo, a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) que é uma doença de caráter hereditário recessivo ligado ao cromossomo X localizada na banda p21 de seu braço curto (BODRUG et al., 1987), ela é caracterizada por uma progressiva degeneração muscular (BACCARI et al., 2007), e atinge 1 em cada 3,500 meninos. A DMD não apresenta características evidentes até os três ou cinco anos de idade e quando os sintomas aparecem, iniciam-se pela musculatura dos membros inferiores, conseqüentemente, os portadores apresentam dificuldades em sua locomoção e no ato de subir e descer escadas e, posteriormente, esses pacientes se tornam dependentes da cadeira de rodas (HOFFMAN; BROWN JR; KUNKEL, 1987; EMERY, 2002).

Nos indivíduos portadores da distrofia muscular de Duchenne há ausência ou redução da expressão de uma proteína, a distrofina. Essa é uma proteína estrutural da membrana plasmática que atua na manutenção da integridade da membrana celular e resistindo às forças mecânicas, esta proteína forma um complexo com outras proteínas que conecta o citoesqueleto celular à matriz extracelular (LAW; ALLEN; TIDBALL, 1994). Na ausência desta proteína, a membrana celular torna-se mais suscetível a deformações estruturas, resultando em ruptura e necrose das fibras musculares (MATSUMURA; CAMPBELL, 1994; TINSLEY et al., 1994). Além de ser encontrada na membrana plasmática, esta pode ser encontrada no sistema nervoso central, porém em uma quantidade mais reduzida. Tal fato explica a incidência de 20% dos portadores de Duchenne serem acometidos neurologicamente e, em consequência disto, o quociente inteligência desses garotos, geralmente, é menor que 70 (HSU, 2004).

2.2 PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DE MEMBRANA

Mantendo a integridade da membrana plasmática das células encontramos diversas proteínas, dentre estas a distrofina, uma proteína alongada que pesa 47 kD, possuindo uma parte central em forma de bastão, uma região carboxi-terminal, que se liga ao complexo de glicoproteínas da membrana celular, e outra região animo-terminal que interage com os filamentos de actina da célula (GILLIS, 1996), dessa forma, essa interação da distrofina como os elementos intra-celulares e extracelulares promove uma estabilidade da membrana celular que a torna resistente às forças mecânicas. Juntamente com a distrofina encontram-se outras proteínas estruturais como a distroglicana, que se liga aos componentes da matriz extracelular (MEC) e com a laminina, assim aumentando a resistência da membrana celular às cargas mecânicas (MATSUMURA et al., 1993). No músculo esquelético a ausência da distrofina causa ruptura da membrana sarcoplasmática e a degeneração desta estrutura que resulta em uma maior concentração dos níveis séricos de enzimas citoplasmáticas características do músculo esquelético (GLESBY et al., 1988). Com essa membrana celular desorganizada e rompida, há uma maior liberação de íons cálcio e essa alta concentração altera a homeostase intracelular desse íon, tal alteração poderá ativar as proteases dependentes de cálcio que desencadeiam processos degenerativos nas fibras musculares (DE BACKER et al., 2002).

2. 3 DISTROFIA MUSCULAR E MÚSCULOS DA MASTIGAÇÃO

Muitos trabalhos desenvolvidos em humanos e animais têm demonstrado que os músculos da mastigação e da expressão facial, como o masseter e temporal, quando enfraquecidos, alteram o posicionamento da mandíbula em relação à maxila (MOSS; RANKOW, 1968; SUBTELNY, 1970; WEIJS; HILLEN, 1984; VAN

SPRONSEN et al., 1992; SINSEL; OPDEBEECK; GUELINCKX, 2002), e pelo fato de alguns músculos estarem atrofiados e/ou necrosados, como observa-se na DMD, pode ocorrer um desequilíbrio entre os músculos da mastigação e os da expressão facial, prejudicando desta forma, o crescimento e o desenvolvimento craniofacial (KREIBORG et al., 1978).

Considerando que a cartilagem do PC sofre influência de fatores hormonais e mecânicos, seria esperado que músculos que atuam sobre a articulação temporomandibular (ATM) exerçam alguma influência sobre a estrutura da cartilagem. Na tentativa de explicitar essa situação Yonemitsu, Muramoto e Soma (2007) realizaram um experimento onde o masseter foi seccionado com o intuito de cessar a estimulação mecânica sobre a cartilagem condilar, concluiu-se que a atividade do masseter é importante para o crescimento normal da cartilagem, visto que sem a força muscular houve uma diminuição da espessura de algumas camadas e da cartilagem como um todo. Outro trabalho interessante foi o realizado por Sinsel, Opdebeeck e Guelinckx (2002) que constataram alterações morfológicas em animais que tiveram paralisia na musculatura da expressão facial. Por outro lado, forças excessivas sobre a cartilagem estimulam os condrócitos a aumentarem a síntese do colágeno tipo I e da fibronectina, isso implica prejuízos no crescimento dessa estrutura (COPRAY; JANSEN; DUTERLOO, 1985). A cartilagem condilar é bem conhecida por sua capacidade de se adaptar a partir de estímulos externos durante e depois do crescimento (SHEN; ALI DARENDELILER, 2005). Já está bem sedimentado que mudanças na direção da força aplicada sobre a cartilagem do PC alteram o seu tamanho total (LIU; KANEKO; SOMA, 2007), a sua espessura, a taxa de proliferação e o estado erosivo do osso subcondral (FUENTES et al., 2003; SATO; MURAMOTO; SOMA, 2006), essas alterações são desencadeadas por mudança no posicionamento da mandíbula em relação a fossa condilar do osso temporal.

2. 4 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO CONDILAR DA MANDÍBULA

A cartilagem do PC se origina de células derivadas da crista neural, esta se diferencia das cartilagens que recobrem as superfícies articulares das extremidades articulares, como a cabeça do fêmur e da cartilagem epifisial (YONEMITSU; MURAMOTO; SOMA, 2007). As cartilagens da cabeça do fêmur e da cartilagem epifisial surgem no início do desenvolvimento embrionário e são consideradas como remanescentes do esqueleto cartilagíneo (VINKKA, 1982), por essa razão, são chamadas de cartilagem primária. A cartilagem secundária, dentre elas a sutura intermaxilar, sínfise mandibular e processo coronóide da mandíbula, surge no final do período embrionário e início do desenvolvimento pós-natal (BERESFORD, 1981), estas se desenvolvem nas margens dos ossos membranosos e são consideras como transitórias, porém a cartilagem condilar da mandíbula, apesar de ser secundária, não é transitória (SHEN; ALI DARENDELILER, 2005). O processo de desenvolvimento da cartilagem condilar ocorre por um processo de justaposição de duas cartilagens: uma cartilagem hialina que é central e outra primária que é fibrosa que se localiza perifericamente, esta última confere uma cobertura de tecido conjuntivo fibroso (MIZOGUCHI et al., 1990), o que torna essa cartilagem estruturalmente e funcionalmente diferenciada (HINTON; CARLSON, 2005). As cartilagens primárias caracterizam-se por possuir um potencial de crescimento independente e pela baixa sensibilidade aos hormônios e fatores de crescimento, enquanto a cartilagem secundária é mais sensível à ação destes fatores, além de ser susceptível a alterações de força mecânica que agem sobre a mesma, sendo, por esses motivos, considerado um importante sítio de crescimento do esqueleto cefálico (YONEMITSU; MURAMOTO; SOMA, 2007). Estas cartilagens diferem-se, também, quanto à síntese de fatores de crescimento e a expressão de alguns receptores (TAJIMA et al., 1998; VISNAPUU et al., 2002). A cartilagem do PC influencia no comprimento da mandíbula, este crescimento varia de acordo com a ação dos músculos da mastigação e da face, bem como o tipo de dieta (VAN ERUM et al., 1997; KILIARIDIS et al., 1999; ZHOU et al., 2005), e a predisposição genética (PIRTTINIEMI et al., 2009).

2. 5 CARTILAGEM CONDILAR

A cartilagem condilar é diferenciada das demais cartilagens pela sua composição bioquímica, pelo padrão de organização histológica, pelo metabolismo e pelo comportamento frente a estímulos dos fatores de crescimento e estímulos mecânicos (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004; VON DEN HOFF; DELATTE, 2008). A cartilagem condilar é composta por uma camada articular, responsável pela absorção e dissipação de cargas compressivas, e outra cartilagem hialina, cuja função principal é a ossificação endocondral e um importante sítio de crescimento da mandíbula (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004). Esta cartilagem é constituída de quatro camadas de células bem organizadas e características. Na camada articular encontram-se, principalmente, fibroblastos, fibrócitos e colágeno tipo I. Este colágeno resiste às forças que atuam sobre essa camada durante movimentos mastigatórios e outras forças que agem sobre a cartilagem (HALL, 1995; RAMIREZ-YAÑEZ, 2004), forma uma rede tridimensional na cartilagem, de tal forma que dissipa as cargas atuantes nessa estrutura, além disso, proporciona uma baixa permeabilidade que impede que o líquido intersticial flua por entre a trama colágena, este aspecto confere uma característica viscoelasticidade à cartilagem (MOW; ATESHIAN; SPILKER, 1993; KURODA et al., 2009). Entremeado nesta rede colágena, estão os fibrócitos que apresentam um aspecto fusiforme por está sujeito à cargas compressivas que atuam sobre a superfície articular (PIRTTINIRMI et al., 1995). Inferiormente a articular (a), encontra-se a camada pré-condroblástica (pc) que possui células indiferenciadas ou células mesenquimais com aparência semi-elipisóide com citoplasma pouco evidente, tais células possuem potencial proliferativo capazes de gerar fibroblastos ou condrócitos que podem ir para a camada articular ou para a condroblástica (c). Nesta camada os condrócitos podem dividir-se em duas novas células que ficam juntas inicialmente, porém a medida que estas amadurecem sintetizam matriz extracelular (MEC) e vão se afastando uma das outras (ROSS; PAWLINA, 2012), este crescimento intersticial se torna possível porque a MEC da cartilagem condilar é distensível. Esta camada contem os condroblastos, células de aspecto esferoide com núcleo central prevalecendo sobre o citoplasma, os condroblastos produzem os elementos que compõem a MEC, como o colágeno tipo III. A camada hipertrófica (h), que é caracterizada por condroblastos

hipertrofiados com o loci prevalecendo sobre o núcleo e citoplasma, na parte inferior desta camada nota-se o limite entre a cartilagem e o osso subcondral, motivo pelo qual esta região é conhecida como zona de ossificação endocondral (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004), nesta camada há colágeno tipo III, em menor quantidade, que lhe confere elasticidade e maior resistência mecânica (PIRTTINIRMI et al., 1995). Nessas duas ultimas camadas há uma considerável quantidade de proteoglicanas (versicana, decorina e a agrecana que está em maior concentração) envolvidas na trama de colágeno (ROTH et al., 1997; MAO; RAHEMTULLA; SCOTT, 1998), essas moléculas contribuem para a integridade estrutural e funcional da cartilagem do PC (KURODA et al., 2009).

2. 6 FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA E SEU RECEPTOR

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é um hormônio importante no crescimento somático, auxiliando também no desenvolvimento e da maturação funcional do sistema nervoso, age na inibição da apoptose celular (ANLAR; SULLIVAN; FELDMAN, 1999), no funcionamento adequado dos sistemas imunológico, cardiovascular e reprodutor (ISGAARD et al., 1999). Em casos de deleção do gene do IGF-I, observa-se retardo mental, surdez neuro-sensorial, além do retardo no crescimento corporal (DUAN; REN; GAO, 2010). Esse padrão de ação sistêmica é observado porque o IGF-I é expresso em quase todos os tipos de tecido e tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário (BONDY et al., 1990). Este fator também tem ação no crescimento de ossos longos, no disco epifisário e, em tecido cartilagíneo, estimulando o crescimento pós-natal dos condrócitos (SCHEVEN; HAMILTON, 1993). Scheven e Hamilton (1991) observaram que a ação IGF-I, no crescimento do processo condilar da mandibular, se dar principalmente nas camadas pré-condroblástica e condroblástica da cartilagem do PC.

O receptor do IGF-I, IGF-IR, é composto de duas subunidades, duas alfas que são extracelulares e duas subunidades betas que são transmembrânicas (LARON, 2001). As subunidades alfas possuem os receptores do IGF-I e são unidas por uma ponte disulfeto, enquanto as subunidades betas são compostas por três partes: uma pequena parte extracelular, uma transmembrânica e uma intracelular. A parte intracelular está intimamente relacionada com a enzima tirosina kinase, que retransmite o sinal desencadeado pela ligação do IGF-I em uma cascata intracelular (LARON, 2001). O IGF-IR possui sete segmentos transmembrânicos que estão conectados internamente a uma proteína ligante de GDP (guanosina difosfato), quando ocorre uma ligação do fator de crescimento ao receptor, o GDP se dissocia do complexo e ativa de uma enzima, adenilatociclase, que traduz o sinal do IGF-I em forma de um mensageiro secundário, os AMP's cíclicos, que desencadeiam uma cascata enzimática que vai agir no núcleo estimulado a síntese de terminadas proteínas (LEROITH et al., 1995; NELSON; COX, 2002).

Dependendo do local onde o IGF-I for sintetizado, observa-se um determinado tipo de ação, ou seja, pode atuar de uma forma endócrina, autócrina ou parácrina (D'ERCOLE; APPLEWHITE; UNDERWOOD, 1980; NILSSON et al., 1986). Na camada pré-condroblástica da cartilagem do PC nota-se uma menor quantidade de receptores do IGF-I, enquanto na camada condroblástica há uma maior concentração desses receptores (PATIL; SABLE; KOTHARI, 2012), tal disposição evidencia o potencial proliferativo existente nessa camada condroblástica. O IGF-I desempenha uma importante função na matriz extracelular da cartilagem, pois atua estimulando a síntese e o catabolismo dos proteoglicanos (MCQUILLAN et al,. 1986).

2. 7 MODELOS DE ANIMAIS DE DISTROFIA MUSCULAR

Muitos modelos animais para a investigação da distrofia muscular foram e estão sendo estudados para se alcançar uma melhor compreensão e entendimento dessa doença. Esses modelos animais, em geral, apresentam alterações fisiológicas muito semelhantes as que são observadas em seres humanos e, por isso, eles representam um modelo interessante para estudos genéticos, histopatológicos e clínicos. A grande vantagem desses modelos animais é sua disponibilidade no meio científico para realizar várias abordagens terapêuticas possibilitando avanços nessa área (VAINZOF et al., 2008). O camundongo mdx (distrofia muscular ligada ao cromossomo x de camundongos) é amplamente utilizado como modelo para estudar a DMD. Esse modelo foi descrito pela primeira vez em 1984, onde alguns pesquisadores observaram níveis séricos elevados de enzimas musculares como à creatina kinase e a piruvato kinase, além de lesões musculares características de portadores da DMD (BULFIELD et al., 1984). Por essas razões o camundongo mdx foi escolhido para ser o modelo de estudo da distrofia muscular de Duchenne.

Sicinski et al. (1989) fez uma analise molecular para tentar identificar onde ocorre a mutação do mdx, foi encontrado que esta ocorre pela substituição de uma base nitrogenada no exon 23. Tal situação resulta em uma parada do codon do gene da distrofina e tem como consequência a ausência da proteína distrofia no músculo esquelético (HOFFMAM; BROWN JR; KUNKEL, 1987). A ausência da distrofina pode afetar a posição de outras proteínas do complexo distrofina-glicoproteínas (OHLENDIECK; CAMPBELL, 1991), consequentemente, haverá lesões em decorrência da fragilidade da membrana celular.

Os camundongos mdx são um bom modelo animal para estudar a DMD, por apresentar o desenvolvimento de fibrose muscular e degeneração muscular, todavia não apresentam o fenótipo característico observado nos pacientes de DMD, como uma fibrose intensa e substituição do tecido muscular por tecido adiposo, que, conseqüentemente, causa uma pseudo-hipertrofia da musculatura (COOPER, 1989). Quando se compara os camundongos mdx com os cachorros (distrofia muscular ligada ao cromossomo x de cão) da raça Golden Retriever, estes apresentam um fenótipo bastante variado da DMD com fibrose severa, dificuldades durante a macha (VAINZOF et al., 2008), além do custo elevado na manutenção dos animais e da dificuldade de mantê-los em um local como um laboratório de pesquisa. Por tais motivos se adotou os camundongos para realizar este projeto de pesquisa.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

A fim de se avaliar se a cartilagem do PC de camundongos MDX é susceptível à ausência de distrofina, com o emprego de técnicas rotineiras de histologia e imunohistoquímicas serão determinados, qualitativa e quantitativamente:

1. Os aspectos dos componentes celulares e da estrutura de colágeno;
2. A expressão do IGF-I e de seu receptor (IGF-IR).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

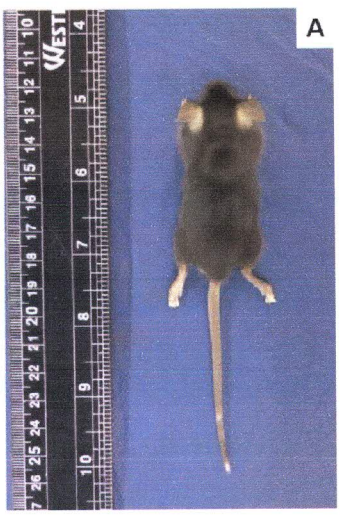
Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/ USP), sob o protocolo 2175.2011.

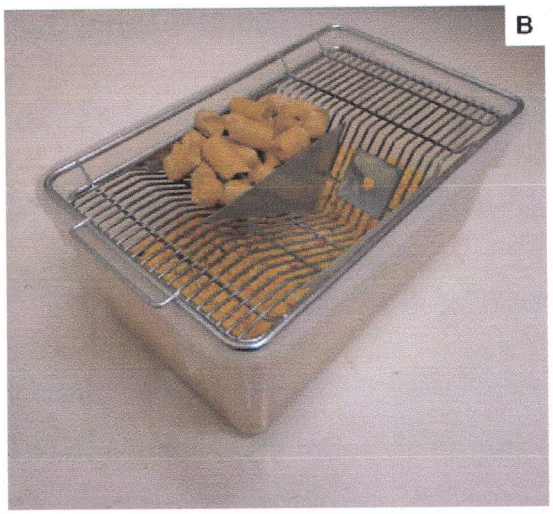
4.1 PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS E FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos C57BL/10 normais (grupo controle - **c**) e da linhagem mdx (portadores de distrofia muscular – grupo experimental - **e**) provenientes do biotério da Associação de Amigos dos Portadores de Distrofia Muscular (AADM) em parceria com a Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), do Centro de Criação de Animais de Laboratórios (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz.

Acomodados em gaiolas de polipropileno com uma grade metálica, cada uma contendo de quatro a cinco indivíduos, os animais dos dois grupos foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo sob condições controladas de temperatura (entre 23º e 25ºC), e luz com ciclos claro/ escuro de 12 horas, sem restrições de ração e água (Figura 1).

Figura 1 **–** Camundongo C57BL/10 (A) e gaiola onde os animais foram mantidos (B)





Para a formação dos grupos (n=5), os animais foram divididos de acordo com a sua condição (normal e portador de distrofia) e a idade (4 semanas - fase pré-púbere, e 10 semanas – fase pós-púbere). Desta forma, obteve-se os seguintes grupos: **c4** – cmundongos normais, com 4 semanas de idade; **e4** – camundongos mdx, com 4 semanas de idade; **c10** – cmundongos normais, com 10 semanas de idade, e **e10** – camundongos MDX, com 10 semanas de idade.

4.1.1 ESTRATÉGIA PARA A DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ANIMAIS

O número de animais submetidos às diferentes técnicas foi determinado de acordo com o preconizado por CRUZ-ORIVE e WEIBEL (1990), relativamente ao aumento ou diminuição de determinado parâmetro. Desta forma, estabeleceu-se como probabilidade para que isto ocorra P= 0,5.

Ao se determinar um número de 5 animais por experimento, tivemos:

$$\mathbf{P} = (0{,}5)^{\text{eventos}},$$

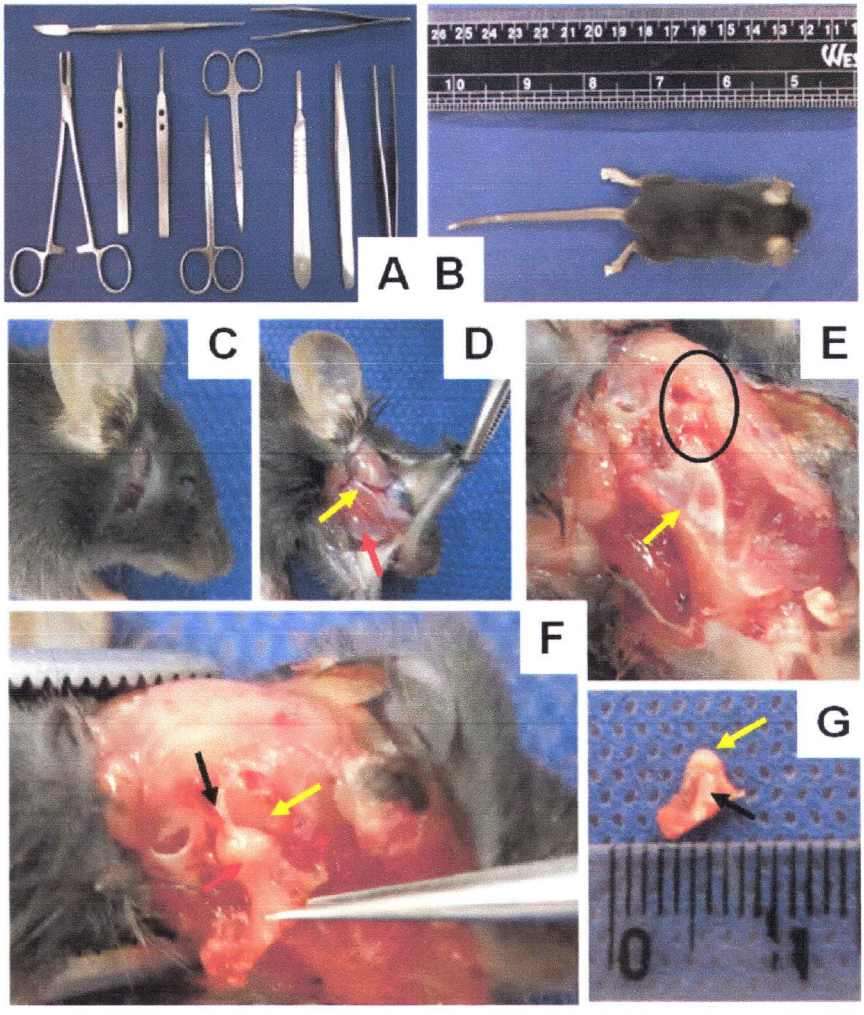
$$\mathbf{P} = (0{,}5)^{5},$$

P= 0,03, sendo **P<0,05**

4.2 OBTENÇÃO DO PROCESSO CONDILAR DA MANDÍBULA (PC)

Para a remoção bilateral do PC dos animais de todos os grupos (c4; e4; c10; e10) os mesmos foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO_2) do Biotério do Departamento de Anatomia – ICB-USP e imediatamente submetidos a uma cirurgia, que constou das seguintes fases: identificado o arco zigomático através da palpação, realizou-se inferiormente a este, uma incisão ventro-dorsal na pele da região pré-auricular, a fim de se expor o arco zigomático e o músculo masseter, que foi removido juntamente com os músculos pterigóideos lateral e medial. Em seguida, após aberta a cápsula articular da ATM, realizou-se uma secção obliqua na mandíbula, desde o processo coronóide até o ângulo da mandíbula, a fim de se tracionar e retirar cuidadosamente o PC no sentido lateral (Figura 2).

Figura 2 – Etapas da obtenção do PC nos diferentes grupos (C4, C10, E4 e E10)



A) Material cirúrgico utilizado; B) Animal posicionado ao lado de uma régua utilizada para a determinação de seu comprimento. Notar a proporção da cabeça; C) Exposição do arco zigomático (seta amarela) e do músculo masseter (seta vermelha); E) Exposição do ramo da mandíbula (seta amarela) e da articulação temporomandibular (círculo), após remoção do arco zigomático e do m. masseter; F) Exposição da fossa mandibular (seta amarela) e do PC (seta vermelha), após incisão na capsula articular (seta preta); G) PC (seta preta) removido, evidenciando-se o seu revestimento cartilagíneo (seta amarela).

4.3 MICROSCOPIA DE LUZ

A fim de serem submetidos às diferentes técnicas rotineiras de microscopia de luz, os PCs direito e esquerdo dos animais de todos os grupos foram fixados por imersão em solução de Bouin durante 8 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados de acordo com o preconizado por Morse (1945), sendo imersos por um período mínimo de 90 dias em uma solução contendo 50% de ácido fórmico e 20% de citrato de sódio, trocada em intervalos de 48 horas. Depois de confirmada a descalcificação, avaliada através de teste do conteúdo mineral de cada espécime (que consistiu em se adicionar à solução descalcificadora uma solução de oxalato de amônio a 5%), os mesmos foram lavados em água destilada, desidratados em série crescente de alcoóis (do 70% ao absoluto) durante 30 minutos, diafanizados em xilol por 30 minutos, e incluídos em parafina. Cortes semi-seriados de 5 µm no plano sagital foram realizados em um micrótomo (Leica SM 2000 R) e, após desparafinados, foram submetidos às diferentes técnicas.

4.3.1 TÉCNICAS ROTINEIRAS

Foram empregadas as colorações da hematoxilina-eosina (HE) para avaliação dos tecidos em geral; da Safranina-O (Sigma), para a evidenciação da matriz cartilagínea (LUNA, 1968), e do picrosirius avaliado sob luz polarizada, a fim de se distinguir o tipos de fibras colágenas (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979).

4.3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA

A imunorreatividade dos espécimes ao IGF-I e IGF-I R (receptor) foi detectada, após o seguinte processamento dos cortes: 1 - reidratação, com a passagem em série decrescente álcoois (do 70% até o 50% - 2 min. cada) seguida por uma lavagem em água destilada por 5 minutos; 2 - Desmascaramento antigênico com pepsina 0,4% em Hcl 0.01 N; 3 – Passagem em peróxido de hidrogênio á 3% em metanol por 5 minutos; 4 – Lavagem em PBS por 5 minutos; 5 – Bloqueio de proteínas com leite desnatado em PBS; 6 – secagem das lâminas; 7 - incubação em soro de cabra (S-1000, Vector), na proporção 1:5 em solução tamponada com fosfato pH 7,3 (PBS) a 37° C por 1 hora.

Em seguida, para a marcação do IGF-I e de seu receptor foram utilizados anticorpo anti-IGF –I e anti-IGF –IR (Santa Cruz Biotechnology - Santa Cruz, CA), na diluição 1:250, que por prévia titulação foi considerada a mais adequada para ambas as substâncias. Todas as reações foram acompanhadas por uma ou mais lâminas controle, submetidas a todas as etapas do procedimento suprimindo-se, entretanto, a aplicação do anticorpo primário.

As lâminas assim tratadas foram incubadas com o anticorpo primário, nas diluições descritas anteriormente, por 2 horas a 4° C em câmara úmida. Posteriormente, as mesmas foram lavadas em PBS (4×10 min) e incubadas em anti mouse de igG biotinilado (H-70 – Santa Crus, Biotechnology) na proporção de 1:200; lavadas com Triton à 0,01% diluído em PBS (3×10 min); incubadas em Vectain ABC diluído em tampão fosfato por 30 minutos; lavadas com PBS por 5 minutos; reagidas com DAB (Vector Laboratories) por 8 minutos; logo depois passaram pelos procedimentos histológicos e montagem das lâminas.

Após montados entre lâmina e lamínulas com Entellan (Merck), os espécimes corados pelas técnicas rotineiras de histologia e de imunohistoquimica foram avaliados sob um microscópio binocular (Axioscope 40, Zeiss), acoplado a um sistema de análise de imagem (Axiovision Rel. 4.8[1]).

4.4 ESTUDO QUANTITATIVO

[1] Carl Zeiss

Para a determinação dos aspectos morfométricos, foram utilizadas as lâminas coradas pelo método da H.E., e imunorreativas ao IGF-I e ao IGF-IR.

4.4.1 ÁREA DA CARTILAGEM DO PC

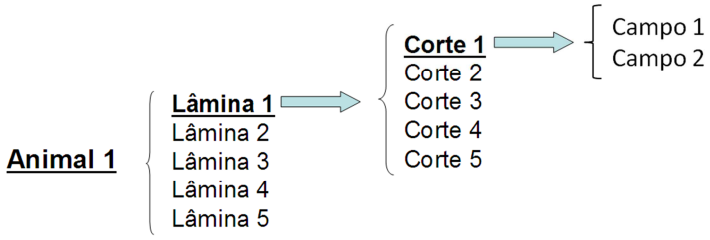
Em imagens obtidas do PC nas lâminas coradas com HE, determinou-se a área da cartilagem do PC (em mm^2), com o auxílio do programa Axiovision Rel. 4.8 (Figura 3).

Figura 3 – Determinação da área da cartilagem do PC

4.4.2 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DA MATRIZ CARTILAGÍNEA DO PC

A fim de se estabelecer o menor tamanho da amostra para esta densidade, passível de ser analisado com resultados estatisticamente significativos, adotou-se a

regra da **amostra progressiva** (MANDARIM-DE-LACERDA, 1991). O exemplo a seguir, aplicado ao animal 1 é válido para os demais (2 a 5).

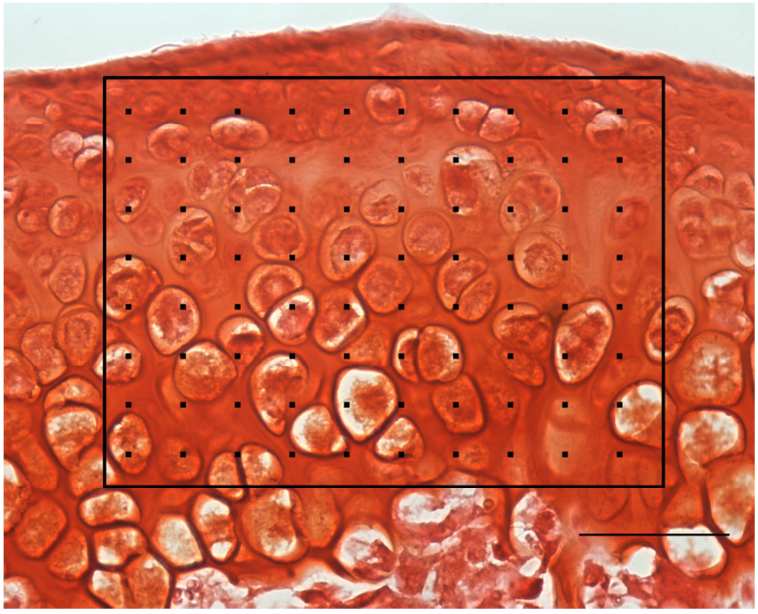


Como, com essa metodologia, seriam contados 50 campos por animal (ou seja, 250 campos para um grupo de 5 animais, um número extremamente excessivo) aplicou-se a seguinte fórmula, preconizada por HALLY (1964):

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

Desta forma, estabeleceu-se preliminarmente, em alguns campos, a densidade de volume dos condrócitos (Vv), de acordo com um sistema teste (P_T) contendo 80 pontos, conforme ilustra a figura 4.

Figura 4 – Campo microscópico da parte média da cartilagem condilar da mandíbula, com o sistema teste de 80 pontos



(Safranina-O. Barra de calibração 50 µm)

De acordo com esse sistema-teste, foi determinado no campo, o número de pontos (P_p) que incidiram sobre a matriz extracelular; no caso, uma média de 20 pontos, cerca de 25% dos pontos totais.

Aplicando-se a seguinte fórmula

$$Vv = \frac{Pp}{P_T}$$

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

$$0{,}05 = \sqrt{\frac{1 - 0{,}25}{n}}$$

então,

$$(0{,}05)^2 = \left(\sqrt{\frac{0{,}75}{n}}\right)^2$$

portanto,

0,0025 = 0,75 ou seja,

n = 300 pontos

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

$$\textbf{n corrigido} = \frac{\text{n calculado}}{Vv}$$

assim,

n corrigido = 300 = **2200 pontos**

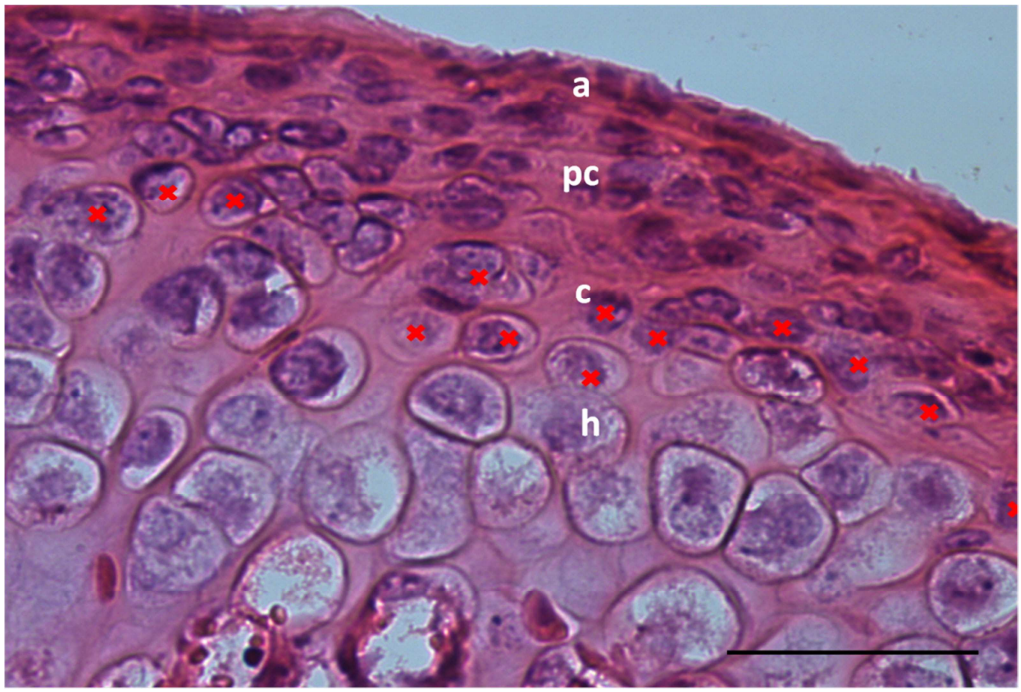
0,25

Desta maneira, para a determinação da densidade da matriz cartilagínea, foram contados **27 campos** (com 0,196 mm^2) para cada animal de cada grupo de estudo.

4.4.3 NÚMERO ESTIMADO DE CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC

Nas lâminas coradas pelo método da Hematoxilina-Eosina, foram obtidas imagens da parte central da cartilagem do PC, utilizando-se o sistema de análise de imagem previamente descrito (item 4.4.2) com objetiva de 40X, onde foram contados todos os condrócitos da camada condroblástica (Figura 5).

Figura 5 – Parte central do PC evidenciando as camadas constituintes da cartilagem articular

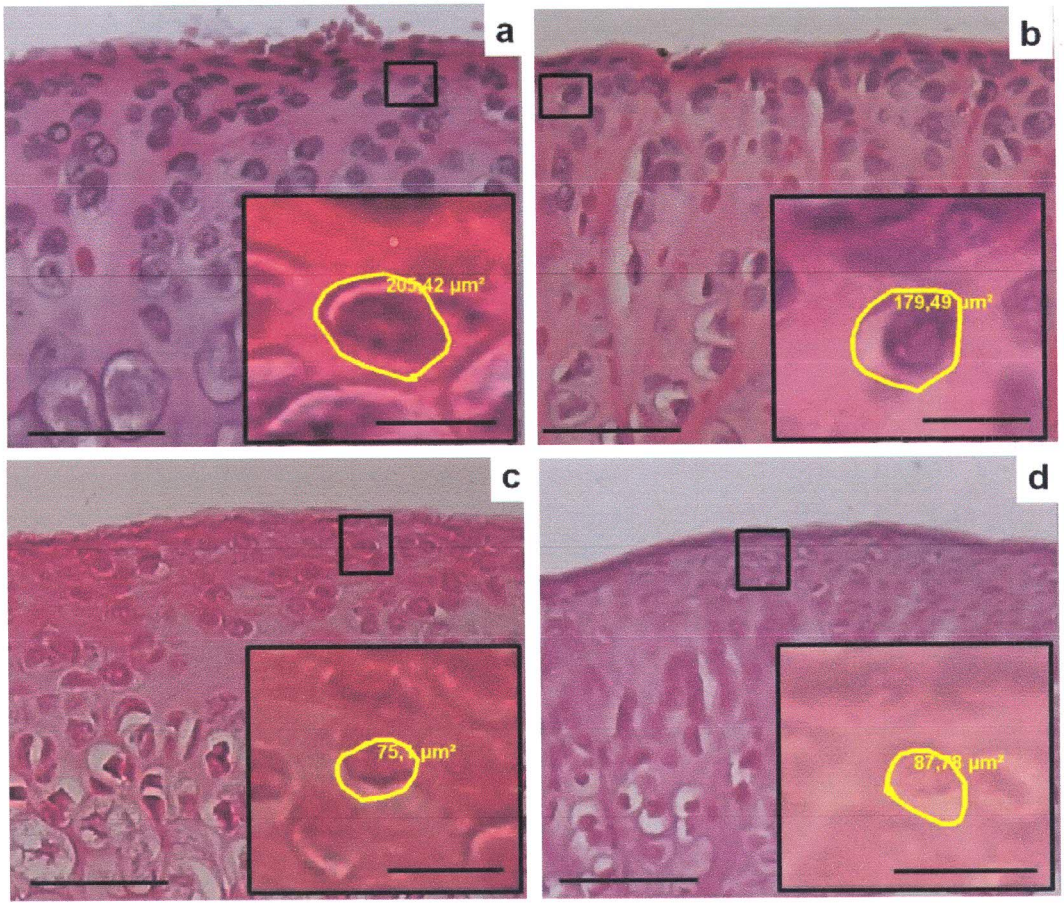


Notar os condrócitos (x) assinalados na camada condroblástica (c). (a- camada articular; pc- camada pré-condroblástica; h- camada hipertrófica. HE. Barra de calibração: 50 µm).

4.4.4 ÁREA DOS CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC

Esse parâmetro foi determinado nas imagens obtidas no item anterior para cada animal, onde 5 condrócitos escolhidos aleatoriamente, tiveram a sua área determinada em μm^2 (Figura 6).

Figura 6 – Exemplo da determinação da área de três condrócitos da camada condroblástica do PC

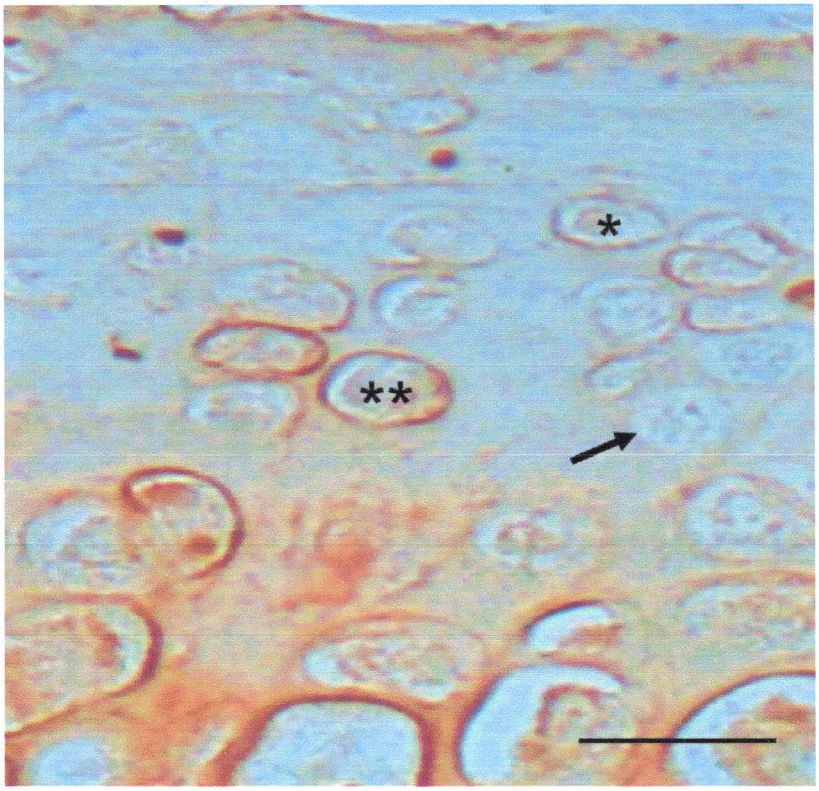


C4 (a), C10 (b), E4 (c) e E10 (d), e em maior aumento um exemplo da medição da área de um condrócitos (Barra de calibração 10 µm). (HE. Barra de calibração: 50 µm).

4.4.5 IMUNORREATIVIDADE

Nas lâminas da parte central do PC processadas para o IGF-I e ao IGF-IR foram obtidas imagens onde se avaliou o número de células de acordo com um padrão de imunorreatividade considerado em três níveis: fortemente reativas, fracamente reativas e não reativas (Figura 7).

Figura 7 – Padrões estabelecidos para a avaliação em imunohistoquímica para o IGF-I e o IGF-IR



Células intensamente reativas (**); fracamente reativas (*) e não reativas (seta). (Barra de calibração: 25 µm).

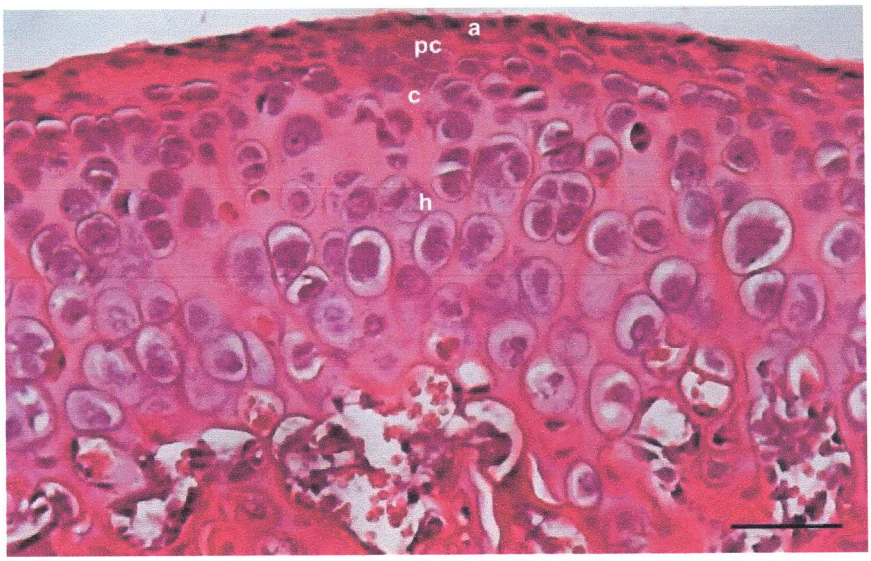
4.5 ESTUDO QUALITATIVO

4.51 DESCRIÇÃO DAS CAMADAS DA CARTILAGEM DO PC

Foram obtidas imagens da parte central da cartilagem do PC em lâminas coradas pelo método da Hematoxilina-Eosina, utilizando-se o sistema de análise de

imagem previamente descrito (item 4.4.2) com objetiva de 40X, onde foram descritas as camadas constituintes da cartilagem do PC (Figura 8).

Figura 8 – Camadas constituintes do PC

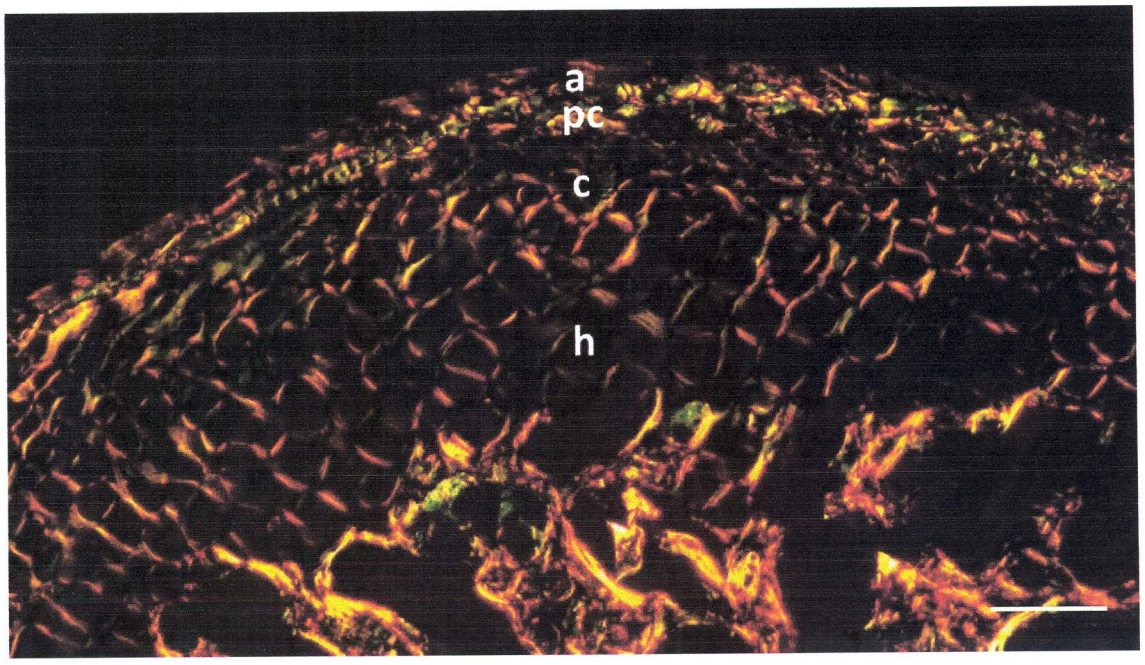


a- camada articular; pc- camada pré-condroblástica; h- camada hipertrófica. (HE. Barra de calibração: 50 µm).

4.5.2 TIPIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS NA CARTILAGEM DO PC

Nas lâminas coradas pelo método do Picrosirius, foram obtidas imagens sob luz polarizada, a fim de se avaliar nos grupos estudados, o padrão de distribuição das fibras colágenas. Assim, foram classificadas como do tipo I aquelas com maior espessura, fortemente birrefringentes e expressas nas cores amarela, laranja e vermelha, e as do tipo III, delgadas, fracamente birrefringentes, e evidenciadas na cor verde (Figura 9).

Figura 9 – Padrão de distribuição das fibras colágenas na cartilagem do PC



Colágeno tipo I (amarela, laranja e vermelha) e III (verde) nas diferentes camadas da cartilagem do PC. (a- articular; pc- pré-condroblástica; c- condroblástica; h- hipertrófica). (Barra de calibração: 50 µm).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada levando-se em consideração os princípios de amostragem sistemática e uniformemente aleatória (GUNDERSEN et al., 1999) onde para as variáveis com distribuição simétrica e igualdade de variância (homocedasticidade), foi utilizado o teste one way ANOVA seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% (ZAR, 1984), com valores considerados significativos quando a probabilidade e índice de significância (p) apresentaram-se menores que 0,05 ($p<0,05$).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA

De acordo com as metodologias empregadas, serão descritos, além do peso dos animais, os resultados dos seguintes parâmetros avaliados na cartilagem do PC: área total da cartilagem; número e área dos condrócitos da camada condroblástica e condrócitos imunorreativos ao IGF-I e ao IGF-IR.

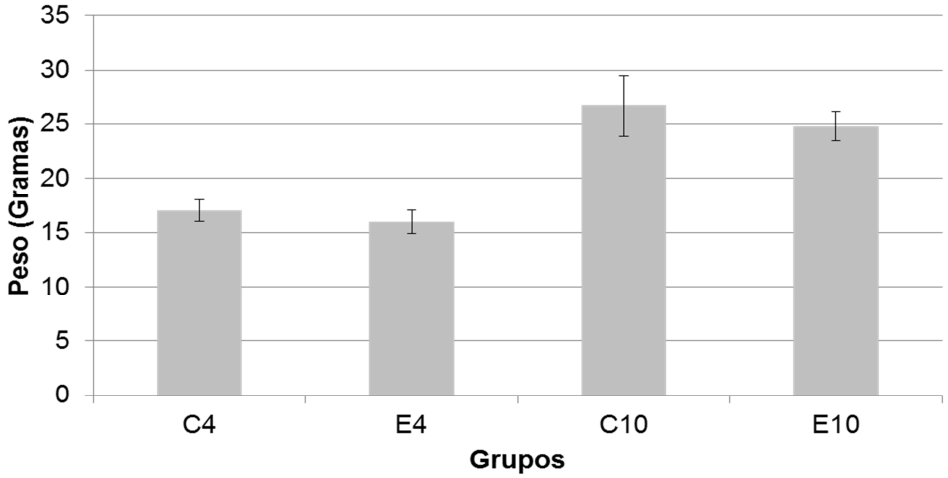
5.1.1 PESO DOS ANIMAIS

As médias do peso corporal dos animais de todos os grupos avaliados na presente pesquisa, estão representadas na tabela 1 e figura 10. Observou-se que, muito embora os animais dos grupos E4 e E10 (MDX) tenham apresentado o peso corporal menor do que os respectivos controles C4 e C10 (C57BL/10), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre esses grupos.

Tabela 1 – Média (± desvio padrão) do peso (em gramas) dos animais dos grupos Controle (C4, C10) e Experimental (E4, E10)

Grupos	Peso (g)
C4	17,0 ± 1,0
E4	16,0 ± 1,1
C10	26,7± 2,8
E10	24,8±1,3

Figura 10 – Representação gráfica da Média do Peso Corporal

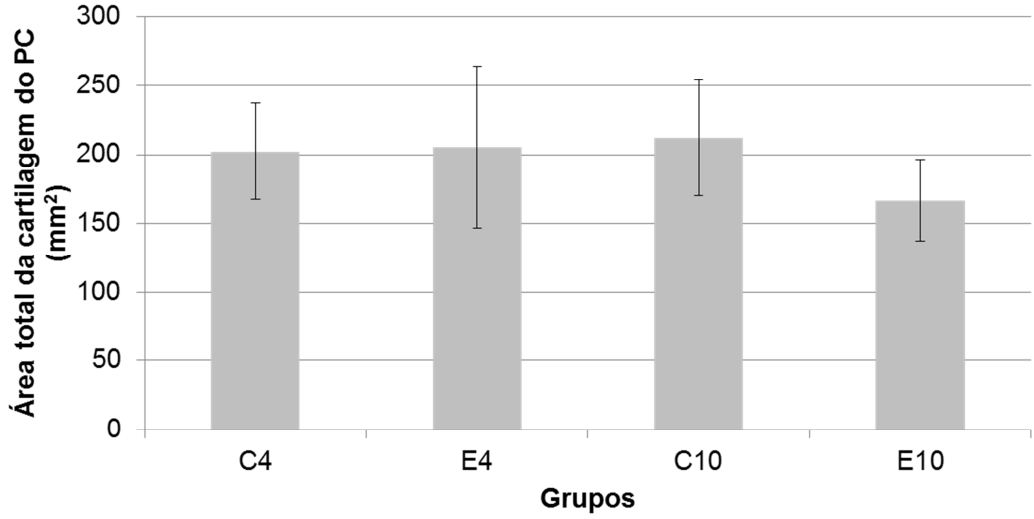


Animais MDX (E4, E10) e C57BL/10 (C4, C10).

5.1.2 ÁREA DA CARTILAGEM DO PC

Relativamente a esse parâmetro, verificou-se que a média do grupo C4 (202,12mm^2) foi semelhante àquela do grupo C10 (211,91 mm^2). Ao se comparar os grupos experimentais, observou-se que a do grupo E4 (205,56 mm^2) não foi significativa aos controles de 4 e de 10 dias (C4 e C10), porém, aquela determinada para o grupo E10 (166,81 mm^2) foi significativamente menor do que as dos demais grupos. Contudo, estatisticamente não foi detectado nenhuma diferença significante entre os grupos controle e MDX (p=0,290) e nem entre animais com 4 e 10 semanas de idade (p=0,221) (Figura 11).

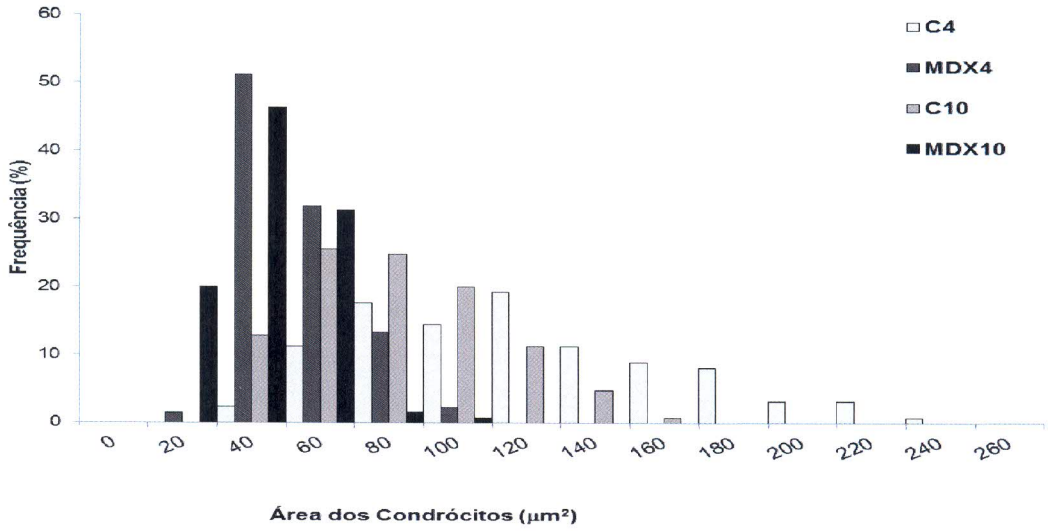
Figura 11 – Média da área total da cartilagem do PC nos grupos MDX (E4, E10) e C57BL/10 (C4, C10)



5.1.3 ÁREA DOS CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC

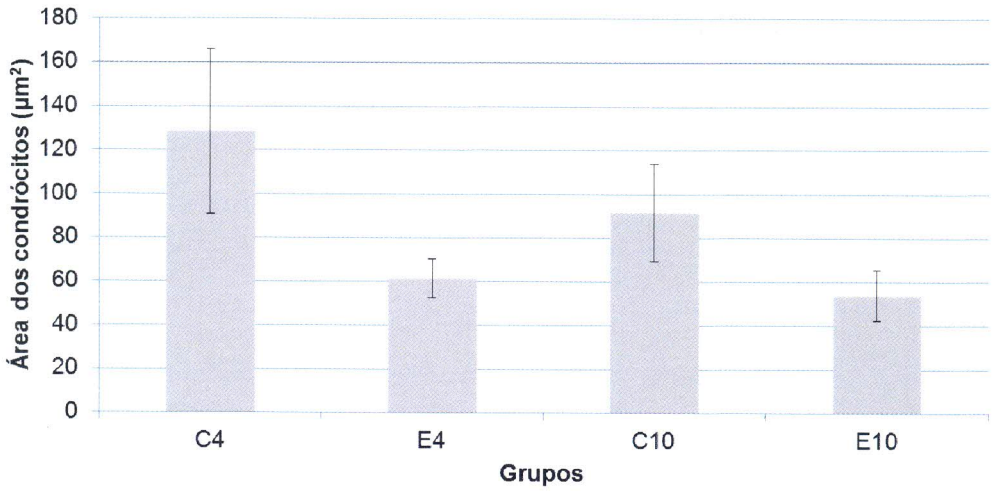
Na figura 12 encontra-se o padrão de distribuição das áreas dos condrócitos dos diferentes grupos. A sua análise permite verificar que, nos grupos experimentais (E4, E10), aproximadamente 50% dessas células estão concentradas no intervalo entre 20 e 80 μm^2. Nos grupos controle, 40% dos condrócitos do grupo C4 estão concentrados nos intervalos entre 60 e 80 μm^2 e entre 100 e 140 μm^2, ao passo que no grupo E10, a distribuição é mais ampla, com somente 25% das células concentradas no intervalo entre 60 e 90 μm^2.

Figura 12 – Padrão de distribuição da área dos condrócitos da cartilagem do PC (μm^2)



Em relação à média das áreas, ao se comparar estatisticamente os grupos controle, verificou-se que a média do grupo C4 (128,3 μm^2) foi maior em relação ao grupo C10 (91,5 μm^2). Quanto aos grupos experimentais, a média do grupo E4 (91,3 μm^2) foi maior do que a verificada para o grupo E10 (53,8 μm^2); este, a menor média de todos os grupos (Figura 13).

Figura 13 – Área dos condrócitos total da cartilagem do PC (μm^2)



Houve diferença estatisticamente significante entre MDX e controle ($p<0,001$) e entre 4 e 10 semanas ($p=0,046$).

5.1.4 NÚMERO DOS CONDRÓCITOS DA CAMADA CONDROBLÁSTICA DO PC

Na tabela 2, estão expressos os dados relativos ao número de condrócitos sob a forma de média ± desvio padrão.

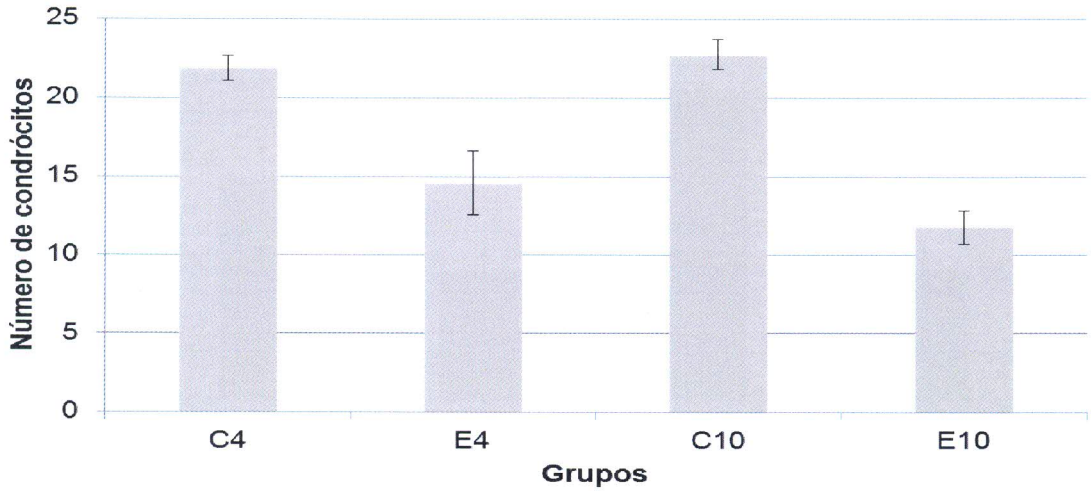
Tabela 2 – Número de condrócitos (média±dp) da camada condroblástica nos grupos Controle e Experimental

Grupos	Número de condrócitos camada condroblástica
C4	21,8 ± 0,79*
E4	14,5 ± 2,0*
C10	22,7± 0,9**
E10	11,7±1,0**

Médias seguidas por um ou dois asteríscos se difereciam estatisticamente ANOVA (P<0,05).

Verificou-se que, tanto entre os grupos controle (C4, C10) como entre os grupos experimentais (E4, E10), não ocorreram diferenças estatisticamente significantes. Ao comparar os grupos experimentais com os respectivos controles (E4/C4 e E10/C10), os animais mdx apresentaram um número bem reduzido de condrócitos (Figura 14).

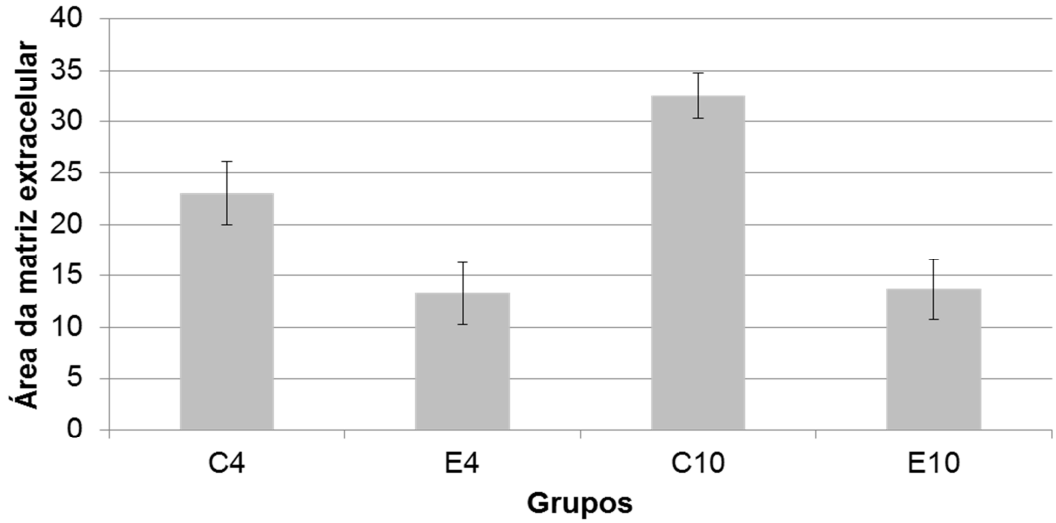
Figura 14 – Número de condrócitos da região central da camada condroblástica



5.1.5. ÁREA DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Com relação à média da porcentagem de área ocupada pela MEC na cartilagem do PC, observou-se que a do grupo C4 (23,0 ± 13,1) foi menor do que aquela apresentada pelo grupo C10 (32,5 ± 2,2). Já a média demonstrada pelo grupo E4 (13,3 ± 3,0) não diferiu estatisticamente da média apresentada pelo grupo E10 (13,7 ± 2,8). Comparando-se estatisticamente os grupos experimentais com os respectivos controles, tanto o grupo E4 como o E10 exibiram médias menores. (Figura 15).

Figura 15 – Médias da porcentagem ocupada pela MEC na cartilagem do PC



5.1.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

5.1.6.1 NÚMERO DE CONDRÓCITOS IMUNORREATIVOS AO IGF-I E CORRELAÇÃO COM O NÚMERO TOTAL

A tabela 3 contém os dados relativos ao número de condrócitos forte (++) e fracamente (+ -) imunorreativos ao IGF-I, bem como a correlação com o número total estimado obtido nas lâminas coradas com HE (item 6.1.4).

Tabela 3 – Médias do número de condrócitos imunorreativos ao IGF-I e da correlação com o número total, nos grupos Controle e Experimental

Grupos	Nº condrócitos	IGF-I++	IGF-I+-	condrócitos/ IGF-I ++	condrócitos/ IGF-I +-
C4	21,8±0,79	5,65±0,75	10,32±1,06	0,25±0,03	0,47±0,05
E4	14,5±2,01	4,40±0,59	9,16±1,56	0,31±0,07	0,61±0,02
C10	22,7±0,95	6,00±1,27*	11,35±0,78*	0,27±0,05	0,51±0,03
E10	11,8±1,04	2,81±0,82*	6,67±1,86*	0,25±0,06	0,59±0,17

Médias seguidas por um asteríscos se difereciam estatisticamente ANOVA (P<0,05).

Com esses dados, observa-se que a porcentagem de condrócitos fortemente imunorreativos foi de aproximadamente 25%, 31%, 27% e 25%, respectivamente nos grupos C4, E4, C10 e E10 sendo, na mesma ordem, de 47%, 61%, 51% e 59%, a de fracamente reativos. Estatisticamente, quanto a esses parâmetros, foram detectadas diferenças significativas tanto no grupo C10 como E10 onde a média dos condrócitos fracamente imunorreativos foi maior do que a dos fortemente imunorreativos (p<0,05), e entre C10 e E10, onde ambas as médias do grupo experimental foram menores (Figura 16).

Quanto às correlações, não ocorreram diferenças entre os grupos (p=0,133) (Figura 17).

Figura 16 – Média do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I nos diferentes grupos

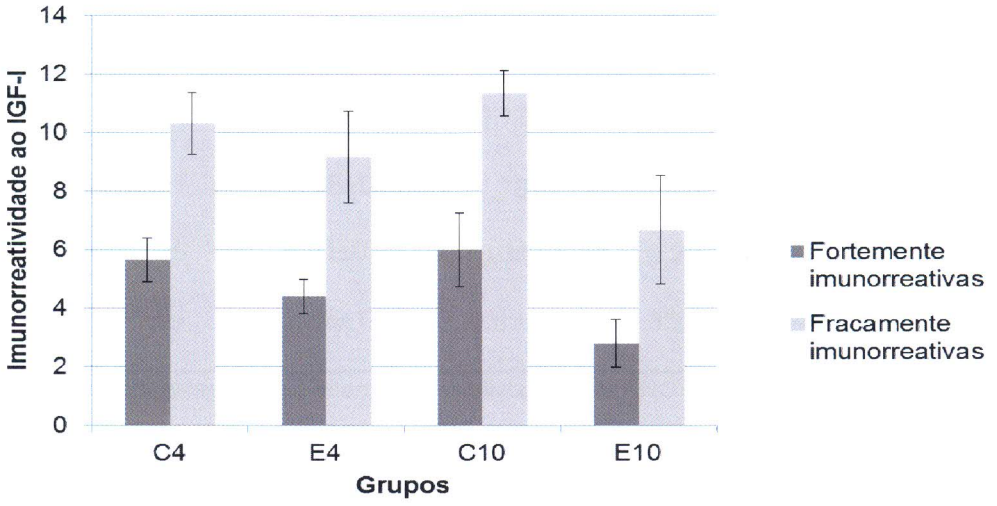
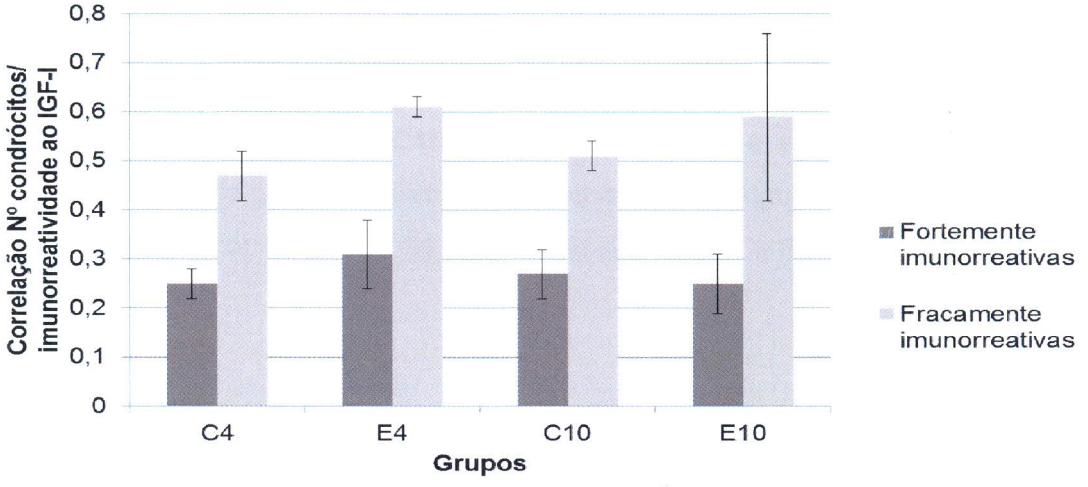


Figura 17 – Média da correlação do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I com o número total estimado de condrócitos, nos diferentes grupos



5.1.6.2 NÚMERO DE CONDRÓCITOS IMUNORREATIVOS AO IGF-IR E CORRELAÇÃO COM O NÚMERO TOTAL

A tabela 4 contém os dados relativos ao número de condrócitos forte (++) e fracamente (+ -) imunorreativos ao IGF-IR, bem como a correlação com o número total estimado obtido nas lâminas coradas com HE (item 6.1.4).

Tabela 4 – Médias do número de condrócitos imunorreativos ao IGF-IR e da correlação com o número total, nos grupos Controle e Experimental

Grupos	Nº condrócitos	IGF-IR++	IGF-IR+-	condrócitos/ IGF-IR ++	condrócitos/ IGF-IR +-
C4	21,8±0,79	3,69±0,67	8,12±1,83	0,18±0,02	0,40±0,07
E4	14,5±2,01	3,86±0,55	7,78±0,77	0,26±0,01	0,55±0,01
C10	22,7±0,95	4,51±0,72*	10,36±0,20*	0,20±0,04	0,46±0,01
E10	11,8±1,04	2,62±1,03*	5,87±1,58*	0,22±0,09	0,50±0,14

Médias seguidas por asteríscos se difereciam estatisticamente ANOVA (P<0,05).

Com esses dados, observa-se que a porcentagem de condrócitos fortemente imunorreativos foi de aproximadamente 18%, 26%, 20% e 22%, respectivamente nos grupos C4, E4, C10 e E10 sendo, na mesma ordem, de 40%, 55%, 46% e 50%, a de fracamente reativos. Estatisticamente, quanto a esses parâmetros, foram detectadas as mesmas diferenças significativas verificadas para o IGF-I, ou seja, a média dos condrócitos fracamente imunorreativos foi maior do que a dos fortemente imunorreativos tanto no grupo C10 como E10 ($p<0,05$), e entre C10 e E10, onde ambas as médias do grupo experimental foram menores (Figura 18).

Quanto às correlações, não ocorreram diferenças entre os grupos ($p=0,15$) (Figura 19).

Figura 18 – Média do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I nos diferentes grupos

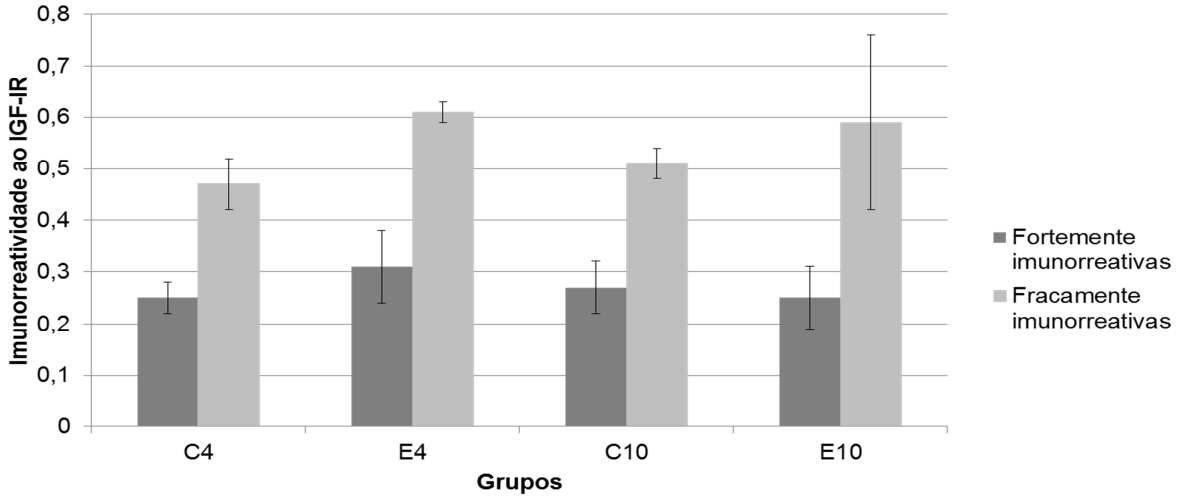
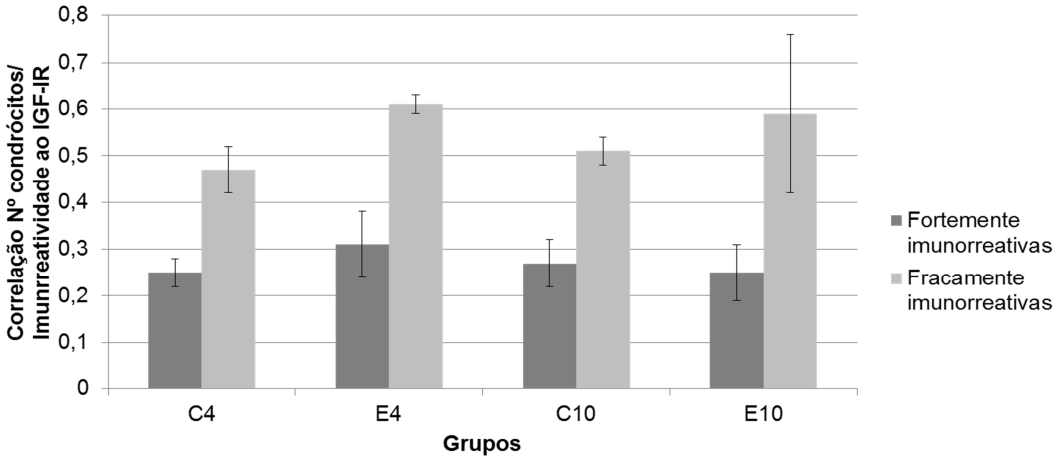


Figura 19 – Média da correlação do número de condrócitos forte e fracamente imunorreativos ao IGF-I com o número total estimado de condrócitos, nos diferentes grupos



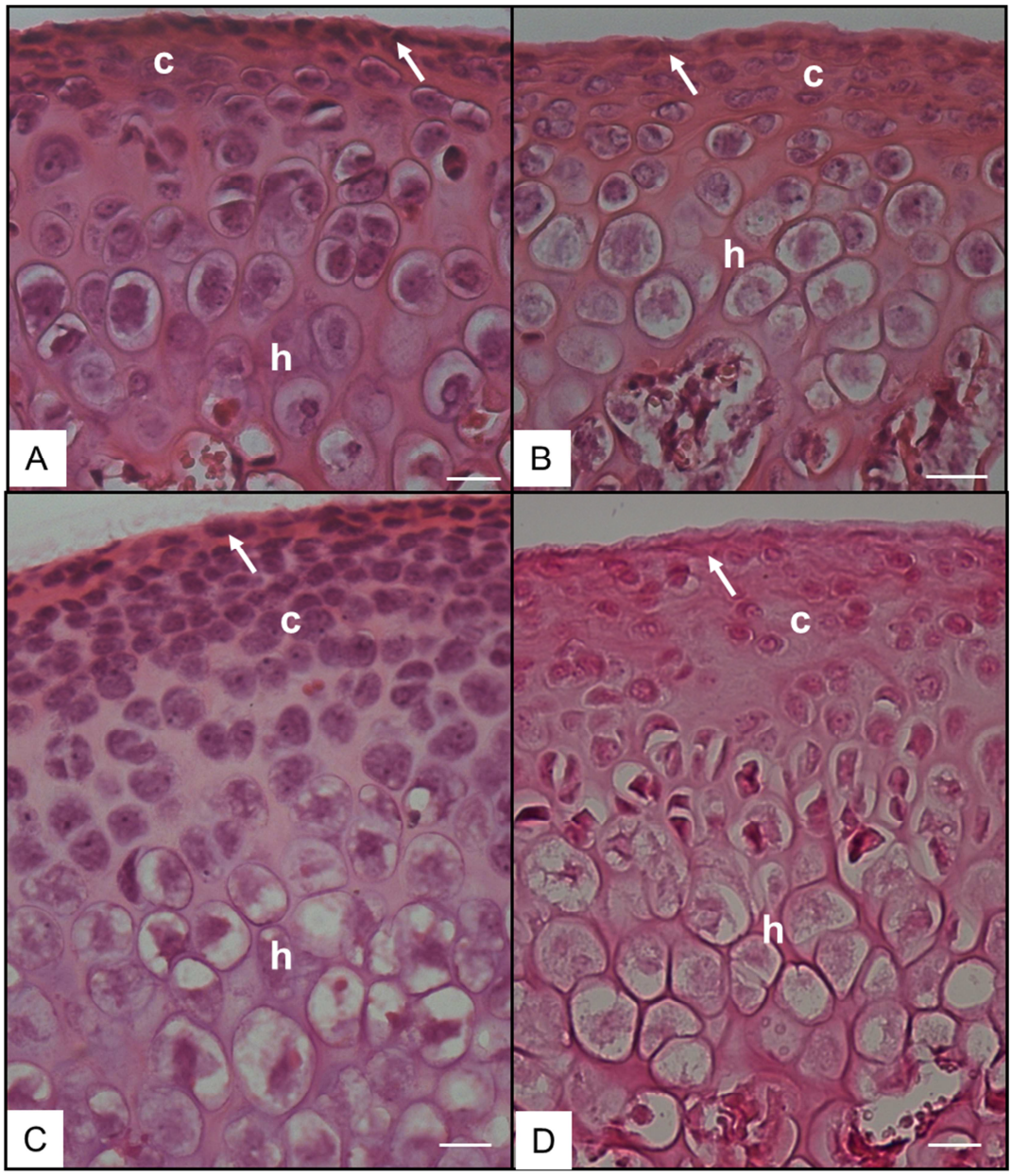
5.2 ANÁLISE QUALITATIVA

5.2.1 EVIDENCIAÇÃO DAS CAMADAS DA CARTILAGEM DO PC

As camadas articular (a), pré-condroblástica (pc), condroblástica (c) e hipertrófica (h) constituintes do PC, foram identificadas e diferenciadas nos cortes histológicos corados pelo método da HE, nos grupos controle (C4, C10) e experimental (E4, E10).

As características das camadas nos grupos C4 e E4 estão evidenciadas na figura 20.

Figura 20 – Camadas constituintes do PC na fase de 4 semanas dos grupos Controle (A, B) e mdx (C, D)



Destaque para as diferenças entre as camadas condroblástica (c) e hipertrófica (h). As setas indicam a camada articular. (HE. Barra de calibração: 20 µm).

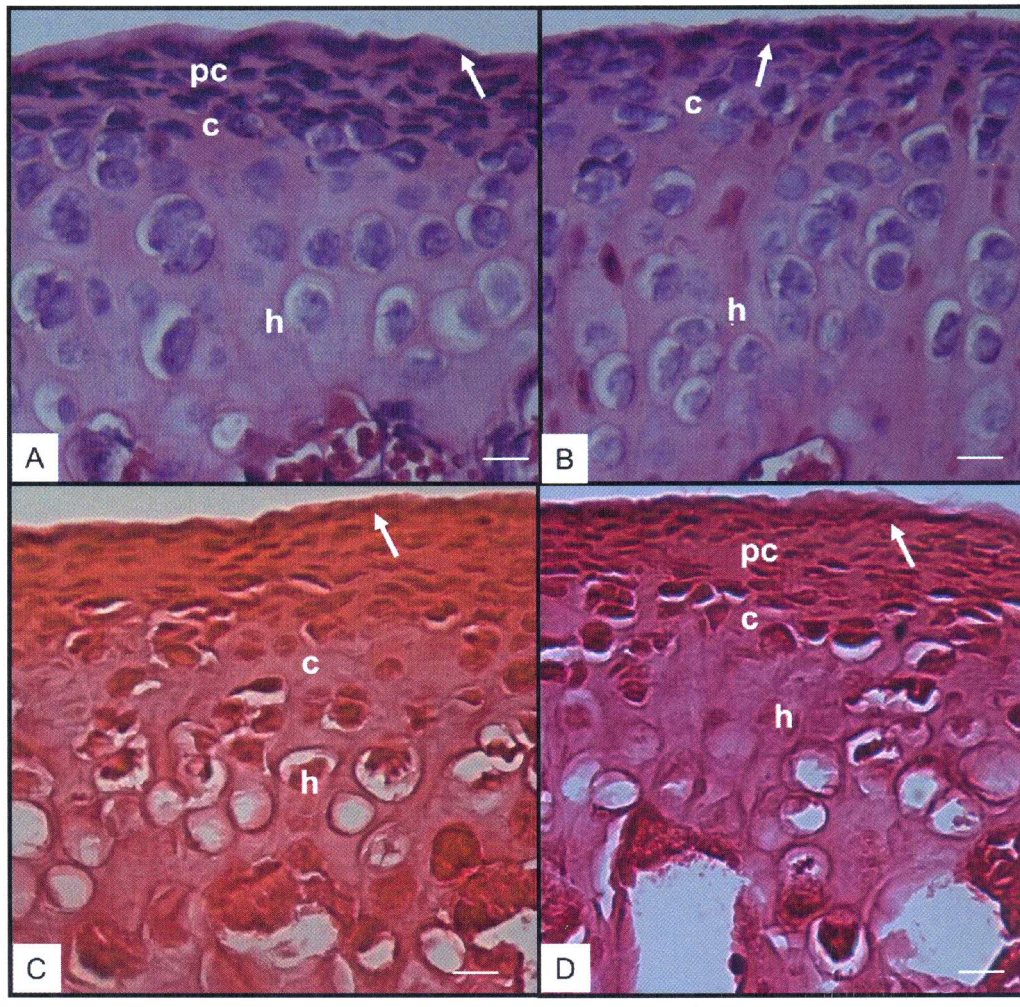
Nos grupos de 4 semanas (C4, E4) a camada articular apresentou-se delgada, com fibroblastos de aspecto ovóide em sua grande maioria; entretanto, em alguns trechos dessa camada no grupo E4, foram detectados fibrócitos delgados e alongados. Relativamente à camada pré-condroblástica, não foi possível de se estabelecer com precisão a sua localização em ambos os grupos, uma vez que devido ao aspecto ovóide de suas células, era facilmente confundida como pertencente à camada precedente, ou à camada condroblástica.

A organização da camada condroblástica, caracterizada por apresentar condrócitos de contorno preferencialmente arredondado, diferiu significantemente entre os grupos dessa fase. Assim, no grupo E4, a mesma destacou-se por exibir-se mais espessa, com maior quantidade de células e de MEC; diferentemente ao grupo C4, onde se apresentou com espessura reduzida, pouca MEC e menor densidade de condrócitos.

O contorno e o volume das células constituintes da camada hipertrófica não diferiram entre os grupos. Entretanto, observou-se que no grupo C4 a quantidade de condrócitos era bem superior em relação à verificada no grupo E4 (contribuindo para a sua maior espessura) e também bem definida, ou seja, distinta da camada condroblástica, fato não confirmado no grupo E4, onde essas duas camadas confundiam-se entre si.

As características das camadas nos grupos C10 e E10 estão evidenciadas na figura 21.

Figura 21 – Camadas constituintes do PC na fase de 10 semanas dos grupos Controle (A, B) e mdx (C, D)



Destaque para as diferenças entre as camadas condroblástica (c) e hipertrófica (h) e entre a pré-condroblástica do controle (A) e mdx (D). As setas indicam a camada articular. (HE. Barra de calibração: 20 µm).

Ao se comparar a camada articular entre os grupos de 10 semanas (C10, E10), verificou-se que a mesma apresentou-se delgada com fibrócitos delgados e alongados, organizando-se paralelamente à superfície do PC. Nos animais mdx os fibrócitos, de mesma conformação e disposição, constituíam em média dois estratos e eram mais achatados em relação aos animais mdx.

A camada pré-condroblástica, formada no grupo E10 por diferentes estratos de células achatadas e paralelas aos fibrócitos da camada articular, exibiu-se mais

delgada no grupo C10, sendo muitas vezes difícil de ser diferenciada da camada precedente.

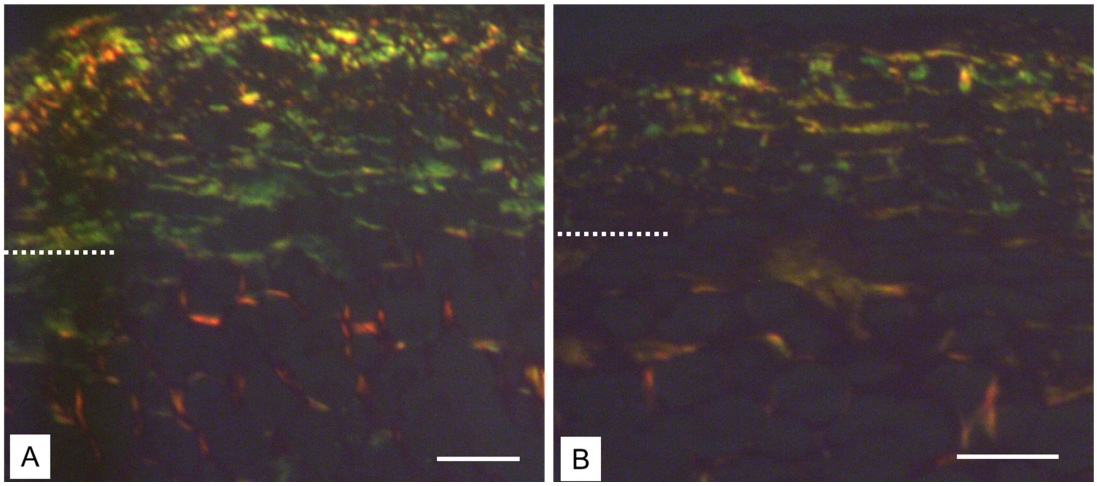
Em ambos os grupos (C10, E10), muito embora condrócitos de aspecto irregular tenham sido observados na camada condroblástica, as formas arredondada ou ovalada dessas células predominaram, em meio a uma MEC que também não apresentou diferenças entre os grupos, quanto à sua quantidade e distribuição. Além disso, também não foi possível determinar um limite preciso entre essa camada e a camada subjacente em ambos os grupos, sendo o volume maior das células da cama hipertrófica, a principal maneira de se distinguir entre ambas.

5.2.2 TIPIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS

Com essa avaliação, realizada nas lâminas coradas pelo método do picrosirius sob luz polarizada, foi possível distinguir a distribuição das fibras colágenas dos tipos I e III nos diferentes grupos.

Desta forma, foram detectadas diferenças entre os grupos C4 e E4 nas camadas a, pc e c, com o predomínio das fibras do tipo III no grupo controle, e do tipo I, nos animais mdx (Figura 22).

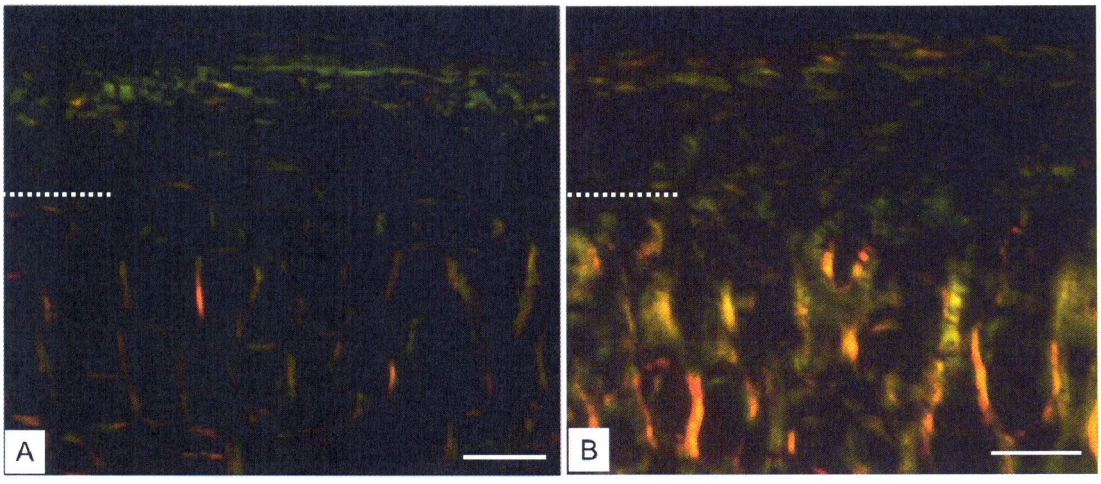
Figura 22 – Distribuição das fibras de colágeno



Colágeno dos tipos I (amarelo, laranja, vermelho) e III (verde) nas camadas a, pc e c (em conjunto, acima da linha tracejada). Notar a maior espessura e das camadas e o predomínio das fibras do tipo III no grupo controle (A), e a menor espessura e predomínio das fibras do tipo I no grupo mdx (B). (Picrosirius sob luz polarizada. Barra de calibração: 25 µm).

Entre os grupos C10 e E10, também foram observadas diferenças quanto a esse aspecto, ou seja, as fibras colágenas do tipo III predominaram no grupo controle, enquanto quer no grupo mdx, o predomínio foi das fibras do tipo I (Figura 23).

Figura 23 – Distribuição das fibras de colágeno



Distribuição das fibras de colágeno dos tipos I e III nas camadas a, pc e c (em conjunto, acima da linha tracejada). Notar o predomínio das fibras do tipo III no grupo controle 10 semanas (A), e das fibras do tipo I no grupo mdx 10 semanas (B). (Picrosirius sob luz polarizada. Barra de calibração: 25 µm).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A DMD, uma doença de caráter hereditário recessivo, ligada ao cromossomo X localizado no braço curto do cromossomo p21, e associada com a degeneração muscular, é progressiva e fatal, atingindo 1 em cada 3,500 meninos (BODRUG et al., 1987; BACCARI et al., 2007). Suas características não se manifestam até os três ou cinco anos de idade e, quando os sintomas aparecem, estes são detectados inicialmente na musculatura dos membros inferiores (HOFFMAN; BROWN Jr; KUNKEL, 1987; EMERY, 2002).

Utilizando o modelo experimental aqui descrito (camundongos mdx), Ghafari e Cowin (1989) relataram que a massa do músculo masseter, responsável por manter um determinado nível de estimulo mecânico sobre a cartilagem do PC, importante na manutenção da sua estrutura, estava diminuída. Em um trabalho realizado por Yonemitsu, Muramoto e Soma (2007), em ratos Wistar normais, onde seccionaram bilateralmente o masseter a fim de simular o baixo estímulo mecânico sobre o PC promovido pelo masseter fragilizado dos animais mdx, os autores verificaram diminuição estatisticamente significante na área total da cabeça do côndilo desses animais. Da mesma forma, em humanos, Eckardt e Harzer (1996) e Cudny (1978) verificaram em pacientes portadores de DMD diminuição no tamanho do crânio.

Tais observações permitiram inferir que, além do comprometimento do desenvolvimento muscular dos animais mdx (reforçado por pesquisas desenvolvidas por Matsumura e Campbell, 1994, Tinsley et al., 1994, que observaram uma leve substituição de tecido muscular por tecido conjuntivo fibroso) o crescimento normal do PC desses animais pode também ser afetado.

Sob esse foco, Ghafari e Cowin (1989) observaram que, muito embora o ganho de peso nos animais mdx com 9 semanas de idade tenha sido menor, esse fator não variou significativamente em comparação aos animais controle. Os dados da presente pesquisa estão de acordo com essas afirmações, uma vez que, nos dois grupos abordados, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os animais mdx e respectivos controles. Desta forma, se a diminuição da massa muscular ocorre devido ao avançar da doença, a substituição por tecido conjuntivo

deve ocorrer numa proporção equivalente o suficiente para compensar essa perda, indicando que a avaliação do fator peso não dever ser utilizada isoladamente como fator de comparação.

Segundo ainda esses autores, nos animais mdx há uma diminuição na média da altura e da largura da cartilagem do PC, o que não foi comprovado na presente pesquisa, pois a área total dessa estrutura não diferiu entre os grupos. Todavia, deve-se salientar que, embora semelhantes quanto às medidas, a cartilagem do PC apresentou-se alongada e afilada nos animais mdx, o que certamente contribuiu para a diminuição da sua espessura, principalmente no grupo E10. Tais observações corroboram com as descrições clássicas sobre as deformações que a DMD produz nas superfícies articulares, principalmente na forma e tamanho da mandíbula de animais distróficos (VILMANN; JUHL; KIRKEBY, 1985), ainda mais se for considerado que esses animais com 10 semanas têm uma idade correspondendo a 22 anos no humano, fase da vida em quer a DMD encontra-se em fase avançada. Estudos futuros que permitam determinar a forma, a orientação e o volume do PC de animais mdx poderão colaborar para uma melhor compreensão dessas alterações.

Brush e Hall (2003a) afirmaram que em processos degenerativos, condrócitos morfologicamente normais, aumentam em volume declarando, entretanto, não ser possível distinguir se esse aumento possa estar associado a algum processo degenerativo. Yonemitsu, Muramoto e Soma (2007), investigando a ausência de estímulo mecânico sobre a cartilagem do PC, demonstraram que os condrócitos estão menores e mais compactados em relação ao controle. Analisando a área dos condrócitos da camada condroblástica verificou-se para os animais mdx as menores médias, tanto no grupo E4 como no grupo E10, o que é compatível com a ausência de estímulo determinada pelas alterações musculares provenientes da ação da DMD.

PAPADOPOULOUA et al. (2007) sugeriram que estímulos de natureza mecânica são essenciais para a diferenciação e maturação dos condrócitos, pois desta maneira estes são estimulados a sintetizar alguns fatores de crescimento que incitam o crescimento e desenvolvimento da cartilagem do PC. Através de uma análise proteômica, Li et al. (2010) avaliaram o estresse mecânico sobre a cartilagem do PC e verificaram uma redução na expressão da vimentina (um importante componente do citoesqueleto que mantêm a morfologia normal dos

condrócitos), resultando em uma cartilagem delgada e condrócitos com morfologia alterada. Chen et al. (2011) estudando a má oclusão, inferiram que um menor número de condrócitos na cartilagem do PC estaria associado com a inibição da maturação dos mesmos, decorrente da redução da carga mecânica atuante sobre a cartilagem. Pelo exposto, pode-se admitir que o número reduzido de condrócitos verificado nos animais mdx da presente pesquisa, somado à diminuição significativa de sua área, é decorrente de interferência da DMD na maturação dos mesmos, e não de um processo degenerativo, uma vez que alterações patológicas não foram detectadas nesses espécimes.

Em relação ao número de condrócitos, Luder (1994), estudando a cartilagem do PC em animais normais jovens e adultos, relatou que estes apresentaram diminuição no número de condrócitos, ressaltando ser essa uma característica do processo de envelhecimento natural do tecido cartilagíneo. Tal condição foi verificada por outros autores (LUDER 1997, 1998; YONEMITSU; MURAMOTO; SOMA, 2007; JIAO et al., 2008; CHEN et al., 2009, 2010) que também a associaram ao processo de envelhecimento. Desta forma, pode-se admitir que a diminuição no número de condrócitos nos animais mdx (E4 e E10) corrobora essas descrições, uma vez que, como anteriormente citado, principalmente os animais de 10 semanas, encontram-se numa fase onde a DMD expressa intensamente as suas ações.

Ao se aferir a quantidade de matriz extracelular (MEC) da cartilagem do PC utilizando-se o método da Safranina – O, notou-se um aumento com o desenvolvimento da cartilagem no grupo C10, fato não observado no grupo E10. Sabe-se que a MEC é sintetizada pelos condrócitos e tem como função manter a sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação das células nela embebidas (LUKASHEV; WERB, 1998), e que para que essa síntese ocorra é necessário um ambiente favorável (estímulos nutricionais, mecânicos e hormonais) para os condrócitos (NAKAI; NIIMI; UEDA, 1998). Como a musculatura do mdx está debilitada (MATSUMURA; CAMPBELL, 1994; TINSLEY et al., 1994), pode-se inferir que tenha ocorrido uma interdependência entre o menor número de condrócitos e a menor quantidade de MEC com um influenciando ao outro, como descrito por Behonick e Werb (2003), ao comprovarem ser a atividade metabólica dos condrócitos influenciada via retroalimentação da MEC, e também por Bian et al. (2012), ao confirmarem em estudos *in vitro*, que a carga compressiva sobre os

condrócitos estimula o aumento na síntese e distribuição da MEC. Ainda, também não deve ser aqui descartada a hipótese dessa diminuição estar relacionada a um evento normal durante o processo natural de envelhecimento, uma vez que Mitani et al. (2006) observaram a diminuição acentuada da quantidade de MEC em animais velhos quando comparados aos animais jovens.

Concernente aos tipos de fibras colágenas, as do tipo I são típicas de tecido maduro, enquanto o colágeno tipo III é característico de tecidos em processo de desenvolvimento e/ou remodelamento (BEHONICK; WERB, 2003).

Ohashi et al., (1997), estudando localização de colágeno na cartilagem do PC em ratos jovens e velhos, detectaram um aumento na quantidade de colágeno tipo I em todas as camadas nos animais idosos, associando essa maior produção inicialmente à necessidade de uma maior resistência da cartilagem às forças mastigatórias e, em última análise, a um processo de envelhecimento normal. Os estudos de Hossain et al. (2005) avaliando alterações cronológicas na camada hipertrófica da cartilagem do PC em ratos jovens e velhos, revelaram também um predomínio do colágeno tipo I nos animais idosos. O fato de ter-se detectado na presente pesquisa um aumento das fibras colágenas do tipo I nos animais mdx associado aos dados morfométricos descritos, estão de acordo que essas características estão atreladas a um processo precoce de envelhecimento da cartilagem do PC desses animais.

Urban, Hall e Gehl (1993) e Buschmann et al. (1996) afirmam que mudanças no volume dos condrócitos indicam síntese alterada de moléculas que compõem a cartilagem e Buschmann et al. (1996) sugerem que tal alteração pode está correlacionada a uma ausência de mecanotransdução à qual o tecido está submetido. Para Behonick e Werb (2003), é o colágeno disposto em torno dos condrócitos do PC que lhes confere a morfologia característica (filiformes, ovóides, esferoides), enquanto que Schuh et al. (2010) afirmam que a MEC precisa ser flexível para permitir a proliferação e diferenciação dos condrócitos. Turunen et al. (2012, 2013) também sugerem ser a rede colágena um importante fator que influencia na morfologia dos condrócitos.

Na presente pesquisa não foram observadas diferenças no formato dos condrócitos entre os grupos; todavia, o predomínio das fibras colágenas do tipo I nos

animais mdx (E4, E10), pode-se admitir que o aspecto mais espesso e resistente da cartilagem do PC contribuiu para a diminuição da área dos condrócitos desses animais.

Os dados relativos à imunorreatividade dos condrócitos ao IGF-I e seu receptor, o IGF-IR, demonstraram inicialmente uma porcentagem equivalente dessas células em todos os grupos e que, embora em menor quantidade nos animais mdx (E4, E10), seu número foi proporcionalmente maior, quando comparados aos respectivos controles.

Yonemitsu, Muramoto e Soma (2007) ao estudarem a cartilagem do PC sobre baixo estímulo mecânico verificaram um reduzido número de condrócitos imunorreativos ao IGF-IR, associando essa diminuição a uma menor taxa de proliferação dos condrócitos. Visnapuu et al. (2001) ao avaliarem o PC de ratos com idades compreendidas entre 1 e 21 dias, observaram uma condrogênese acelerada, onde a quantidade de IGF-IR aumentou proporcionalmente com a idade. Fuentes et al. (2002) verificaram em ratas de 28 e 42 dias que, à medida que a concentração do IGF-I aumenta, a de IGF-IR tende a diminuir. Já Watahiki et al. (2004) constatou um aumento nos condrócitos imunorreativos dependente da idade, com os animais mais velhos exibindo uma diminuição de células imunorreativas ao IGF-I.

Apesar do IGF-I ser um potente inibidor de apoptose celular, e de exercer efeitos na síntese de componentes da MEC (MOAR; HOCHBERG; SILBERMANN, 1993; DELATTE et al., 2004), a maior proporção de condrócitos imunorreativos nos animais mdx não foi capaz de equiparar o número de condrócitos com os respectivos controles.

Desta maneira, esses resultados reforçam a teoria de que a DMD, ao invés de determinar uma degeneração da cartilagem do PC, na realidade aceleram o processo de envelhecimento dessa estrutura.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, conclui-se que:

1. Embora tenha apresentado uma tendência a ser menor no mdx, a área total da cartilagem do PC não diferem da dos controles.

2. A área dos condrócitos nos mdx é menor quer as dos animais controle.

3. Os mdx apresentaram um número de condrócitos mais reduzido que o controle.

4. A quantidade de matriz extracelular foi maior nos controles.

5. Cartilagem condilar do PC dos animais exibiu um aspecto mais fibroso, com o colágeno tipo I predominando sobre o colágeno tipo III.

6. A imunorreatividade ao IGF-I e IGF-IR foi proporcionalmente maior nos condrócitos dos mdx.

7. A cartilagem condilar da mandíbula apresentou um processo de envelhecimento mais precoce.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AMERICAN SPEECH-LANGUAGE-HEARING ASSOCIATION. Model medical review guidelines for dysphagia services. **Revision to DynCorp**, 2001 FTRP. Disponível em: http://www.asha.org/uploadedFiles/pratice/reimbursement/medicare/DynCorpDrysphHCEC.pdf. Acesso em 04 de outubro de 2012.

ANLAR, B.; SULLIVAN, K. A.; FELDMAN, E. L. Insulin-like growth factor-I and central nervous system development. **Hormone and Metabolic Research.** v. 31, n. 2- 3, p. 120– 125, 1999.

BACCARI, M. C.; NISTRI, S.; VANNUCCHI, M. G.; CALAMAI, F.; BANI, D. Reversal by relaxin of altered ileal spontaneous contractions in dystrophic (mdx) mice through a nitric oxide-mediated mechanism. **American Journal Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology,** v. 293, n. 2, p. 662– 668, 2007.

BACH, J. R. The Duchenne de Boulogne- Meryon controversy and psedohypertrophic muscular dystrophy. **Journal of the History of Medicine and Allied Scinces,** v. 55, n. 2, 158- 178, 2000.

BANKS, G. B.; CHAMBERLAIN, J. S. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. **Current Topics in development biology,** v. 84, p. 431- 453, 2008.

BEHONICK, D. J.; WERB, Z. A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and developing chondrocyte. **Mechanisms of Development,** v. 120, n. 11, p. 1327- 1336, 2003.

BERESFORD, W. A. **Chondroid bone, secondary cartilage and metaplasia**. Baltimore-Munich: Urban & Schwarzenberg; 1981. Disponível em http://wberesford.hsc.wvu.edu/cb1.htm. Acesso em 04 de outubro de 2012.

BIAN, L.; ZHAI, D. Y.; ZHANG, E. C.; MAUCK, R. L.; BURDICK, J. A. Dynamic compressive loading enhances cartilage matrix synthesis and distribution and suppresses hypertrophy in hMSC-Laden hyaluronic acid hydrogels. **Tissue Engineering,** v. 18, n. 7- 8, p. 715- 724, 2012.

BODRUG, S. E.; RAY, P. N.; GONZALEZ, I. L.; SCHMICKEL, R. D.; SYLVESTER, J. E.; WORTON, R. G. Molecular analysis of a constitutional X-autosome translocation in a female with muscular dystrophy. **Science,** v. 237, n. 4822, p. 1620- 4, 1987.

BOJRK, A.; HELM, S. Prediction of the age of maximum pubertal growth in body height. **The Angle Orthodontist,** v. 37, n. 2, p. 134- 143, 1967.

BOLAND, B. J.; SILBERT, P. L.; GROOVER, R. V.; WOLLAN, P. C.; SILVERSTEIN, M. D. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. **Pediatric Neurology,** v. 14, n. 1, p. 7– 12, 1996.

BONDY, C. A.; WERNER, H.; ROBERTS JR, C. T.; LEROITH, D. Cellular pattern of insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. **Molecular Endocrinology,** v. 4, n. 9, p. 1386– 1398, 1990.

BRIDGES, L. R. The association of cardiac muscle necrosis and inflammation with the degenerative and persistent myopathy of MDX mice. **Journal of Neurological Sciences,** v. 72, n. 2- 3, p. 147- 157, 1986.

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

BUSCHMANN, M. D; HUNZIKER, E. B; KIM, Y-J; GRODZINSKY, A. J. Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. **Journal of Cell Science,** v. 109, n. 2, p. 499- 508, 1996.

BUSH, P. G.; HALL, A. C. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage,** v. 11, n. 4, p. 242- 251, 2003a.

BUSH, P. G.; HUNTLEY, J. S.; BRENKEL, I. J.; HALL, A. C. The shape of things to come: chondrocytes and osteoarthritis. **Clinical and Investigative Medicine,** v. 26, n. 5, p. 249- 251, 2003b.

CHAI, Y.; MAXSON JR, R. B. Recent advances in craniofacial morphogenesis. **Developmental Dynamics,** v. 235, n. 9, p. 2353– 2375, 2006.

CHEN, J.; SOBUE, T.; UTREJA, A.; KALAJZIC, Z.; XU, M.; KILTS, T.; YOUNG, M. Sex Differences in Chondrocyte Maturation in the Mandibular. **Calcified Tissue International,** v. 89, n. 2, p. 123– 129, 2011.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies International. **Journal of Experimental Pathology,** v. 84, n. 4, p. 165- 172, 2003.

COOPER, B. J. Animal models of duchenne and becker muscular dystrophy. **British Medical Bulletin,** v. 45, n. 3, p. 703- 718, 1989.

COPRAY, J. C.; JANSEN, H. W.; DUTERLOO, H. S. Effects of compressive forces on proliferation and matrix synthesis in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro. **Archives Oral Biology,** v. 30, n. 4, p. 299– 304, 1985.

CORNU, C.; GOUBEL, F.; FARDEAU, M. Muscle and joint elastic properties during elbow flexion in Duchenne muscular dystrophy. **The Journal of Physiology,** v. 533, n. 2, p. 605– 616, 2001.

CUDNY, D. Delayed mental development and peculiar shape of the base of the skull and of the occlusion in boys with Duchenne's muscular dystrophy. **Czasopismo Stomatologiczne,** v. 31, p. 565 – 569, 1978.

D'ERCOLE, A. J.; APPLEWHITE, G. T.; UNDERWOOD, L. E. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. **Developmental Biology,** v. 75, n. 2, p. 315– 28, 1980.

DE BACKER, F.; VANDEBROUCK, C.; GAILLY, P.; GILLIS, M. Long-term study of Ca^{2+} homeostasis and of survival in collagenase-isolated muscle fibers from normal and mdx mice. **Journal of Physiology,** v. 542, n. 3, p. 855- 865, 2002.

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

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, 2010.

ECKARDT, L.; HARZER, W. Facial structure and functional findings in patients with progressive muscular dystrophy (Duchenne). **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v. 110, n. 2, p. 185– 190, 1996.

EMERY, A. Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. **The Lancet,** v. 357, n. 9267, p. 1529, 2001.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **Lancet**, v. 359, n. 9307, p. 687- 695, 2002.

EMERY, A. E. H.; EMERY, M. L. H. **The history of a genetic disease:** Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. London: Royal Society of Medicine Press, 1995.

ENLOW D. H. **The human face:** an account of the postnatal growth and development of the craniofacial skeleton. New York: Hoeber Medical Division, Harper & Row, 1968.

ENLOW, D. H. Mandibular rotations during growth. In: Ed. by MCNAMARA JR, J. A. Determinants of Mandibular form and Growth University of Michigan, **Center of Human Growth and Development**, 1975.

ERVASTI, G. M.; CAMPBELL, K. P. Dystrophin and the membrane skeleton. **Current Opinion in Cell Biolology,** v. 5, n. 1, p. 82– 87, 1993.

ERVASTI, G. M.; CAMPBELL, K. P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. **Cell,** v. 66, n. 6, p. 1121– 1131, 1991.

FINSTERER, J. Cardiopulmonary support in duchenne muscular dystrophy. **Lung,** v. 184, n. 4, p. 205– 215, 2006.

FINSTERER, J.; STÖLLBERGER, C. The heart in human dystrophinopathies. **Cardiology,** v. 99, n. 1, p. 1– 19, 2003.

FORTIER, L. A.; BARKER, J. U.; STRAUSS, E. J.; MCCARREL, T. M.; COLE, B. J. The role of growth factors in cartilage repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research,** v. 469, n. 10, p. 2706- 2715, 2011.

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

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

GHAFARI, J.; COWIN, D. H. Condylar cartilage in the muscular dystrophic mouse. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial,** v. 95, n. 2, p. 107- 114, 1989.

GILLIS, J. M. Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. **Acta Physiologica Scandinavica,** v. 156, n. 3, p. 397– 405, 1996.

GLESBY, M. J.; ROSENMANN, E.; NYLEN, E. G.; WROGEMANN, K. Serum CK, calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in mdx mouse muscular dystrophy. **Muscle Nerve,** v. 11, n. 8, p. 852- 856, 1988.

GOMEZ-MERINO, E.; BACH, J. R. Duchenne muscular dystrophy: prolongation of life by noninvasive ventilation and mechanically assisted coughing. **American Journal of Physical Medicine e Rehabilitation,** v. 81, n. 6, p. 411– 415, 2002.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B.; KIEU, K.; NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy,** v. 3, n. 193, p. 199- 211, 1999.

HALL, A. C. Physiology of cartilage. In: Hughes S. **Sciences basic to orthopaedics,** 1995, p. 45-69.

HAYES, A.; LYNCH, G. S.; WILLIAMS, D. A. The effects of endurance exercise on dystrophic mdx mice. I. Contractile and histochemical properties of intact muscles. **Proceedings, Biological Sciences/ The Royal Society,** v. 253, n. 1336, p. 19– 25, 1993.

HINTON, R. J.; CARLSON, D. S. Regulation of mandibular condylar growth. **Seminars in Orthodontics,** v. 11, p. 205- 219, 2005.

HOFFMAN, E. P.; BROWN JUNIOR, R. H.; KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell,** v. 51, n. 6, p. 919- 928, 1987.

HOSSAIN, K. S.; AMIZUKA, N.; IKEDA, N.; NOZAWA-INOUE, K.; SUZUKI, A.; LI, M.; TAKEUCHI, K.; AITA, M.; KAWANO, Y.; HOSHINO, M.; ODA, K.; TAKAGI, R.; MAEDA, T. Histochemical evidences on the chronological alterations of the hypertrophic zone of mandibular condylar cartilage. **Microscopy Research and Technique,** v. 67, n. 6, p. 325– 335, 2005.

HSU, Y. D. Muscular dystrophy: from pathogenesis to strategy. **Acta Neurologica Taiwanica,** v. 13, n. 2, p. 50- 58, 2004.

ISGAARD, J.; TIVESTEN, A.; FRIBERG, P.; BENGTSSON, B. A. The role of the GH/ IGF-I axis for cardiac function and structure. **Hormone Metabolic Research,** v. 31, n. 2- 3, p. 50– 54, 1999.

ISHIHARA, T. Cardiopulmonary failure in Duchenne muscular dystrophy - pathophysiology and management. **Rinsho Shinkeigaku,** v. 43, n. 11, p. 761– 764, 2003.

JAZEDJE, T.; SECCO, M.; VIEIRA, N. M.; ZUCCONI, E.; GOLLOP, T. R.; VAINZOF, M.; ZATZ, M. Stem cells from umbilical cord blood do have myogenic potential, with and without differentiation induction in vitro. **Journal Translational Medicine,** v. 14, n. 1, p. 7- 16, 2009.

JIAO, K.; WANG, M.; NIU, L.; DAI, J.; YU, S.; LIU, X.; WANG, G. Death and proliferation of chondrocytes in the degraded mandibular condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. **Apoptosis,** v. 14, n. 1, p. 22- 30, 2009.

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

KILIARIDIS, S.; THILANDER, B.; KJELLBERG, H.; TOPOUZELIS, N.; ZAFIRIADIS, A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,** v. 116, n. 2, p. 121 – 125, 1999.

KONHILAS, J. P.; WIDEGREN, U.; ALLEN, D. L.; PAUL, A. C.; CLEARY, A.; LEINWAND, L. A. Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse. **American Journal of Physiology, Heart Circulatory and Physiology,** v. 289, n. 1, p. 455– 465, 2005.

KREIBORG, S.; JENSEN, B. L.; MOLLER, E.; BJÖRK, A. Craniofacial growth in a case of congenital muscular dystrophy. **American Journal of Orthodontics,** v. 74, n. 2, p. 207– 215, 1978.

KURODA, S.; TANIMOTO, K.; IZAMA, T.; FUJIHARA, S.; KOOLSTRA, J. H.; TANAKA, E. Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage,** v. 17, n. 11, p. 1408- 1415, 2009.

LARON, Z. Insulin-like growth factor I (IGF-I): a growth hormone. **Journal of Clinical Pathology-molecular Pathology,** v. 54, n. 5, p. 311- 316, 2001.

LAW, J. D.; ALLEN, D. L.; TIDBALL, J. G. Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at mdx myotendinous junctions following onset of necrosis. **Journal of Cell Science,** v.107, n. 6, p. 1477- 1483, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger príncipios de bioquímica**. 3ª, ed. São Paulo: Savier, 2002.

LEROITH, D.; WERNER, H.; BEITNER-JOHNSON, D.; ROBERTS JUNIOR, C. T. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocribe Reviews,** v. 16, n. 2, p. 143–163, 1995.

LI, H.; YANG, H. S.; WU, T. J.; ZHANG, X. Y.; JIANG, W. H.; MA, Q. L.; CHEN, Y. X.; XU, Y.; LI, S.; HUA, Z. C. Proteomic analysis of early-response to mechanical stress in neonatal rat mandibular condylar chondrocytes. **Journal of Cellular Physiology,** v. 223, n. 3, p. 610- 622, 2010.

LIU, C.; KANEKO, S.; SOMA, K. Effects of a mandibular lateral shift on the condyle and mandibular bone in growing rats. **The Angle Orthodontist,** v. 77, n. 5, p. 787-793, 2007.

LUDER, H. U. Age changes in the articular tissue of human mandibular condyles from adolescence to old age: a semiquantitative light microscopic study. **The Anatomical Record,** v. 251, n. 4, p. 439- 447, 1998.

LUDER, H. U. Frequency and distribution of articular tissue features in adult human mandibular condyles: a semiquantitative light microscopic study. **The Anatomical Record,** v. 248, n. 1, p. 18- 28, 1997.

LUDER, H. U. Perichondral and endochondral components of mandibular condylar growth: morphometric and autoradiografic quantitation in rats. **Journal of Anatomy,** v. 185, n. 3, p. 587- 598, 1994.

LUKASHEV, M. E.; WERB, Z. ECM signaling: orchestrating cell behavior and misbehavior. **Trends in Cell Biology,** v. 8, n. 11, p. 437- 441, 1998.

MAO, J. J.; RAHEMTULLA, F.; SCOTT, P. G. Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. **Journal of Dental Research,** v. 77, n. 7, p. 1520- 1528, 1998.

MAOR, G.; HOCHBERG, Z.; SILBERMANN, M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. **Acta Endocrinol (Copenh),** v. 128, n. 21, p. 56- 64, 1993a.

MAOR, G.; LARON, Z.; ESHET, R.; SILBERMANN, M. The early postnatal development of the murine mandibular condyle is regulated by endogenous insulin-like growth factor-I. **The Journal of Endocrinology,** v. 137, n. 1, p. 21– 6, 1993b.

MARDEN, F. A.; CONNOLLY, A. M.; SIEGEL, M. J.; RUBIN, D. A. Compositional analysis of muscle in boys with Duchenne muscular dystrophy using MR imaging. **Skeletal Radiology,** v. 34, n. 3, p. 140– 148, 2005.

MATSUMURA, K.; CAMPBELL, K. P. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve,** v. 17, n. 1, p. 2– 15, 1994.

MATSUMURA, K.; TOMÉ, F. M. S.; LONASESCU, V.; ERVASTI, J. M.; ANDERSON, R. D.; ROMERO, N. B.; SIMON, D.; KAPLAN, J.; FARDEAU, M.; CAMPBELL, K. P. Deficiency of dystrophin-associated proteins in duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. **The Journal of Clinical Investigation,** v. 92, n. 2, p. 866- 871, 1993.

MATSUYUKI, T.; KITAHARA, T.; NAKASHIMA, A. Developmental changes in craniofacial morphology in subjects with duchenne muscular dystrophy. **European Journal of Orthodontics,** v. 28, n 1, p. 42– 50, 2006.

MCQUILLAN, D. J.; HANDLEY, C. J.; CAMPBELL, M. A.; BOLIS, S.; MILWAY, V. E.; HERINGTON, A. C. Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. **The Biochemical Journal,** v. 240, n. 2, p. 423- 430, 1986.

MERYON, E. On fatty degeneration of the voluntary muscles: report of the Royal Medical and Chirurgical Society, **Lancet**, v. 2, p. 588– 589, 1851.

MITANI, H.; TAKAHASHI, I.; BAE, K. O. J.; SATO, T.; TAKAHASHI, N.; SASANO, Y.; IGARASHI, K.; MITANI, H. Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. **Histochemistry and Cell Biology,** v. 126, n. 3, p. 371– 380, 2006.

MIZOGUCHI, I.; NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, I.; KAGAYAMA, M.; MITANO, H. An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. **Histochemistry,** v. 93, p. 593– 599, 1990.

MOAR, G.; HOCHBERG, Z.; SILBERMANN, M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. **Acta Endocrinologica,** v. 128, n. 1, p. 56- 64, 1993.

MORSE, A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **Journal of Dental Research.,** v. 24, n. 3, p. 143- 153, 1945.

MOSS, M. L.; RANKOW, R. M. The role of the functional matrix in mandibular growth. **The Angle Orthodontist,** v. 38, n. 2, p. 95 – 103, 1968.

MOW, V. C.; ATESHIAN, G. A.; SPILKER, R. L. Biomechanics of diarthrodial joints: a review of twenty years of progress. **Journal of Biomechanical Engineering,** v. 115, n. 4B, p. 460- 7, 1993.

MOYERS, R. E. Ortodontia. 4a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 44- 63, 1991.

NAKAI, H.; NIIMI, A.; UEDA, M. The influence of compressive loading on growth of cartilage of the mandibular condyle in vitro. **Arquives of Oral Biology,** v. 43, n. 7, p. 505- 515, 1998.

NAKANO, M.; FUJITA, T.; OHTANI, J.; KAWATA, T.; KAKU, M.; MOTOKAWA, M.; TSUKA, N.; HAYASHI, H.; TANNE, K. Effects of mandibular advancement on growth after condylectomy. **Journal of Dental Research,** v. 88, n. 3, p. 261- 265, 2009.

NEWMAN, J. J.; STROME D. R.; GOODWIN, C. W.; MASON JR, A. D.; PRUITT JR, B. A. Altered muscle metabolism in rats after thermal injury. **Metabolism,** v. 31, n. 12, p. 1229- 1233, 1982.

NIGRO, G.; COMI, L. I.; POLITANO, L.; BAIN, R. J. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. **International Journal of Cardiology,** v. 26, n. 3, p. 271– 277, 1990.

NILSSON, A.; ISGAARD, J.; LINDAHL, A.; DAHLSTROM, A.; SKOTTNER, A.; ISAKSSON, O. G. Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. **Science,** v. 233, n. 4763, p. 571– 574, 1986.

OHASHI, N.; EJIRI, S.; HANADA, K.; OZAWA, H. Changes in type I, II, and X collagen immunoreactivity of the mandibular condylar cartilage in a naturally aging rat model. **Journal of Bone and Mineral Mebolism,** v. 15, n. 2, p. 77- 83, 1997.

OHLENDIECK, K.; CAMPBELL, K. P. Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. **The Journal of Cell Biology,** v. 115, n. 6, p. 1685- 1694, 1991.

OHLSSON, C.; VIDAL, O. Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on human osteoblasts. **European Journal of Clinical Investigation,** v. 28, p. 184-186, 1998.

OZAKI, M.; KANEKO, S.; SOMA, K. Masseter Muscular Weakness Affects Temporomandibular synovitis induced by jaw opening in growing Rats. **The Angle Orthodontist,** v. 78, n. 5, p. 819- 825, 2008.

PANE, M.; VASTA, I.; MESSINA, S.; SORLETI, D.; ALOYSIUS, A.; SCIARRA, F.; MANGIOLA, F.; KINALI, M.; RICCI, E.; MERCURI, E. Feeding problems and weight gain in Duchenne muscular dystrophy. **European Journal of Paediatric Neurology,** v. 10, n. 5- 6, p. 231– 236, 2006.

PAPADOPOULOUA, A. K.; PAPACHRISTOUB, D. J.; CHATZOPOULOSC, S. A.; PIRTTINIEMID, P.; PAPAVASSILIOUE, A. G.; BASDRAA, E. K. Load application induces changes in the expression levels of Sox-9, FGFR-3 and VEGF in condylar chondrocytes. **FEBS Letters**, v. 581, n. 10, p. 2041– 2046, 2007.

PATIL, A. S.; SABLE, R. B.; KOTHARI, R. M. Role of insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and genetic regulation in the chondrogenesis and growth of the mandibular condylar cartilage. **Journal of Cellular Physiology,** v. 227, n. 5, p. 1796- 1804, 2012.

PENARROCHA, M.; BAGAN, J. V.; VILCHEZ, J.; MILLIAN, M. A.; FERNANDOZ, S. Oral alterations in Steinert's myotonic dystrophy: a presentation of two cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology,** v. 69, n. 6, p. 698– 700, 1990.

PILGRAM, G. S. K.; POTIKANOND, S.; BAINES, R. A.; FRADKIN, L. G.; NOORDERMEER, J. N. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. **Molecular Neurobiology,** v. 41, n. 1, p. 1– 21, 2010.

PIRTTINIEMI, P.; KANTOMAA, T.; SALO, L.; TUOMINEN, M. Effect of reduced articular function on deposition of type I and type II collagens in the mandibular condylar cartilage of the rat. **Archives of Oral Biology,** v. 41, n. 1, p. 127- 131, 1996.

PIRTTINIEMI, P.; PELTOMAKI, T.; MÜLLER, L.; LUDER, H. U. Abnormal mandibular growth and the condylar cartilage. **European Journal of Orthodontics,** v. 31, n. 1, p. 1– 11, 2009.

RAMIREZ-YAÑEZ, G. O. Cartilagem condilar da mandíbula: uma revisão. **Revista Internacional de Ortopedia Funcional,** v. 1, n. 1, p. 85- 94, 2004.

RATEL, S.; DUCHE, P.; WILLIAMS, C. A. Muscle fatigue during highintensity exercise in children. **Sports Medicine,** v. 36, n. 12, p. 1031– 1065, 2006.

REZVANI, M.; CAFARELLI, E.; HOOD, D. A. Performance and excitability of mdx mouse muscle at 2, 5, and 13 wk of age. **Journal of Applied Physiology,** v. 78, n. 3, p. 961– 967, 1995.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia:** texto e atlas. Em correlação com a biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p. 211.

ROTH, S.; MULLER, K.; FISCHER, D. C.; DANNHAUER, K. H. Specific properties of the extracellular chondroitin sulphate proteoglycans in the mandibular condylar growth center in pigs. **Archives of Oral Biology,** v. 42, n. 1, p. 63- 76, 1997.

SANDRI, M.; CARRARO, U.; PODHORSKA-OKOLOV, M.; RIZZI, C.; ARSLAN, P.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. **FEBS Letters,** v. 373, n. 3, p. 291- 295, 1995.

SATO, C.; MURAMOTO, T.; SOMA, K. Functional lateral deviation of the mandible and its positional recovery on the rat condylar cartilage during the growth period. **The Angle Orthodontist,** v. 76, n. 4, p. 591- 597, 2006.

SCHEVEN, B. A.; HAMILTON, N. J. Longitudinal bone growth in vitro: effects of insulin-like growth factor I and growth hormone. **Acta Endocrinology (Copenh),** v. 124, n. 5, p. 602- 607, 1991.

SCHUH, E.; KRAMER, J.; ROHWEDEL, J.; NOTBOHM, H.; MÜLLER, R.; GUTSMANN, T.; ROTTER, N. Effect of matrix elasticity on the maintenance of the chondrogenic phenotype. **Tissue Engineering,** v. 16, n. 4, p. 1281- 1290, 2010.

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

SICINSKI, P.; GENG, Y.; RYDER-COOK, A. S.; BARNARD, E. A.; DARLISON, M. G.; BARNARD, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse. A point mutation. **Science,** v. 244, n. 4912, p. 1578– 1580, 1989.

SINSEL, N. K.; OPDEBEECK ,H.; GUELINCKX, P. J. Mandibular condylar growth alterations after unilateral partial facial paralysis: an experimental study in the rabbit. **Plastic and Reconstructive Surgery,** v. 109, n. 1, p. 181- 189, 2002.

STEFANINI, M.; DE MARTINO, C.; ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature,** v. 216, n. 5111, p. 173- 174, 1967.

STUTZMANN JR, J. J.; PETROVIC, A. G. A new parameter for estimating condylar growth direction. In: GRABER, T. M. ed. **Physiologic principles of functional appliances.** St. Louis: The CV Mosby Company, 1985, 14- 25.

SUBTELNY, J. D. Malocclusions, orthodontic corrections and orofacial muscle adaptation. **The Angle Orthodontist**, v. 40, n. 3, p. 170 – 201, 1970.

SUN, T.; HUNZIKER, E. B.; MORALES, T. I. Subcellular distribution of the insulin-like growth factor (IGF) binding proteins (IGFBPs) 2 and 3 in articular chondrocytes. **Journal of Orthopaedic Research,** v. 26, n. 11, p. 1421- 1427, 2008.

TAJIMA, Y.; KAWASAKI, M.; KURIHARA, K.; UEHA, T.; YOKOSE, S. Immunohistochemical profile of basic fibroblast growth factor and heparin sulphate in adult rat mandibular condylar cartilage. **Archives of Oral Biology,** v. 43, n. 11, p. 873- 877, 1998.

TINSLEY, J.; BLAKE, D. J.; ZUELLIG, R. A.; DAVIES, K. E. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 91, n. 18, p. 8307– 8313, 1994.

TURUNEN, S. M.; LAMNI, M. J.; SAARAKKALA, S.; HAN, S. K.; HERZOG, W.; TANSKA, P.; KORHONEN, R. K. The effect of collagen degradation on chondrocyte volume and morphology in bovine articular cartilage following a hypotonic challenge. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology,** v. 12, n. 3, p. 417- 429, 2013.

UEKI, K.; NAKAGAWA, K.; YAMAMOTO, E. Bite force and maxillofacial morphology in patients with duchenne-type muscular dystrophy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,** v. 65, n. 1, p. 34- 39, 2007.

URBAN, J. P.; HALL, A. C.; GEHL, K. A. Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. **Journal of Cellular Physiology,** v. 154, n. 2, p. 262- 270, 1993.

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

VAN ERUM, R.; MULIER, M.; CARELS, C.; VERBEKE, G.; DE ZEGHER, F. Craniofacial growth in short children born small for gestational age: effect of growth hormone treatment. **Journal of Dental Research,** v. 76, n. 9, p. 1579– 1586, 1997.

VAN SPRONSEN, P .H.; WEIJS, W. A.; VALK, J.; PRAHL-ANDERSEN, B.; VAN GINKEL, F. C. A comparison of jaw muscle cross-sections of long-face and normal adults. **Journal of Dental Research**, v. 71, n. 6, p. 1279– 1285, 1992.

VILMANN, H.; JUHL, M.; KIRKEBY, S. Bone-muscle interactions in the muscular dystrophic mouse. **European Journal of Orthodontics,** v. 7, n. 3, p. 185- 192, 1985.

VINKKA, H. Secondary cartilages in the facial skeleton of the rat. **Proceedings of the Finnish Dental Society,** v. 78, n. 7, p. 1– 37, 1982.

VISNAPUU, V.; PELTOMÄKI, T.; RÖNNING, O.; SYRJANEN, S. Distribution of insulin-like growth factor-I mRNA in the mandibular condyle and rib cartilage of the rat during growth. **Archives of Oral Biology,** v. 47, n. 11, p. 791- 798, 2002.

VISNAPUU, V.; PELTOMÄKI, T.; RÖNNING, O. VAHLBERG, T.; HELENIUS, H. Growth hormone and insulin-like growth factor I receptors in the temporomandibular joint of the rat. **Journal of Dental Research,** v. 80, n. 10, p. 1903- 1907, 2001.

VON DEN HOFF, J. W.; DELATTE, M. Interplay of mechanical loading and growth factors in the mandibular condyle. **Arquives of Oral Biology,** v. 53, n. 8, p. 709- 715, 2008.

WAGNER, K. R. Approaching a new age in duchenne muscular dystrophy treatment. **Neurotherapeutics,** v. 5, n. 4, p. 583- 591, 2008.

WATAHIKI, J.; YAMAGUCHI, T.; IRIE, T.; NAKANO, H.; MAKI, K.; TACHIKAWA, T. Gene expression profiling of mouse condylar cartilage during mastication by means of laser microdissection and cDNA array. **Journal of Dental Research,** v. 83, n. 3, p. 245- 249, 2004.

WEIJS, W. A.; HILLEN, B. Relationships between masticatory muscle cross-section and skull shape. **Journal of Dental Research,** v. 63, n. 9, p. 1154– 1157, 1984.

WELLS, D. J.; WELLS, K. E. What do animal models have to tell us regarding Duchenne muscular dystrophy? **Acta Myologica,** v. 24, n. 3, p. 172- 180, 2005.

YONEMITSU, I.; MURAMOTO, T.; SOMA, K. The influence of masseter activity on rat mandibular growth. **Archives of Oral Biology,** v. 52, n. 5, p. 487- 493, 2007.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis, 5.ed. **Englewood Cliffs:** Prentice Hall, 1984, p. 718.

ZHOU, J.; LU, Y.; GAO, X. H.; CHEN, Y. C.; LU, J. J.; BAI, Y. X.; SHEN, Y.; WANG, B. K. The growth hormone receptor gene is associated with mandibular height in a Chinese population. **Journal of Dental Research,** v. 84, n. 11, p. 1052– 1056, 2005.