



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

WILSON ROMERO NAKAGAKI

**“ALTERAÇÕES DA MORFOLOGIA, RESISTÊNCIA
MECÂNICA E CAPACIDADE OSTEOGÊNICA DOS OSSOS
DE CAMUNDONGOS *MDX*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Wilson Romero
Nakagaki
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Camilli

Campinas, 2011

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

N145a Nakagaki, Wilson Romero
Alterações da morfologia, resistência mecânica e capacidade osteogênica dos ossos de camundongos *mdx* / Wilson Romero Nakagaki. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: José Angelo Camilli.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Camundongo *mdx*. 2. Fêmur. 3. Resistência mecânica. 4. Matriz óssea. 5. Ossos - Regeneração. I. Camilli, José Angelo, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Alterations of morphology, mechanical resistance and osteogenic capacity of *mdx* mice bones.

Palavras-chave em inglês: *Mdx* mice; Femur; Mechanical strength; Bone matrix; Bone regeneration.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: José Angelo Camilli, Flávia de Paoli, Nilvaldo Antonio Parizotto, William Dias Belanger, Paulo Pinto Joazeiro.

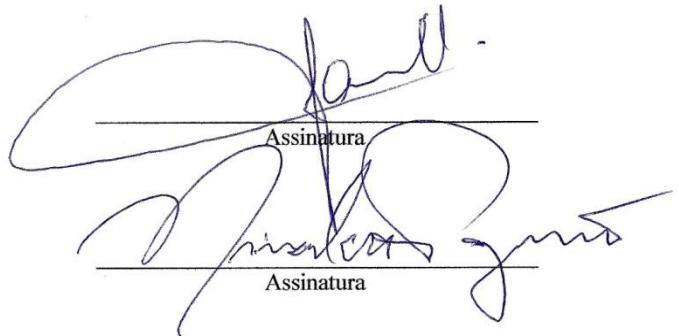
Data da defesa: 22/03/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 22 de Março de 2011

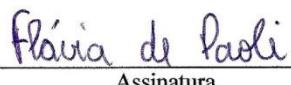
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Angelo Camilli (Orientador)



José Angelo Camilli
Assinatura

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto



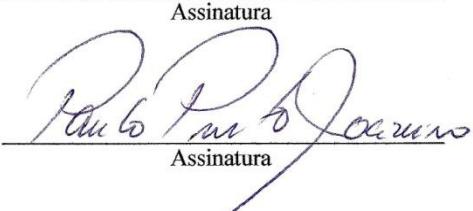
Nivaldo Antonio Parizotto
Assinatura

Profa. Dra. Flávia de Paoli



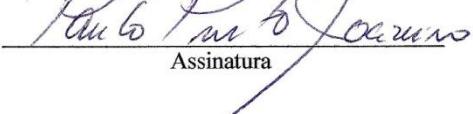
Flávia de Paoli
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria



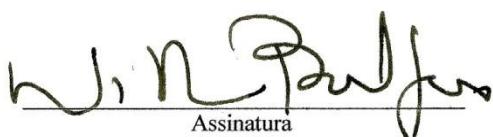
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro



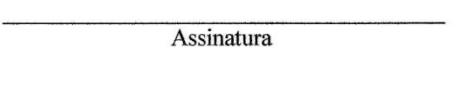
Paulo Pinto Joazeiro
Assinatura

Prof. Dr. William Dias Belangero



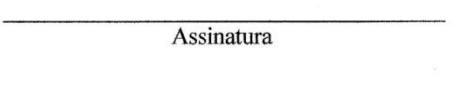
William Dias Belangero
Assinatura

Profa. Dra. Adriana Pertille



Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder



Assinatura

“Para chegar à pedra rara, o garimpeiro terá seus dedos feridos pelas pedras comuns. Mas ele conhece os sofrimentos de seu ofício. Ele não se prende ao medo dos ferimentos, mas investe constantemente em movimentos de procura. Mete a unha no chão, peneira os excessos, remexe a lama, até que os olhos encontrem o brilho opaco da diferença. Com a descoberta, o sorriso nasce, restaura e faz esquecer a dor que marcou o tempo da procura.”

Padre Fábio de Melo

A Deus, por me dar a vida! Por me proteger e guardar meus caminhos!

“Toda a sabedoria vem do Senhor e está com Ele para sempre. Quem poderá contar a areia das praias, as gotas da chuva e os dias do mundo? Quem poderá explorar a altura do céu, a extensão da terra e a profundidade do abismo? A sabedoria foi criada antes de todas as coisas, e a inteligência prudente foi criada antes dos séculos.”

Eclesiástico 1, 1-8

Dedicatória

Aos meus pais Neide e Wilson, minha avó Rosa (*in memoriam*), minha irmã

Paula e minha querida Ana Carolina

Obrigado pelo amor, incentivo, confiança e dedicação prestados nesta fase da minha vida. Por sempre me darem força e conforto diante das dificuldades. Por compartilharem momentos de alegria. Por me consolarem nas tristezas, sem reclamar. Por serem amigos verdadeiros.

“Amigo fiel é proteção poderosa, e quem o encontrar, terá encontrado um tesouro. Amigo fiel não tem preço, e o seu valor é incalculável. Amigo fiel é remédio que cura, e os que temem ao Senhor o encontrarão. Quem teme ao Senhor tem amigos verdadeiros, pois tal e qual ele é, assim será o seu amigo.”

Eclesiástico 6, 14-17

Agradecimento especial

Ao professor Dr. José Angelo Camilli por me dar a oportunidade de realizar mais um sonho, de aumentar meus conhecimentos e de crescer e amadurecer como homem. Obrigado pela orientação, dedicação, amizade, confiança e, também, por me ensinar a enxergar o mundo de um modo diferente, mais tranqüilo. O dia a dia foi me mostrando suas qualidades e competência. Sem dúvida isto foi muito importante para minha vida.

Agradecimentos

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural por ter me acolhido, dando-me a oportunidade de estudar, de entender e vivenciar a pesquisa.

À CAPES/PROEX por me conceder a bolsa no início do meu doutorado. À FAPESP por substituir a anterior me contemplando com sua bolsa e por me ajudar equipar nosso laboratório com Auxílio à Pesquisa.

À professora Dra. Laurecir Gomes pela amizade, pelo carinho, pelos conselhos, por me acolher no mestrado e me incentivar a sempre buscar mais conhecimentos. O tempo foi me mostrando suas qualidades e seu grande coração.

Ao professor Dr. Edson Rosa Pimentel pela amizade, paciência, sugestões e ajuda, buscando possíveis respostas para os problemas encontrados neste trabalho. Pelos momentos alegres. Sua educação e sabedoria são fantásticas!

A Líliam S. Panagio pela amizade, pela paciência, pelas conversas e pela ajuda nos momentos de sufoco. Somente uma pessoa muito especial como você para esclarecer as dúvidas e relembrar as obrigações dos alunos. Parabéns por sua competência!

Ao professor Dr. Celso Aparecido Bertran por me fazer enxergar que por trás de um homem simples e humilde existe um mentor extremamente sábio e dedicado ao trabalho.

Ao professor Dr. Benedicto de Campos Vidal pela amizade, pela conversas e conselhos, por me ajudar a buscar um bom tratamento para minha enfermidade.

Ao professor Dr. Humberto Santo Neto pelas sugestões valiosas, pela amizade e conversas, paciência e disponibilidade em compartilhar parte de seu conhecimento.

Às professoras Dra. Elaine Minatel, Dra. Maria Julia Marques e Dra. Valéria H. A. C. Quitete pela amizade, esclarecimentos de dúvidas e incentivo de meu trabalho.

Ao professor Dr. Hernandes Faustino de Carvalho por confiar em meu trabalho e permitir o uso de seus equipamentos.

Aos professores Dra. Adriana Pertille, Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Dra. Karina Fontana e Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira que compuseram a banca do meu exame de qualificação. Obrigado pelas palavras incentivadoras, críticas e sugestões.

Aos professores Dra. Flávia de Paoli, Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria e Dra. Tatiana Carla Tomiosso pela análise prévia da tese, pelas sugestões e disponibilidade em participar da pré-banca.

Aos professores Dra. Adriana Pertille, Dra. Flávia de Paoli, Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, Dr. Paulo Pinto Joazeiro e Dr. William Dias Belangero pela disponibilidade em participar da banca examinadora e pelo tempo dedicado à leitura da minha tese. Com certeza as sugestões de cada um irão valorizar consideravelmente meu trabalho.

Ao Reginaldo e Vani Borro pelo carinho, ajuda, confiança e incentivo.

Aos meus tios Henrique e Ruti por sempre apoiarem meus ideais e incentivarem meus estudos, sem esperar nada em troca.

Aos técnicos Francisco Angelo Mallatesta, Marco Aurélio Ribeiro de Paula, Norivaldo Celestino e Thiago Ribeiro de Carvalho (Instituto de Química) pela amizade, ajuda na realização dos experimentos, pelas explicações e pelos momentos de descontração.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia (Erika Campos, Marlene Lima, Paulo A. Bernardes, Paulo Francisco dos Santos, Stella M. Fick de Ferraz, Toni Donizeti dos Santos) pela ótima convivência.

Aos meus amigos Adriano (Mineiro), Borrinho, Eduardo Borro, Emerson, Fernanda, Marangoni, Nilza, Renato e Telma. Amigos de infância saudável. Amigos de todas as horas, de dias alegres ou tristes. Amigos sem interesse.

Aos meus amigos da pós-graduação Adriana Maurício, Adriano Biancalana, Alberto Moraes, Ana Paula T. Taniguti, Andrea Aro, Cintia Y. Matsumura, Eduardo Cândido, Evelise Aline Soares, Fabricia Predes, Fernanda M. de Almeida, Flávia de Paoli, Gustavo Ferreira Simões, Jaqueline M. Batista, Juliana C. Monteiro, Juliano A. Pereira, Letícia Montanholi, Luiz Gabriel Maturana, Manuel G. Florez, Oswaldo Reliquia, Rafael V. Machado, Rafaela Hell, Renata Zanon, Renato Ferretti, Rodrigo F. Inácio, Robson A. S. Boni, Samara C. de Carvalho, Sheila Victório, Silvia Pimentel, Taize Machado Augusto, Tatiana Tomiosso, Tereza Albuquerque, Wagner José Fávaro e todos os outros com quem convivi. Obrigado pelo carinho e amizade construída. Obrigado especial ao Gustavo e Taize, pelas mãos estendidas.

ÍNDICE

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
OBJETIVOS.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
I) Estudo do fêmur	23
1. Animais	23
2. Preparo do músculo e análise da integridade do sarcolema	23
3. Teste mecânico.....	24
5. Morfometria do fêmur.....	28
7. Quantificação de hidroxiprolina.....	32
8. Espectrometria de emissão ótica por plasma com acoplamento induzido	32
9. Análise termogravimétrica	34
10. Análise estatística.....	34
II) Estudo do osso parietal	34
2. Material biológico e divisão dos grupos experimentais	34
3. Procedimento cirúrgico no crânio	35
4. Estudo histológico	36
5. Estudo morfométrico	36
6. Análise Estatística	39
III) Referências bibliográficas	40

RESULTADOS	43
I) Artigo I.....	45
II) Artigo II	53
TRABALHOS PARALELOS	75
I) Artigo III	77
II) Artigo IV.....	95
CONCLUSÕES.....	119
ANEXOS	121
I) Direitos de autores que publicaram em revista da Elsevier (<i>Authors' Rights</i>).	123
II) Certificado da Comissão de Ética.....	125

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença neuromuscular resultante da ausência de distrofina. Em virtude do enfraquecimento muscular e do uso de glicocorticoides, pacientes com DMD têm ossos frágeis. O camundongo *mdx* é o modelo experimental largamente utilizado para o estudo da DMD e apresenta falta da distrofina, processo inflamatório intenso e degeneração da fibra muscular. Além disso, apresenta ciclos de degeneração/regeneração muscular que se iniciam de forma mais marcante após o vigésimo primeiro dia de vida. Estudos demonstraram que camundongos *mdx* têm níveis elevados de fatores de crescimento de fibroblasto e proteína quimiotática de monócito-1, bem como aceleração da cicatrização em lesões da pele. Com base nessas evidências, elaboramos duas hipóteses. A primeira hipótese é que podem existir alterações nos ossos de camundongos *mdx* por influência da ausência de distrofina ou por algum outro mecanismo inerente à doença mesmo antes da sua manifestação clínica. A segunda hipótese é que o processo de reparo ósseo espontâneo também possa estar acelerado, de modo semelhante à cicatrização da pele. Para testar a primeira hipótese o fêmur e o músculo quadríceps do camundongo *mdx* foram analisados aos 21 dias de vida. Para verificar a segunda hipótese foi produzido um defeito no osso parietal direito e a regeneração foi analisada após 15, 30 e 60 dias pós-cirúrgicos. Na análise morfológica do quadríceps as fibras musculares apresentavam núcleos periféricos e não foram observadas fibras positivas para o corante azul de Evans em ambos os grupos, indicando que não houve degeneração das fibras no grupo *mdx*. O fêmur do grupo *mdx* demonstrou osteopenia, menor quantidade de osteoblastos, menor conteúdo mineral e menor resistência mecânica na ausência de sinais de degeneração muscular em relação ao grupo controle. No estudo do osso parietal, os dados mostraram que não há diferença significante no volume de osso neoformado entre os grupos controle e *mdx* nos três tempos pós-operatórios e também entre os três tempos, independentemente do grupo estudado. Diante destes resultados, concluímos que o fêmur dos camundongos *mdx* com 21 dias de vida pode conter um distúrbio interligado a algum fator genético, diretamente ou não relacionado com a ausência de distrofina. Isto demonstrou que a perda da qualidade óssea em camundongos *mdx* não ocorre somente em função do enfraquecimento muscular. Considerando a qualidade óssea inferior do fêmur e a similaridade estatística da taxa de regeneração óssea, entendemos que a capacidade osteogênica da calvária *mdx* foi mais expressiva do que a dos camundongos controle, igualando a taxa de reparo ósseo de um tecido com menor qualidade à de ossos normais.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disease caused by lack of dystrophin. DMD patients have brittle bones because of muscle weakness and use of glucocorticoids. The *mdx* mouse is widely used as experimental model for the study of DMD and it presents lack of dystrophin, intense inflammatory process and muscle fiber degeneration. Moreover, it presents cycles of muscle degeneration/regeneration that becomes more marked after the twenty-first day of life. Studies have shown that *mdx* mice have elevated levels of fibroblast growth factor and monocyte chemoattractant protein-1, as well as accelerate wound healing in skin lesions. Based on this evidence, we formulate two hypotheses. The first hypothesis is that there may be changes in the bones of *mdx* mice by the influence of the absence of dystrophin or by some other mechanism inherent to the disease even before clinical manifestation. The second hypothesis is that the process of spontaneous bone repair can also be accelerated, similar to skin healing. To test the first hypothesis, the femur and the quadriceps muscle of *mdx* mice were analyzed at 21 days of life. To verify the second hypothesis a defect was produced in the right parietal bone and the regeneration was evaluated after 15, 30 and 60 days after surgery. In the morphological analysis of quadriceps were observed muscle fibers with peripheral nuclei and were not seen Evans blue dye positive fibers in both groups, indicating that there was no fiber degeneration in *mdx* group. The femur of the *mdx* group demonstrated osteopenia, lower number of osteoblasts, lower mineral content and lower mechanical strength in the absence of signs of muscular degeneration compared to the control group. In the study of the parietal bone, the data showed no significant difference in newly formed bone volume between control and *mdx* groups in the three moments after the operation and also between the three moments, regardless of the studied group. Given these results, we conclude that the femur of *mdx* mice at 21 days of life can contain a disorder linked to some genetic factor, directly or not related to the absence of dystrophin. This demonstrated that loss of bone quality in *mdx* mice occurs not only because of muscle weakening. Considering the lower femur bone quality and statistical similarity in the rate of bone regeneration, we believed that the osteogenic capacity of *mdx* calvaria was more expressive than that of control mice, equaling the rate of bone repair of a tissue with lesser quality to that of normal bones.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é constituído por componentes orgânicos e inorgânicos. Os componentes inorgânicos fazem com que o osso se caracterize como um tecido duro e rígido, enquanto que os componentes orgânicos propiciam a sua flexibilidade e elasticidade (Frankel & Nordin, 2003). Cerca de 90% da composição orgânica do osso consiste de colágeno tipo I, enquanto os outros 10% é representado por proteínas não-colagênicas, glicoproteínas, peptídeos, carboidratos e lipídios (Kalfas, 2001). A parte inorgânica consiste primariamente de fosfato de cálcio e carbonato de cálcio, principalmente na forma cristais de hidroxiapatita (Kalfas, 2001).

O colágeno é composto por três cadeias de polipeptídios que formam uma estrutura em tripla hélice possuindo cada cadeia a seqüência repetitiva Gly-X-Y, sendo que X e Y pode ser qualquer aminoácido, embora freqüentemente sejam a prolina e a hidroxiprolina (Gelse et al., 2003). Após a síntese e liberação do colágeno para a matriz extracelular, suas fibrilas se alinham em arranjos regulares e produzem a matriz orgânica chamada de osteóide. No interior do osteóide, o íon cálcio é depositado como massas amorfas de fosfato de cálcio. Posteriormente, íons hidróxido e bicarbonato são gradualmente adicionados à fase mineral e cristais de hidroxiapatita maduros são formados (Clarke, 2008).

O colágeno é a proteína mais abundante da matriz óssea, exerce influência sobre a resistência mecânica do osso (Ruppel et al., 2008) e está associado com a sua tenacidade (*toughness*) (Burr, 2002; Ruppel et al., 2008), que é a capacidade do osso absorver energia antes de fraturar e está relacionada com a resistência ao impacto (Burr, 2002). Alguns estudos demonstraram que a organização e conteúdo de colágeno da matriz óssea contribuem, principalmente, para a tenacidade do osso (Wang et al., 2001). Currey e

colaboradores (1997) observaram que a tenacidade diminui quando o osso é sujeito à radiação de ionização que danifica o colágeno.

Embora o colágeno forme um arcabouço para a deposição dos íons cálcio e fosfato na formação de cristais de hidroxiapatita, as proteínas não-colagênicas controlam o início e o crescimento desses cristais (Clarke, 2008). Deste modo, o colágeno regula o aspecto espacial da mineralização por definir o local para deposição e crescimento mineral (Siperko & Landis, 2001). Entretanto, o aspecto temporal deste processo é comumente regulado por algumas macromoléculas (proteínas não-colagênicas) da matriz óssea, como os proteoglicanos (Young, 2003).

Os proteoglicanos consistem de um esqueleto protético central com uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos sulfatados covalentemente ligadas e exercem importante papel na fibrilogênese do colágeno (Provenzano & Vanderby Jr., 2006). Estas macromoléculas podem facilitar a nucleação do cristal de hidroxiapatita, seqüestrar íons minerais para aumentar a concentração local de cálcio e/ou fósforo ou facilitar a nucleação heterogênea (Clarke, 2008).

As células do tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são células que sintetizam os componentes da matriz orgânica. Estas células são capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Os osteoblastos se dispõem sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, em um arranjo que lembra um epitélio simples. Eles possuem prolongamentos citoplasmáticos que se prendem aos dos osteoblastos vizinhos. Quando um osteoblasto é envolvido pela matriz óssea, recém-sintetizada, este passa a ser chamado de osteócito. Dessa forma, osteoblastos e osteócitos representam as mesmas células em estágios funcionais diferentes (Ducy et al.,

2000; Clarke, 2008). O osteoclasto é multinucleado (possui de 6 a 12 núcleos) e é responsável pela reabsorção óssea. Esta célula é derivada de células hematopoiéticas progenitoras, que também dão origem aos monócitos e macrófagos. As citocinas e os fatores de crescimento cruciais para a diferenciação e a maturação dos osteoclastos em humanos são as interleucinas (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11), fator de necrose tumoral (TNF), fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (CSF-GM), dentre outros. Esses fatores atuam estimulando as células progenitoras de osteoclastos ou participando em um sistema parácrino, no qual os osteoblastos e as células do estroma da medula óssea desempenham um papel central (Teitelbaum, 2007).

Macroscopicamente, todos os ossos são formados por dois tipos de tecidos ósseos: osso cortical e osso trabecular. O osso cortical também é conhecido por osso compacto e se apresenta como um tecido duro e denso. O osso trabecular, também denominado de esponjoso, é preenchido por uma rede tridimensional de trabéculas ósseas e por espaços intersticiais. O cortical sempre envolve o trabecular, mas a quantidade relativa varia entre os ossos e entre os indivíduos, de acordo com as demandas funcionais. No entanto, tanto um tipo quanto o outro é capaz de resistir simultaneamente a forças de tração, compressão e de cisalhamento (Frankel & Nordin, 2003; Topoleski, 2003).

Quanto aos aspectos microscópicos existem dois tipos de tecido ósseo: imaturo (primário ou não lamelar) e maduro (secundário ou lamelar). Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea, porém, apresentam diferentes organizações tridimensionais de suas fibras de colágeno. O tecido ósseo primário é o primeiro tipo de tecido que aparece na formação da estrutura óssea. A matriz neste estágio apresenta feixes entrelaçados de fibras colágenas, sem organização definida, contendo

grande número de osteócitos irregularmente distribuídos no interior das trabéculas ósseas neoformadas. O tecido ósseo secundário apresenta fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras, em camadas concêntricas em torno de um canal central, denominado canal de *Havers*, por onde correm vasos sangüíneos e nervos. Os canais medulares de *Havers* se comunicam entre si com a cavidade medular e com a parte externa do osso por canais transversais (ou oblíquos), os canais de *Volkmann* (Junqueira & Carneiro, 1999; Topoleski, 2003).

Para se adaptar ao carregamento mecânico funcional, o esqueleto possui um sistema de resposta afinado que reconhece a intensidade do estímulo mecânico. A diminuição deste estímulo promove a reabsorção enquanto o seu aumento favorece a preservação e a formação óssea. As células ósseas, portanto, devem ser capazes de responder à diminuição ou à ausência de carga, iniciando a reabsorção do tecido. Os resultados desta reabsorção podem ser vistos em ossos de paraplégicos, astronautas e cobaias que foram imobilizadas (Rubin & Greenfield, 2005).

O tecido ósseo pode sofrer alterações em suas propriedades bioquímicas, morfológicas e/ou biomecânicas sob a influência da idade (Hamrick et al., 2006), da imobilização (Kaneps et al., 1997), do exercício (Hart et al., 2001; Renno et al., 2007), de doenças metabólicas (Renno et al., 2007) ou de doenças neuromusculares (McDonald et al., 2002; Bianchi et al., 2003). Deste modo, o remodelamento ósseo não é unicamente requerido para repor tecido lesionado ou morto, mas também ocorre em função da capacidade deste tecido se adaptar às demandas mecânicas a ele impostas bem como responder a mudanças nutricionais e/ou metabólicas (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

Por serem responsáveis, junto com os músculos, pela movimentação, sustentação e proteção de órgãos vitais, os ossos estão constantemente sujeitos a forças (cargas) de tração, compressão, envergamento, deslizamento, torção e por ações combinadas destes tipos de forças (Frankel & Nordin, 2003). Baseado nos princípios biomecânicos, o osso responde as forças da natureza, incluindo a gravidade, a reação do solo e a contração muscular. Quando uma força é aplicada ao osso, uma resistência interna se desenvolve (Downey & Siegel, 2006). Portanto, o conhecimento das propriedades mecânicas é útil para a avaliação de sua integridade.

Dentre os tipos de testes mecânicos, o teste de envergamento é útil para medir as propriedades mecânicas de ossos inteiros de pequenos animais (Turner & Burr, 1993). O teste de envergamento pode ser de flexão em 3 ou em 4 pontos. O de 4 pontos requer que a força em cada um dos pontos de carregamento seja igual. Este requerimento é simples para aplicar em espécimes com formato regular, mas é muito difícil para ser executado em ossos inteiros (Turner & Burr, 1993). Assim, o teste de flexão em 3 pontos é simples e fornece dados razoáveis de força numa estrutura relativamente uniforme, sendo o mais indicado (Turner & Burr, 1993; Akhter et al., 2001).

Nos testes mecânicos a relação entre a força (*load*) aplicada à estrutura e o deslocamento ou deformação absoluta (*displacement*) em resposta a esta força é chamada curva força-deslocamento (*load-displacement curve*) (Figura 1). Esta curva é útil para determinar as propriedades mecânicas de uma estrutura como um todo, como um osso, ligamento ou tendão inteiro (Frankel & Nordin, 2003). A curva força-deslocamento pode ser dividida em duas regiões: região de deformação elástica (fase elástica) e a região de deformação plástica (fase plástica). O ponto limite entre estas duas regiões é denominado

limite elástico ou limite de proporcionalidade (*yield point*) (Turner & Burr, 1993; Frankel & Nordin, 2003; Downey & Siegel, 2006). A região de deformação elástica imita o comportamento de uma mola, pois a deformação aumenta linearmente com o aumento da força e após a retirada da força o osso retorna a sua forma original. No entanto, não se pode considerar que ossos se comportem como uma mola perfeita por causa da sua natureza viscoelástica, devido à presença de fluidos na matriz óssea. Esta viscoelasticidade causa perda de energia elástica quando se realiza um ensaio de carregamento e descarregamento (Turner & Burr, 1993). Na região de deformação plástica, o osso não mais retornará à sua dimensão original quando a força for removida e, deste modo, alguma deformação residual será permanente. Se a força for progressivamente aumentada, o osso falhará em algum ponto, ou seja, o osso será fraturado. Em muitos casos esta região é importante, principalmente quando a ruptura não ocorre imediatamente após o limite elástico, pois o material deverá absorver mais energia antes de se romper (Frankel & Nordin, 2003).

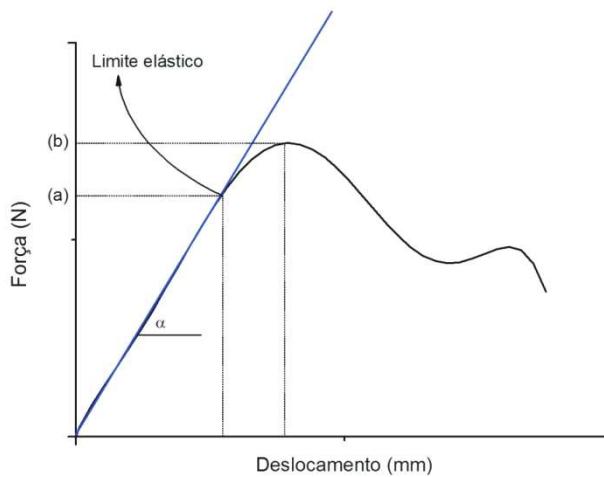


Figura 1. Representação da curva força-deslocamento. O limite elástico divide a curva em 2 regiões: elástica e plástica. (a) indica o ponto elástico e determina força no limite elástico. (b) indica a força máxima e α representa a inclinação da região elástica (rigidez estrutural).

A curva força-deslocamento demonstra as propriedades estruturais de um osso. Ela pode ter seus parâmetros normalizados e, a partir deste procedimento, ser construída a curva tensão-deformação relativa (*stress-strain curve*). Esta curva demonstra as propriedades materiais do osso e possui regiões análogas às da curva força-deslocamento. A tensão é uma resistência interna do tecido ósseo e é tipicamente definida como força por unidade de área. A tensão pode ser classificada como de compressão, de tração ou de cisalhamento e depende de como e em que direção as forças são aplicadas. A deformação relativa demonstra uma mudança da dimensão da estrutura e é tipicamente definida como a porcentagem de mudança no comprimento (Turner & Burr, 1993; Whiting & Zernicke, 2001; Frankel & Nordin, 2003).

A inclinação da região elástica curva força-deslocamento é chamada de rigidez estrutural ou extrínseca (*stiffness*); a da curva tensão-deformação, de modulo elástico (Young) ou rigidez intrínseca. Ossos maiores possuem maior rigidez estrutural do que ossos menores, mas podem apresentar rigidez intrínseca similar (Turner & Burr, 1993). Por exemplo, o fêmur é muito maior do que a menor falange de uma mesma pessoa e apesar de possuir maior constituição estrutural (geométrica) ela pode ter constituição material semelhante (Whiting & Zernicke, 2001). Então, a rigidez extrínseca depende da forma e do tamanho do osso inteiro e a rigidez intrínseca depende da organização e constituição de macromoléculas e do conteúdo mineral (Ferreti et al., 2001).

A carga mecânica no esqueleto pode ser proveniente da atividade muscular, da reação do solo e/ou da gravidade (Frankel & Nordin, 2003; Downey & Siegel, 2006). As forças oriundas da contração muscular agem direta ou indiretamente no osso e são responsáveis por sobrecarregá-lo, produzindo um estímulo osteogênico. Em um osso mais

de 70% do momento fletor é transmitido pela força muscular em vez do peso do corpo, reforçando a idéia de que a força muscular exerce maiores cargas nos ossos do que as forças gravitacionais associadas ao peso (Iwamoto et al., 1999). Além disto, os fenômenos de perda óssea com o desuso, como em paralisia muscular induzida por botox, (Warner et al., 2006a) e o acréscimo ósseo com o carregamento mecânico *in vivo* (Gross et al., 2002) certamente enfatizam a importância do estímulo mecânico para a manutenção do osso (Warner et al., 2006b). Assim, portadores de doença neuromuscular, como a distrofia muscular, provavelmente apresentarão um comprometido metabólico significativo do osso, aumentando sua fragilidade e possivelmente diminuindo sua resistência às tensões (Bianchi et al., 2003).

O termo “distrofia muscular progressiva” faz referência a um grupo de doenças degenerativas hereditárias causadas por alterações nos genes que codificam uma ampla variedade de proteínas, tais como as da matriz extracelular, proteínas associadas à membrana e proteínas da matriz nuclear da fibra muscular (Lovering et al., 2005). A forma mais comum e severa das distrofias musculares nos humanos é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). Esta se deve a mutação do gene localizado na banda Xp21 do cromossomo X que codifica a proteína distrofina, essencial para a manutenção da integridade das células musculares cardíacas e esqueléticas (Cohn & Campbell, 2000; Lovering et al., 2005). No sarcolema, a distrofina está associada à glicoproteínas e forma o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) (Petrof, 2002; Spencer & Mellgren, 2002; Watchko et al., 2002). Este complexo atravessa o sarcolema e estabelece uma ligação mecânica entre o citoesqueleto da fibra muscular e a matriz extracelular, sendo responsável pela estabilidade mecânica das fibras musculares (Petrof, 2002; Watchko et al., 2002)

(Figura 2). A distrofina é encontrada no músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo liso, cérebro (Prior & Bridgeman, 2005) e cerebelo (Cyrulnik & Hinton, 2008). Até o momento, não há nenhuma informação de sua presença em ossos.

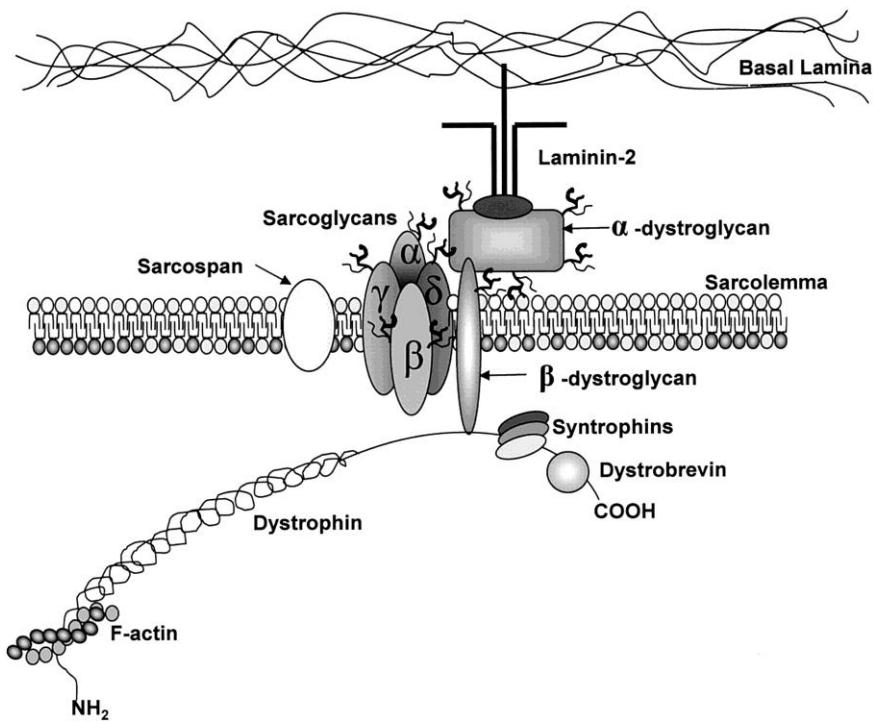


Figura 2. Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) no sarcolema. As proteínas associadas à distrofina são as do complexo distrofoglicano (α e β -dystroglicana), complexo sarcoglicano (α -, β -, γ -, δ -sarcoglicana) e subcomplexos citoplasmáticos. Retirado de Watchko et al. (2002).

A ausência da distrofina interrompe a ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto da fibra, promovendo instabilidade do sarcolema (fibras musculares perdem a sua estabilidade) e desorganização dos componentes do CDG durante os ciclos de contração e relaxamento do músculo, o que permite o influxo exacerbado de íons cálcio, ativação de proteases endógenas dependentes do cálcio, inibição da atividade mitocondrial

e hipercontração da fibra muscular (Salimena et al., 2004, Lovering et al., 2005). Inicia-se então um processo de regeneração muscular através da ativação de células satélites com posterior formação e amadurecimento dos miotubos em fibras musculares, porém, este é prejudicado ou insuficiente na DMD. Gradualmente os músculos são substituídos por gordura e tecido fibroso, o que justifica a perda da função observada nesses pacientes (Grounds et al., 2005).

Segundo Frezza e colaboradores (2005), a DMD em crianças causa debilidade e fraqueza dos músculos do quadril, por exemplo, comprometendo o ato de se levantar do chão e o andar (deambular), tornando as quedas freqüentes. Crianças portadoras de DMD apresentam menor densidade mineral óssea (Larson & Henderson, 2000; McDonald et al., 2002; Bianchi et al., 2003) e maior probabilidade de fraturar algum osso (McDonald et al., 2002; Bianchi et al., 2003). A diminuição da densidade mineral ocorre paralelamente com o avanço da doença demonstrando quadro osteoporótico (Bianchi et al., 2003; Söderpalm et al., 2007), enquanto as fraturas ocorrem principalmente em crianças que ainda conseguem deambular (Bianchi et al., 2003; Douvillez et al., 2005; Söderpalm et al., 2007).

Aparicio e colaboradores (2002) diagnosticaram a osteoporose no fêmur proximal e na coluna lombar em crianças portadoras de DMD que ainda deambulavam sem o auxílio de órteses e que não eram medicadas com glicocorticosteróides (GC). Bianchi e colaboradores (2003) observaram que pacientes tratados ou não com GC demonstraram diminuição acentuada da densidade mineral óssea quando comparados com o grupo controle (saudável), no entanto a densidade foi menor em pacientes tratados com GC. Deste modo, concluíram que o fator determinante do prejuízo ósseo é a diminuição da força muscular. O tratamento com GC aumenta a força muscular destes pacientes provavelmente

por reduzir a resposta inflamatória resultante do processo degenerativo nos músculos. No entanto, a redução da massa óssea é um efeito colateral da terapia em longo prazo por GC (Bianchi et al., 2003). Foi demonstrado que o GC tem ação supressora da formação óssea por aumentar a apoptose osteoblástica, além de aumentar a reabsorção óssea por aumentar a osteoclastogênese (Canalis et al., 2004).

Um modelo experimental largamente utilizado para o estudo da DMD é o camundongo *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) que é proveniente de uma mutação espontânea identificada na linhagem de camundongos C57BL/10-ScCr (Muller et al., 2001; Lovering et al., 2005; Vainzof et al., 2008). Tal como no humano com DMD, apresenta mutação genética resultando na falta da distrofina, processo inflamatório intenso nos músculos e degeneração da fibra muscular (Biggar et al., 2002; Lovering et al., 2005; Vainzof et al., 2008). Os camundongos *mdx* apresentam ciclos de degeneração e regeneração das fibras musculares que se iniciam de forma mais acentuada e significante após o vigésimo primeiro dia de vida, principalmente nos músculos esqueléticos do membro posterior (McGeachie et al., 1993; Pastoret & Sebille, 1995; Porter et al., 2003b, Briguet et al., 2004; Grounds and Torrisi, 2004; Reed and Bloch; 2005). No músculo esquelético do camundongo *mdx*, ao contrário do que acontece nos humanos com DMD, a regeneração parece compensar o processo degenerativo muscular com menor fibrose e, consequentemente, mantendo a função muscular (Yablonka-Reuveni & Anderson, 2006).

Para elucidar a anormalidade do metabolismo em camundongos distróficos, Aoyagi e colaboradores (1981) compararam a atividade de 27 tipos de enzimas em vários tecidos, inclusive o ósseo, entre camundongos normais e distróficos. Seus resultados demonstraram que a maioria das atividades enzimáticas estava significativamente alterada no grupo

distrófico, principalmente em músculos e ossos, sugerindo que a pesquisa terapêutica deveria focalizar suas metas não somente para os músculos, mas também para outros tecidos, como o tecido ósseo. No grupo distrófico deste estudo foi observada diminuição de um tipo de marcador de formação óssea, a fosfatase alcalina, demonstrando alteração significativa na taxa de remodelamento ósseo.

Os fatores de crescimento, as citocinas e as quimiocinas representam elementos essenciais na modulação da regeneração e diferenciação da célula muscular (Straino et al., 2004). Interessantemente, estudos têm demonstrado que há níveis elevados de fatores de crescimento e de quimiocinas no metabolismo do camundongo *mdx*, tais como o fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) (D'Amore et al., 1994), a proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) (Porter et al., 2003a) e o fator de crescimento neural (Toti et al., 2003). Neste sentido, Straino e colaboradores (2004) observaram um aumento do número de arteríolas durante a isquemia dos membros posteriores e cicatrização da pele em camundongos *mdx* quando comparados aos camundongos normais. Eles identificaram uma ligação entre a ausência da distrofina e a neovascularização, sugerindo que o aumento da vasculogênese pode representar uma resposta adaptativa do organismo aos níveis patológicos da degeneração muscular. Além disto, o metabolismo do tecido ósseo do camundongo *mdx* também sofre interferência da ação de fatores osteogênicos, elevados em pacientes com DMD, que são liberados pelas miofibras injuriadas (D'Amore et al., 1994).

Os trabalhos que evidenciaram os efeitos deletérios da distrofia muscular sobre os ossos em humanos (Larson & Henderson, 2000; McDonald et al., 2002; Bianchi et al., 2003; Douvillez et al., 2005) e em camundongos (Aoyagi et al., 1981) foram realizados após a manifestação dos sintomas clínicos da doença. Então, o prejuízo da capacidade

funcional dos músculos em portadores de DMD é um fator que promove o comprometimento do tecido ósseo.

Considerando as alterações metabólicas demonstradas no camundongo *mdx*, não se pode afirmar que as alterações encontradas no tecido ósseo sejam decorrentes exclusivamente do enfraquecimento muscular ou da ausência de carga mecânica. Além disso, a existência de evidências demonstrando níveis elevados de fatores de crescimento e aceleração do processo de reparo de lesões na pele do camundongo *mdx* (Straino et al., 2004) fornece elementos importantes para acreditar que a osteogênese e, consequentemente, os processos de modelagem e reparo ósseo também possam estar alterados.

Deste modo, este estudo levanta duas hipóteses. A primeira hipótese é que podem existir alterações nos ossos de camundongos *mdx* (ou por influência da ausência de distrofina, ou por algum outro mecanismo biológico anormal inerente à própria doença) mesmo antes da manifestação clínica da doença, isto é, anteriormente aos ciclos de degeneração/regeneração muscular. A segunda hipótese, fundamentada nas evidências de níveis elevados de fatores de crescimento no camundongo *mdx*, é que o processo de reparo ósseo também possa estar acelerado, de modo semelhante à cicatrização da pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhter, M.P., Cullen, D.M., Gong, G., Recker, R.R. 2001. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP₁ and EP₂ knockout mice. *Bone*, 29: 121-125.
- Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Umezawa, H. 1981. Various enzyme activities in muscle and other organs of dystrophic mice. *J Clin Invest*, 67: 51-59.
- Aparicio, L.F., Jurkovic, M., DeLullo, J. 2002. Decreased bone density in ambulatory patients with duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr. Orthop.* 22(2): 179-81.
- Bianchi, M.L., Mazzanti, A., Galbiati, E., Saraifoger, S. et al. 2003. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int*, 14: 761-767.
- Biggar, W.D., Klamut, H.J., Demacio, P.C., Stevens, D.J., Ray, P.N. 2002. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 401: 88-106.
- Briguet, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., Meier, T., Magyar, J.P. 2004. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. *Neuromuscul Disord*, 14: 675-82.
- Burr, D.B. 2002. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, 31(1): 8-11.
- Canalis, E., Bilezikian, J.P., Angeli, A., Giustina, A. 2004. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 34: 593–598.
- Clarke, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3(Suppl3): S131-9.
- Cohn, R.D.E., Campbell, K.P. 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*, 23: 1456-1471.

- Currey, J.D., Foreman, J., Laketic, I., Mitchel, J., Pegg, D.E., Reilly, G.C. 1997. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J. Orthop. Res.* 15: 111–117.
- Cyrulnik, S.E., Hinton, V.J. 2008. Duchenne muscular dystrophy: a cerebellar disorder? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 32(3): 486-96.
- D'Amore, P., Brown, R., Ku, P., Hoffman, E., Watanabe, H., Arahata, K., Ishihara, T., Folkman, J. 1994. Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 35: 362–365.
- Douvillez, B., Braillon, P., Hodgkinson, I., Berard, C. 2005. Pain, osteopenia and body composition of 22 patients with Duchenne muscular dystrophy: a descriptive study. *Ann Readapt Med Phys*, 48: 616-622.
- Downey, P.A., Siegel, M.I. 2006. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*, 86: 77-91.
- Ducy, P., Schinke, T., Karsenty, G. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 289(5484): 1501-1504.
- Ferretti, J.L., Cointry, G.R., Capozza, R.F. Capiglioni, R., Chiappe, M.A. 2001. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. *J Musculoskel Neuron Interact*, 1(3): 263-274.
- Frankel, V.H., Nordin, M. 2003. Biomechanics of bone. In: *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*, M. Nordin, and V.H. Frankel (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 22-49.
- Frezza, R.M., Silva, S.R.N., Fagundes, S.L. 2005. Atualização do tratamento fisioterapêutico das distrofias musculares de Duchenne e de Becker. *RBPS*, 18: 41-49.

- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T., 2003. Collagens – structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55: 1531-1546.
- Gross, T.S., Srinivasan, S., Liu, C.C., Clemens, T.L., Bain, S.D. 2002. Noninvasive loading of the murine tibia: an in vivo model for the study of mechanotransduction. *J Bone Miner Res*, 17: 493-501.
- Grounds, M.D., Sorokin, L., White, J. 2005. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 15: 381-391.
- Grounds, M.D., Torrisi, J. 2004. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*, 18: 676-82.
- Hamrick, M.W., Ding, K.H., Pennington, C. Chao, Y.J. et al. 2006. Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone*, 39: 845-853.
- Hart, K.J., Shaw, J.M., Vajda, E., Hegsted, M., Miller, S.C. 2001. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol*, 91: 1663-1668.
- Iwamoto, J., Yeh, J.K., Aloia, J.F. 1999. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* 24,163-169.
- Junqueira, L.C.U., Carneiro J. 1999. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9^a ed., pp.159-178.
- Kalfas, I.H. 2001. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*, 10(4): 1-4.
- Kaneps, A.J., Stover, S.M., Lane, N.E. 1997. Changes in canine cortical and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise. *Bone*, 21(5): 419-423.

- Larson, C.M., Henderson, R.C. 2000. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*, 20: 71-74.
- Lovering, R.M., Porter, N.C., Bloch, R.J. 2005. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Physical Therapy*, 85: 1372-1388.
- McDonald, D.G.M., Kinlali, M., Gallagher, A.C., Mercuri, E. et al. 2002. Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 44: 695-698.
- McGeachie, J.K., Grounds, M.D., Partridge, T.A., Morgan, J.E. 1993. Age-related changes in replication of myogenic cells in *mdx* mice: quantitative autoradiographic studies. *J Neurol Sci*, 119: 169-79.
- Muller, J., Vayssiere, N., Royuela, M., Leger, M.E. et al. 2001. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male *mdx* mice. *Journal of Muscle Research and Cell. Motility*, 22: 133-139.
- Pastoret, C., Sebille, A. 1995. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of Neurological Science*, 129: 97-105.
- Petrof, B.J. 2002. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *American Journal Physical Medicine and Rehabilitation*, 81: S162-S174.
- Porter, J.D., Guo, W., Merriam, A.P., Khanna, S. et al. 2003a. Persistent over-expression of specific CC class chemokines correlates with macrophage and T-cell recruitment in *mdx* skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*, 13: 223–235.

- Porter, J.D., Merriam, A.P., Leahy, P., Gong, B., Khanna, S. 2003b. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (*mdx*) mice. *Hum Mol Genet*, 12: 1813-21.
- Prior, T.W., Bridgeman, S.J. 2005. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Diagn.*, 7(3): 317-26.
- Provenzano, P.P., Vanderby Jr., R., 2006. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.*, 25: 71-84.
- Reed, P., Bloch, R.J. 2005. Postnatal changes in sarcolemmal organization in the *mdx* mouse. *Neuromuscul Disord*, 15: 552-61.
- Renno, A.C.M., Gomes, A.R.S., Nascimento, R.B., Salvini, T., Parizoto, N. 2007. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. *Exp Gerontol*, 42:517-22.
- Rubin, J., Greenfield, E.M. 2005. Osteoclast: Origin and Differentiation. In: *Bone Resorption*, F. Bronner, M.C. Farach-Carson and J. Rubin (eds). Springer, London, p.15.
- Ruppel, M.E., Miller, L.M., Burr, D.B. 2008. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos Int.*, 19(9): 1251-65.
- Salimena, M.C., Lagrota-Candido, J., Quírico-Santos, T. 2004. Gender dimorphism influences extracellular matrix expression and regeneration of muscular tissue in *mdx* dystrophic mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 122: 435-444.
- Siperko, L.M., Landis, W.J. 2001. Aspects of mineral structure in normally calcifying avian tendon. *J. Struct. Biol.*, 135: 313-320.

- Sommerfeldt, D.W., Rubin, C.T. 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 10: S86-S95.
- Spencer, M.J., Mellgren, R.L. 2002. Overexpression of a calpastatin transgene in *mdx* muscle reduces dystrophic pathology. *Human Molecular Genetics*, 11(21): 2645-2655.
- Söderpalm, A.C., Magnusson, P., Ahlander, A.C., Karlsson, J., Kroksmark, A.K., Tulinius, M., Swolin-Eide, D. 2007. Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 17: 919-928.
- Straino, S., Germani, A., Di Carlo, A., Porcelli, D. et al. 2004. Enhanced arteriogenesis and wound repair in dystrophin-deficient *mdx* mice. *Circulation*, 110: 3341-3348.
- Teitelbaum, S. L. 2007. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am. J. Pathol.*, 170(2): 427-435.
- Topoleski, L.D.T. 2003. Biomechanics of bone. In: Kinesiology: The mechanics & pathomechanics of human movement, C.A. Oatis (ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 36-43.
- Toti, P., Villanova, M., Vatti, R., Schuerfeld, K. et al. 2003. Nerve growth factor expression in human dystrophic muscles. *Muscle Nerve*, 27: 370 –373.
- Turner, C.H., Burr, D.B. 1993. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 14: 595-608.
- 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. 2008. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. *J Mol Neurosci*, 34: 241–248.
- Wang, X., Bank, R.A., TeKoppele, J.M., Agrawal, C.M. 2001. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J. Orthop. Res.*, 19: 1021–1026.

- Warner, S.E., Shea, J.E., Miller, S.C., Shaw, J.M. 2006a. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif Tissue Int*, 79: 395-403.
- Warner, S.E., Sanford, D.A., Becker, B.A., Bain, S.D. et al. 2006b. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone*, 38: 257-264.
- Watchko, J.F., O'Day, T.L., Hoffman, E.P. 2002. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol*, 93:407-417.
- Whiting, W.C., Zernicke, R.F. 2001. Biomecânica da lesão musculoesquelética. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, pp. 83-94.
- Yablonka-Reuveni, Z., Anderson, J.E. 2006. Satellite cells from dystrophic (*mdx*) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Developmental Dynamics*, 235: 203-212.
- Young, M.F. 2003. Bone matrix proteins: Their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos. Int.*, 14(Suppl3): S35–S42.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Em camundongos *mdx* há evidências de alterações metabólicas do tecido ósseo atribuídas à fraqueza muscular e evidências de que o processo de cicatrização de lesões na pele deste camundongo é acelerado. Diante disto, nós nos interessamos em analisar o fêmur de camundongos *mdx* antes do início dos ciclos mais intensos de degeneração/regeneração muscular (antes da manifestação clínica da doença), para verificar se existem alterações ósseas neste período de ausência de comprometimento muscular. Também investigamos o processo de reparo ósseo da calvária de camundongos *mdx* com 45 dias de vida. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivos avaliar as propriedades mecânicas, bioquímicas e morfométricas do fêmur e também o processo de cicatrização de defeito da calvária no camundongo *mdx* diante da ausência da proteína distrofina.

Objetivos específicos

1. Determinar a resistência mecânica do fêmur aos 21 dias de vida tendo como parâmetros as propriedades estruturais e materiais;
2. Quantificar o número de osteoblastos e osteoclastos do osso trabecular da epífise do fêmur por unidade de área e por superfície óssea;
3. Determinar os parâmetros morfométricos do fêmur (dimensões anatômicas, osso trabecular da epífise e osso cortical da diáfise);
4. Verificar se há alterações no conteúdo de hidroxiprolina e de matriz óssea inorgânica e alterações na razão Ca/P do fêmur;

5. Avaliar a cicatrização óssea no camundongo *mdx* em três tempos pós-operatórios (15, 30 e 60) frente à produção do defeito ósseo no osso parietal direito aos 45 dias de vida.

MATERIAL E MÉTODOS

I) ESTUDO DO FÊMUR

1. Animais

Camundongos machos C57BL/10-ScCr ($n = 38$; grupo controle) e C57BL/10-Dmd^{mdx} ($n = 38$; grupo *mdx*) com 21 dias de vida foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram pesados e sacrificados com dose excessiva (0.50ml/100g) de Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilazina (1:1) e os fêmures e os músculos quadríceps foram removidos. O experimento com animais foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP), certificado com protocolo número 1359-1.

2. Preparo do músculo e análise da integridade do sarcolema

O corante azul de Evans (AE) é amplamente usado como um marcador *in vivo* de lesões do sarcolema, evidenciando somente fibras musculares degeneradas ou em degeneração (Matsuda et al., 1995). O AE é composto por moléculas que não atravessam a membrana plasmática de fibras musculares esqueléticas íntegras e o acúmulo intracelular dele na fibra muscular esquelética indica perda da integridade e consequente alteração na permeabilidade do sarcolema (Hamer et al, 2002). Três animais de cada grupo foram pesados e receberam por via intraperitoneal solução 1% de AE em PBS na concentração de 0,1ml de solução por 10g de peso do animal (Matsuda et al., 1995). Após 12 horas da

injeção, os animais foram sacrificados. Os músculos quadríceps foram retirados e fixados em suporte de madeira, mantidos por 45 segundos em n-hexano a -130°C, e rapidamente transferidos para nitrogênio líquido. A microtomia foi realizada em criostato, sendo realizados cortes transversais com 7 µm de espessura do terço médio do músculo. Foram obtidos 6 cortes por músculo para análise do AE em fluorescência. As lâminas foram incubadas por 15 minutos com acetona à -20°C e montadas em DABCO (meio de montagem para fluorescência, Sigma). Os cortes foram analisados sob microscópio de fluorescência em objetiva de 40X. Além disto, outros cortes do músculo também foram corados com Hematoxilina-Eosina com o intuito de verificar a presença de fibras regeneradas (indicadas pela presença de núcleo central).

3. Teste mecânico

Para cada grupo foram utilizadas 15 amostras. Os fêmures direito de cada animal foram testados mecanicamente, até sua fratura completa, em teste de flexão em 3 pontos a uma velocidade de 0,05 mm/s (3 mm/min) no equipamento mecânico MTS (modelo TESTSTAR II), com célula de carga de 100 Kgf. O ponto superior e os 2 suportes inferiores possuíam 0,5 mm de raio em suas extremidades (Robertson et al, 2006). A distância entre os 2 suportes inferiores foi de 5 mm (Akhter et al, 2001). Cada fêmur foi testado no plano ântero-posterior, com o lado anterior voltado para cima suportando compressão e com o lado posterior para baixo suportando tensão (figura 2).

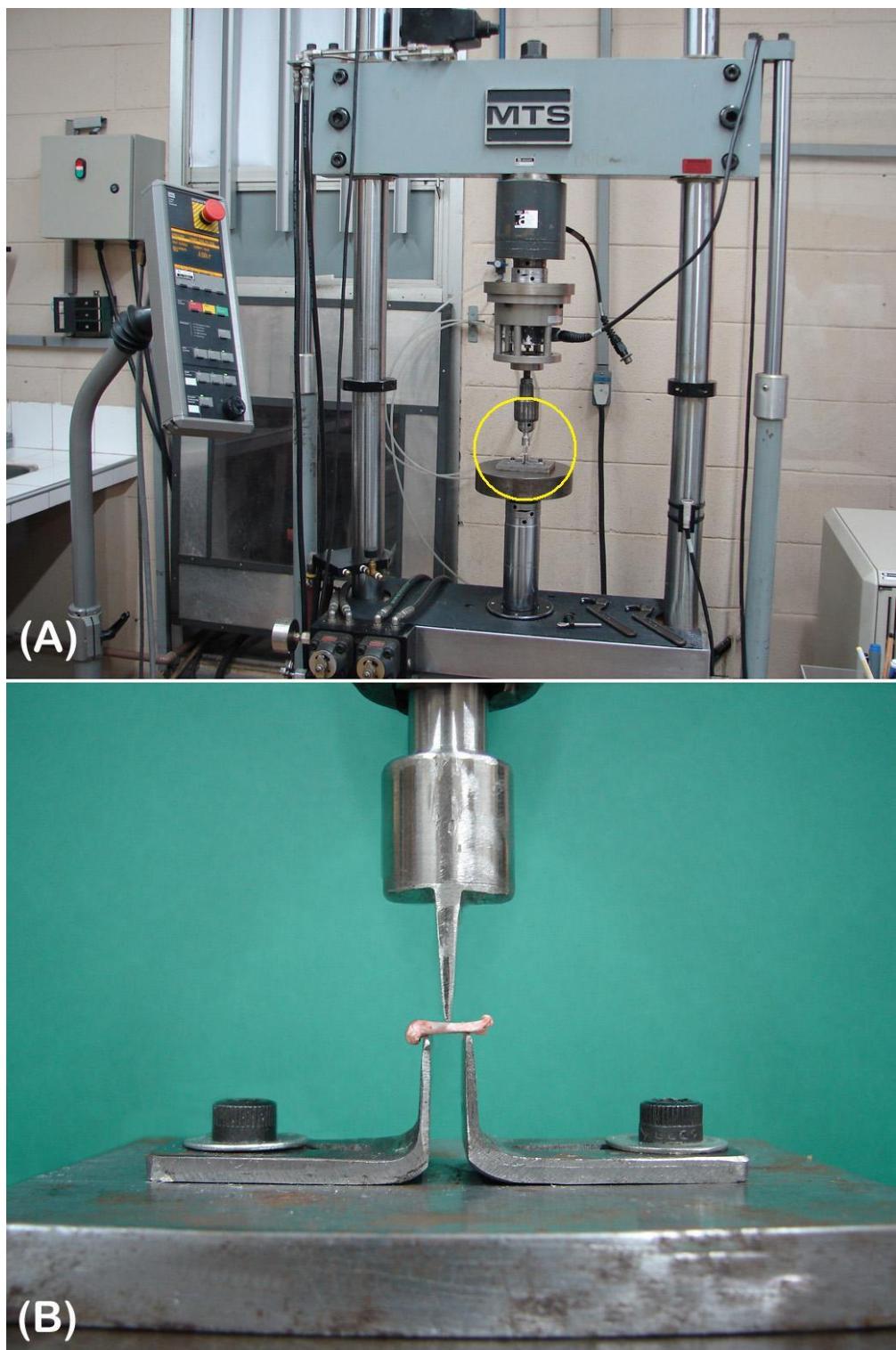


Figura 2. (A) Equipamento mecânico MTS (modelo TESTSTAR II). (B) Posicionamento do espécime para o teste de flexão em 3 pontos (encurvamento). A distância entre os apoios inferiores foi de 5 mm.

A força é aplicada na superfície anterior porque há maior estabilidade do osso com o aparato mecânico, minimizando a rotação durante o teste (Buhl et al, 2001). Os dados de força (carga ou *load*) e deslocamento (deformação absoluta ou *displacement*) foram obtidos diretamente do sistema MTS e registrados pelo *software* do computador acoplado à máquina de ensaio. Os registros destes dados foram utilizados para aquisição e cálculo das propriedades estruturais: força máxima (*maximum load*), força no limite elástico (*yield load*) e rigidez extrínseca ou estrutural (*stiffness*). A rigidez extrínseca foi calculada como sendo a inclinação da porção mais linear da região elástica da curva força-deslocamento (Akhter et al, 2001; Huang et al, 2003). A força no limite elástico foi obtida no ponto da curva força-deslocamento denominada de limite elástico ou limite de proporcionalidade (*yield point*). O limite elástico é o ponto imaginário que divide a região elástica da região plástica. É definido como a maior força que o material pode suportar, sem deixar qualquer deformação permanente quando descarregado. Para a determinação deste ponto foi obtida a equação da reta de um trecho linear da fase elástica (figura 3a). A partir desta equação foi obtida uma reta linear deslocada 0,2% (Turner & Burr, 1993) que possibilitou a determinação do limite elástico, exatamente no ponto onde esta reta e a curva força-deslocamento se cruzaram (figura 3b). Desta equação da reta, onde *y* é a variável que representa a força e *x* a variável que representa o deslocamento, foram determinadas novos deslocamentos acrescidos de 0,2% para as forças. Assim, para cada força (*y*) um novo deslocamento (*x'*) foi determinado (figura 3b).

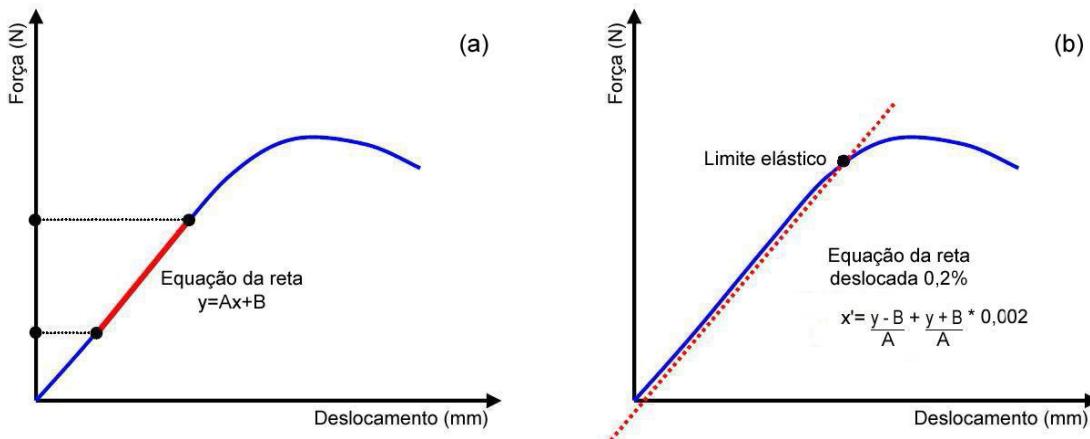


Figura 3. Desenho esquemático para obtenção do limite elástico. (a) Determinação da equação da reta na região (fase) elástica. (b) Limite elástico exatamente no ponto onde a curva e a nova reta se cruzam. No desenho: y é a variável que representa a força, A e B são constantes, x é a variável que representa os deslocamentos e x' é a variável que representa os novos deslocamentos na reta deslocada 0,2%.

Após o teste, os locais de falha de todos os espécimes foram fotografados, junto com um padrão de medida, por uma câmera digital de alta resolução a uma distância padronizada de acordo com Huang et al. (2003). Os parâmetros da área de secção transversal da cortical da diáfise foram medidos das imagens usando o *software NIS-Elements: Advanced Research* (USA). O momento de inércia de área (CSMI) do local da falha foi calculado pelo método de Turner e Burr para secções transversais irregulares (equação 1):

$$I = \sum_{i=0}^n \left(\frac{wh^3}{12} + whd_i^2 \right) \quad (1)$$

Onde I é o CSMI, n é número de pixels, w e h são a altura e largura de cada pixel e d_i é a distância do centro do elemento de área ao eixo dado na secção transversal (Turner e Burr, 1993). As propriedades materiais foram obtidas das propriedades estruturais (Turner e

& Burr, 1993; Akhter et al., 2001). As propriedades materiais avaliadas foram: tensão máxima (*maximum stress*), tensão no limite elástico (*yield stress*), módulo elástico (*elastic modulus*) e tenacidade (*toughness*). Os dados de força-deslocamento (*load-displacement*) foram transferidos para uma curva tensão-deformação (*stress-strain*) usando as equações 2 e 3. O módulo elástico foi calculado através da equação 4.

$$\sigma = \frac{\text{load} \cdot L \cdot c}{4I}$$

(2)

$$\varepsilon = \frac{12 \cdot c \cdot d}{L^2}$$

(3)

$$E = \frac{\text{stiffness} \cdot L^3}{48I}$$

(4)

Onde: σ é a tensão; L é a distância entre os 2 suportes inferiores; c é a distância máxima de pixels para a linha que cruza o centro de massa; ε é a deformação; d é o deslocamento; E é módulo elástico. A tenacidade corresponde à área sob a curva tensão-deformação (*stress-strain*) e está associada com a resistência ao impacto, ou seja, a capacidade do material absorver energia antes de fraturar (Burr, 2002).

Os testes foram realizados no equipamento no Laboratório de Propriedades Mecânicas na Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP.

4. Morfometria do fêmur

4.1. Dimensões anatômicas do osso

Após o sacrifício dos animais (12 animais por grupo) foi realizada a retirada e a limpeza das peças ósseas (12 fêmures), com remoção de todo o tecido mole circundante ao fêmur. Com um paquímetro digital e uma lupa foram feitas 4 medidas (figura 4) em cada

osso. Cada medida corresponde à distância entre 2 pontos de referência do próprio osso, e foram baseadas no estudo de Lammers e colaboradores (1998). As medidas obtidas foram:

- (A) Comprimento do fêmur (CF): do ponto mais proximal na cabeça do fêmur até o ponto mais distal na outra extremidade do osso;
- (B) Largura da diáfise do fêmur (LDiaf): largura através da porção mais estreita na metade do fêmur;
- (C) Largura do fêmur proximal (LP): do ponto mais anterior na cabeça do fêmur até a ponta trocanter maior;
- (D) Largura do fêmur distal (LD): largura através dos côndilos (sentido ântero-posterior), perpendicular ao comprimento do fêmur.

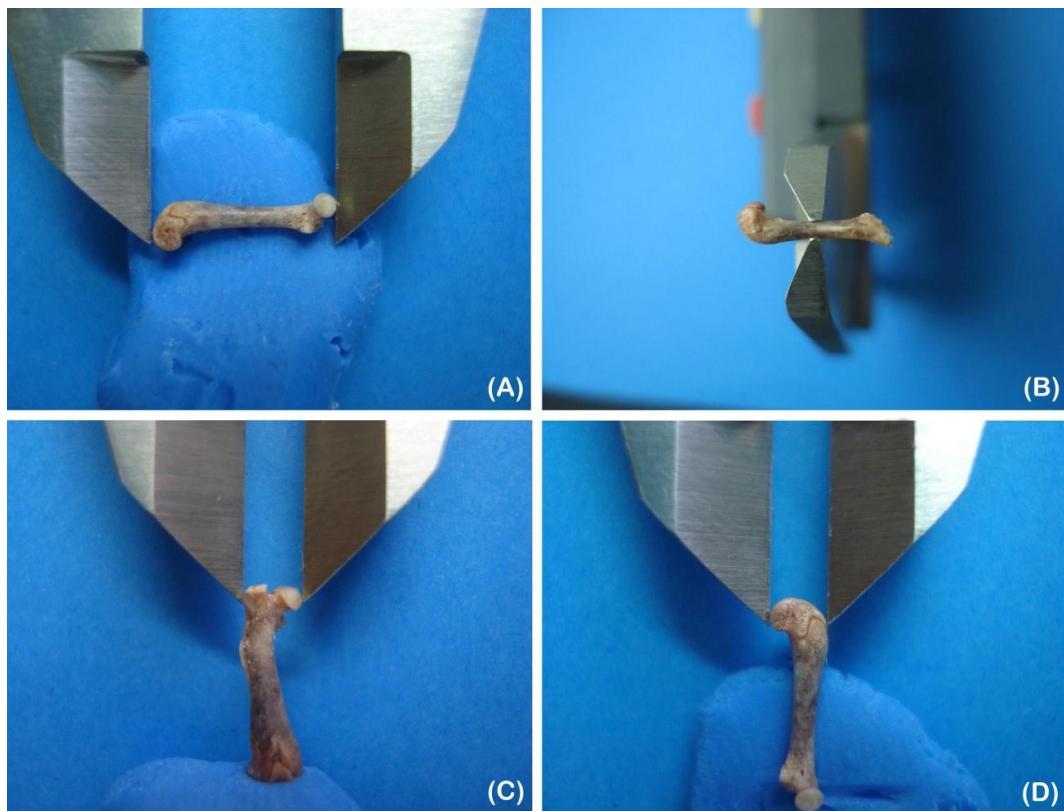


Figura 4. Localização no fêmur das medidas, segundo estudo realizado por Lammers e colaboradores (1998).

4.2. Osso trabecular da epífise

Para esta análise foram utilizados 6 fêmures de cada grupo (6 animais por grupo), sendo que para cada fêmur foi utilizado 6 cortes histológicos e de cada corte foi capturado 2 campos. Assim, foi utilizado um total de 72 campos que foram escolhidos aleatoriamente. O número mínimo e confiável de campos para as medidas morfométricas foi obtido de acordo com o estudo de Mandarim-de-Lacerda (1995). Para esta análise foi utilizada a epífise distal do fêmur esquerdo. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas à temperatura ambiente e descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 35 dias. Em seguida, as amostras foram processadas através de técnicas histológicas de rotina e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais com 5 μ m de espessura que foram corados com Hematoxilina-Eosina. Na seqüência foi realizada a medida da área, da fração área (área das trabéculas dividida pela área total do campo analisado) e da espessura das trabéculas ósseas com auxílio do software *NIS-Elements: Advanced Research* (USA) com objetiva de 20X acoplado a um fotomicroscópio da marca Nikon modelo Eclipse E400 com câmera Nikon modelo DXM 1200C (figura 5). Entretanto, para quantificar o número de osteoblastos e osteoclastos por área de tecido ($#/mm^2$) e por superfície óssea ($#/mm$) foram capturados 4 campos de cada secção histológica usando objetiva de 40x. As células contadas e consideradas como osteoclastos foram células grandes e multinucleadas localizadas nas superfícies escavadas do osso trabecular enquanto os osteoblastos foram contados como osteoblastos tipicamente secretórios com formato cubóide, com núcleos arredondados e dispostos em uma camada simples aderida à superfície óssea.

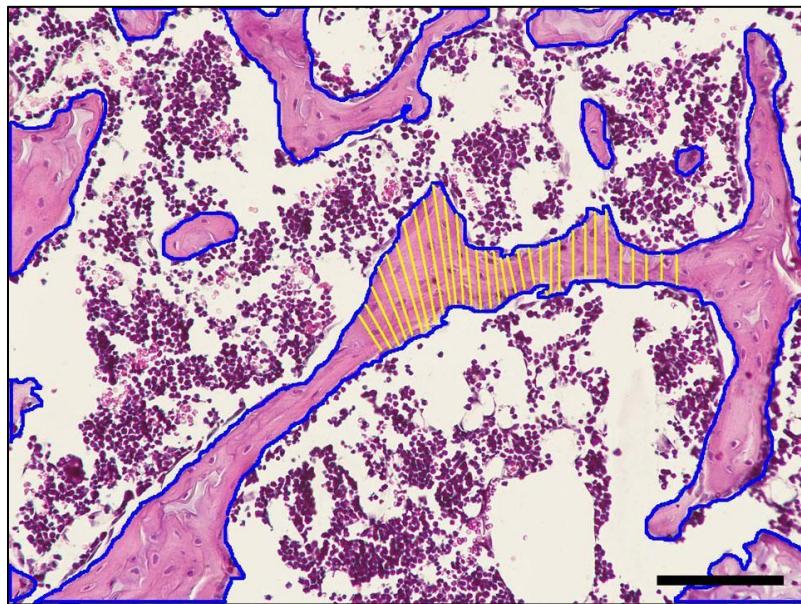


Figura 5. Corte transversal (1 campo) da epífise distal do fêmur mostrando como foi demarcada a área (em azul) e a espessura (em amarelo) das trabéculas ósseas. A medida da espessura foi feita em todas as trabéculas contidas no campo e em toda extensão de cada uma delas. Notar que na figura há a marcação somente de pequena região de uma das trabéculas. Barra = 100 μ m.

4.3. Osso cortical da diáfise

Para esta análise foram utilizados 6 fêmures de cada grupo (6 animais por grupo), sendo que para cada fêmur foram utilizados 12 cortes histológicos (1corte = 1 campo), cujas imagens foram capturadas com objetiva de 4X. O número mínimo e confiável de campos para as medidas morfométricas foi obtido de acordo com o estudo de Mandarim-de-Lacerda (1995). Para esta análise foi utilizada o terço médio da diáfise do fêmur esquerdo (figura 6). As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas à temperatura ambiente, descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 35 dias. Em seguida, as amostras foram processadas através de técnicas histológicas de rotina e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais com 5 μ m

de espessura que foram corados com Hematoxilina-Eosina. Com auxílio do *software NIS-Elements: Advanced Research* (USA) foram calculadas: área do osso cortical (área da secção transversal – área medular) e média da espessura cortical (figura 7).

5. Quantificação de hidroxiprolina

Para esta análise foram utilizadas 5 amostras de cada grupo (5 animais por grupo). A determinação do conteúdo de hidroxiprolina, que é uma estimativa da concentração de colágeno, foi baseada em Stegemann and Stalder (1967). As amostras foram desidratadas em acetona P.A. e clorofórmio:etanol (1:1), secadas e, posteriormente, hidrolisadas em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 16h a 107°C. Do material hidrolisado, foi utilizado 15µL para cada leitura, sendo acrescentado 1mL de solução de clorammina-T posteriormente. Após 20min foi adicionado 1mL de solução de ácido aldeído perclórico e o material foi mantido em incubação por 15min a 60°C, resfriado até 20°C e lido em espectrofotômetro, $\lambda = 550\text{nm}$.

6. Espectrometria de emissão óptica por plasma com acoplamento induzido (ICP/OES)

Para esta análise foram utilizadas 5 amostras de cada grupo (5 animais por grupo). Esta análise determina a razão Ca/P. Para eliminação de tecido mole circundante, os ossos foram macerados em água corrente por uma semana. Em seguida foram secados em temperatura ambiente, triturados e, posteriormente, dissolvidos em HNO₃ até a dissolução completa com posterior adição de água. Desta solução foram obtidas as razões Ca/P para os fosfatos de cálcio pela análise com Espectrômetro de Emissão Ótica por Plasma com Acoplamento Induzido. As curvas de calibração necessárias para a determinação da razão

Ca/P foram obtidas a partir de soluções, com concentrações conhecidas, que continham simultaneamente os íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Estas análises foram realizadas no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP.



Figura 6. Fêmur esquerdo. Vista anterior (a) e vista médio-lateral (b) do fêmur e vista da secção transversal no ponto médio do terço médio da diáfise (c). A partir desta secção histológica foram realizadas todas as medidas morfométricas propostas.

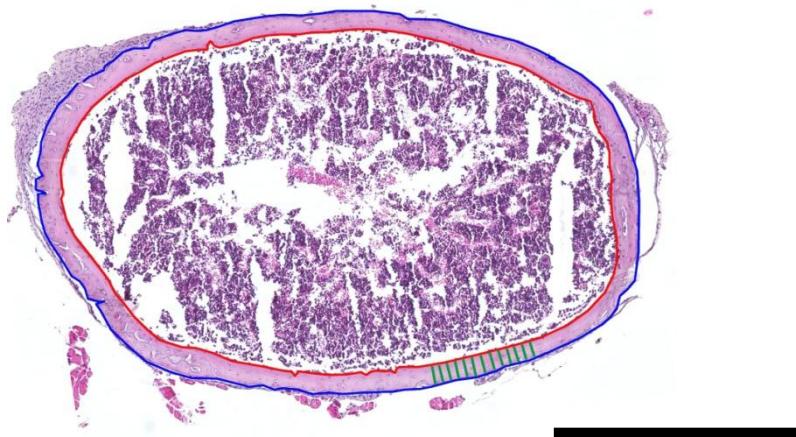


Figura 7. Corte transversal da diáfise do fêmur. A linha azul delimita a área de secção transversal da diáfise; a linha vermelha, a área medular; as linhas verdes, a espessura cortical. Para calcular a média da espessura cortical foram feitas medidas em toda extensão do osso cortical. A área do osso cortical é obtida da subtração da área de secção transversal pela área medular. Barra = 500 μm .

7. Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. Para esta análise foram utilizadas 5 amostras de cada grupo. Cada amostra é composta por um *pool* de 4 fêmures (2 direito e 2 esquerdo), sendo utilizados 10 animais por grupo. Para eliminação de tecido mole circundante, os ossos foram macerados em água corrente por uma semana. Em seguida foram secados em temperatura ambiente, triturados até virar pó. Para as leituras foram utilizadas massas entre 5 e 10mg. As análises termogravimétricas foram obtidas em *Universal V2.3C TA Instruments TGA* na faixa de temperatura entre 25° e 1000°C, com taxa de aquecimento de 10°C/minuto em atmosfera oxidante (ar sintético). Estas análises foram realizadas no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP.

8. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste-t de *Student* para comparar duas amostras independentes. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância ($p < 0,05$).

II) ESTUDO DO OSSO PARIETAL

1. Material biológico e divisão dos grupos experimentais

Camundongos machos C57BL/10-ScCr ($n = 15$; grupo controle) e C57BL/10-Dmd^{mdx} ($n = 15$; grupo *mdx*) foram operados aos 45 dias de vida. Após 15, 30 e 60 dias pós-

operatório os animais (5 por grupo) foram sacrificados com dose excessiva de anestésico e seus crânios foram retirados e preparados para análise.

2. Procedimento cirúrgico no crânio

O procedimento cirúrgico foi baseado no estudo de Silva e Camilli (2006). Os animais foram anestesiados com uma solução de 1:1 de Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Cetamina, administrada por via intramuscular com dose de 5mg/Kg e 100mg/Kg, respectivamente. Após a anestesia, foram feitas a tricotomia na região fronto-parietal da cabeça do animal e a assepsia da região com iodofor alcoólico. Após o isolamento da área cirúrgica, uma incisão longitudinal de aproximadamente 6 centímetros foi feita na pele com auxílio de um bisturi (Figura 8A). Em seguida o periôsteo foi afastado para expor a superfície do osso parietal direito. Com auxílio de um *punch* foi produzida uma falha (defeito) óssea, com 2 mm de diâmetro, que atravessou por completo a espessura da parede do osso (Figura 8B). A falha permaneceu vazia. O periôsteo foi reposicionado e a pele suturada. Todos os animais foram tratados com analgésico (dipirona sódica, 500 mg/mL) adicionado à água (*ad libitum*) na dose de 875 mg/kg durante os 5 primeiros dias do pós-operatório.

3. Estudo histológico

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas e descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 35 dias. Em seguida, as amostras foram processadas através de técnicas histológicas de rotina. Para cada calota foram obtidos 5 cortes histológicos. Cortes transversais com 5 μm de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina. As secções histológicas foram examinadas com auxílio de um fotomicroscópio da marca Nikon modelo 80i com objetivas de 10X e 20X e suas imagens foram capturadas com uma câmera Nikon modelo DS-Ri1.

4. Estudo morfométrico

A quantificação de osso neoformado, em porcentagem, no interior do defeito (falha) óssea foi baseada no estudo de Gosain et al. (2000). As medidas morfométricas das imagens das secções histológicas foram feitas com o software *NIS-Elements: Advanced Research 3.0*. O osso neoformado dentro do defeito foi determinado por dois métodos. No primeiro método, a porcentagem do osso neoformado no interior do defeito foi calculada como a razão entre o comprimento linear do osso neoformado e o comprimento inicial do defeito. O comprimento linear do novo osso foi determinado como a somatória de os comprimentos de regiões ósseas que viéssem a ser formadas, medidas através do eixo central do defeito (Figuras 9a e 10A-B). No segundo método, a porcentagem de osso foi calculada com base na razão entre a área de osso neoformado e a área total do defeito inicial (Figuras 9b e 10A-B).

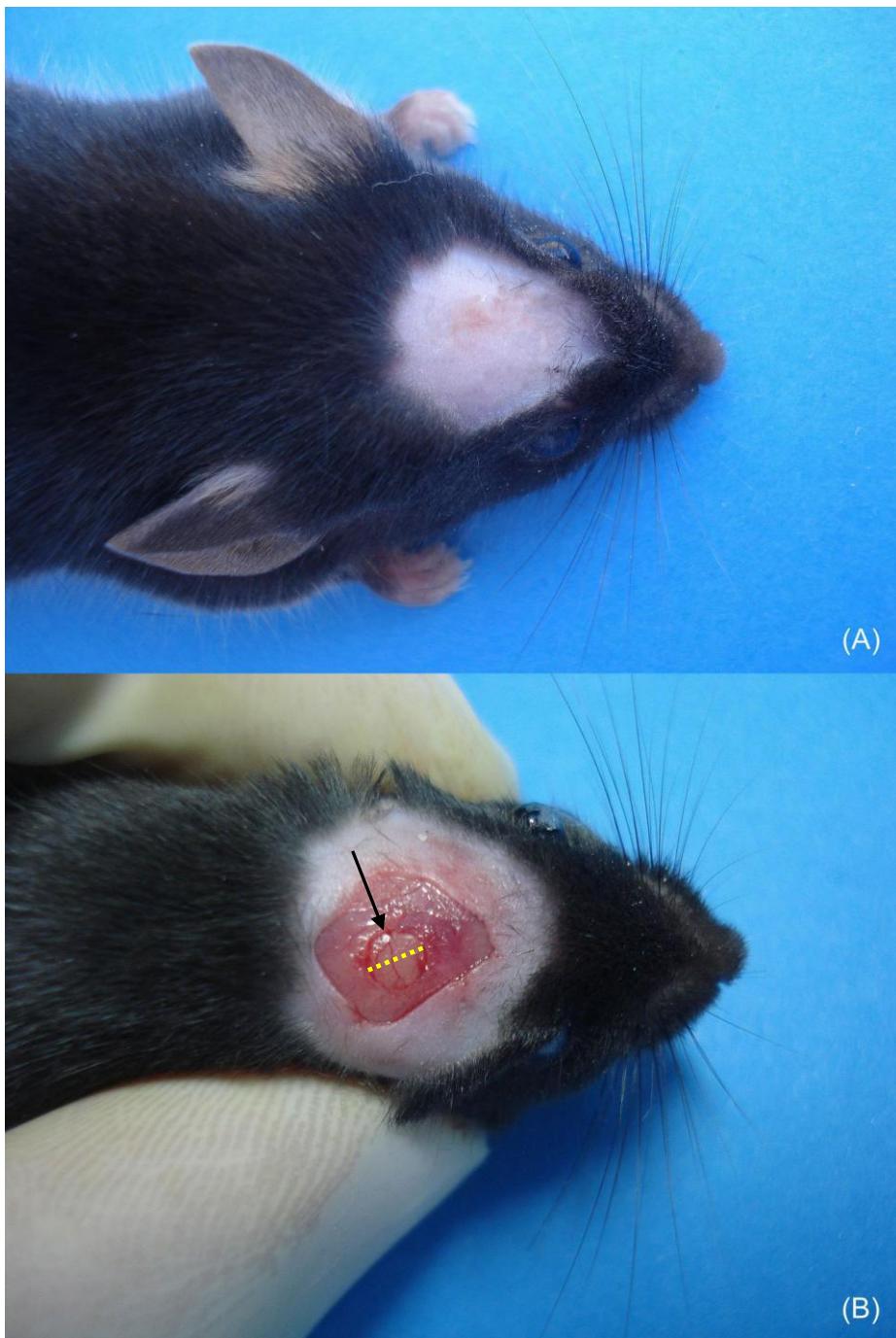
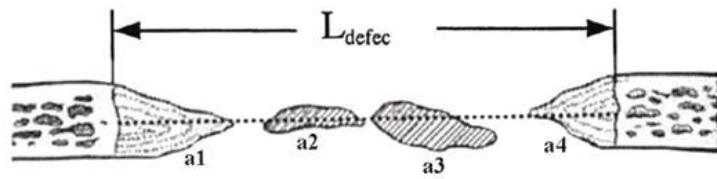
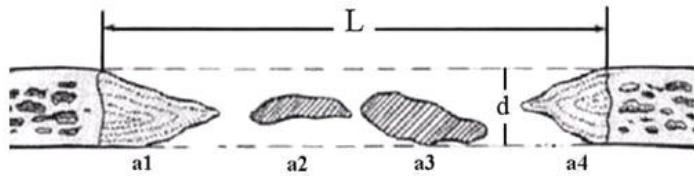


Figura 8. (A) Tricotomy da cabeça do camundongo. (B) Falha óssea (seta) com 2 mm de diâmetro (linha pontilhada amarela) produzido no osso parietal direito.



- Comprimento linear do osso neoformado (L_{novo}) = comprimento ($a_1 + a_2 + a_3 + a_4$)
- Comprimento do defeito inicial = L_{defec}
- Porcentagem do osso neoformado = $(L_{novo}/L_{defec}) \times 100$

(a)



- Área do osso neoformado = área ($a_1 + a_2 + a_3 + a_4$)
- Área do defeito inicial = $L \times d$
- Porcentagem do osso neoformado = $\frac{\text{Área do osso neoformado}}{\text{Área do defeito inicial}} \times 100$

(b)

Figura 9. Método utilizado por Gosain et al. (2000) para o cálculo do osso neoformado, baseado no comprimento linear (a) e na área de secção transversal (b).

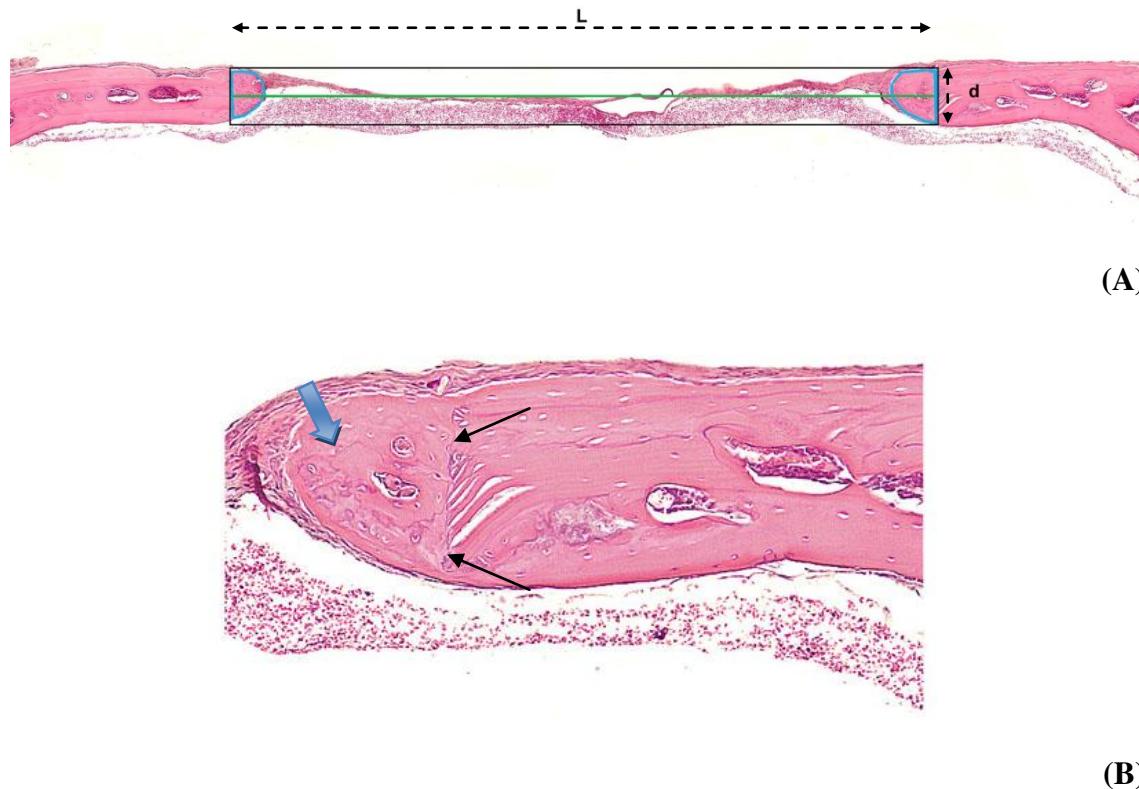


Figura 10. Método de Gosain et al. (2000) demonstrado no parietal direito de camundongo. (A) Linha verde representa o comprimento do defeito (falha) ósseo inicial (correspondência com a figura 1a); linha preta delimita a área do defeito inicial no momento da operação (correspondência com a figura 1b); linha azul delimita a área de osso neoformado. (B) Setas finas indicam a divisão entre o osso original e o neoformado; seta larga em azul indica osso neoformado. Corte histológico corado com Hematoxilina-Eosina (HE).

5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) de 2 fatores para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey se necessário. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância ($p < 0,05$).

III) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhter, M.P., Cullen, D.M., Gong, G., Recker, R.R. 2001. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP₁ and EP₂ knockout mice. *Bone*, 29: 121-125.
- Buhl, K.M., Jacobs, C.R., Turner, R.T., Evans, G.L., Farrell, P.A., Donahue, H.J. 2001. Aged bone displays an increased responsiveness to low-intensity resistance exercise. *J Appl Physiol*, 90: 1359-1364.
- Burr, D.B. 2002. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, 31(1): 8-11.
- Gosain, A.K., Song, L., Yu, P., Mehrara, B.J., Maeda, C.Y., Gold, L.I., Longaker, M.T. 2000. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. *Plast Reconstr Surg*, 106: 360-371.
- Hamer, P.W., McGeachie, J.M., Davies, M.J., Grounds, M.D. 2002. Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *J Anat.*, 200: 69-79.
- Huang, T.H., Lin, S.C., Chang, F.L., Hsieh, S.S., Liu, S.H., Yang, R.S. 2003. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol*, 95: 300-307.
- Lammers, A.R., German, R.Z., Lightfoot, P.S. 1998. The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat*, 162: 199-208.
- Mandarim-de-Lacerda, C.A. 1995. Métodos quantitativos em morfologia. EdUERJ, Rio de Janeiro, 1-131.

- Matsuda, R., Nishikawa, A., Tanaka, H. 1995. Visualization of dystrophic muscle fibers in *mdx* mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. J Biochem., 118: 959-64.
- Robertson, G., Xie, C., Chen, D., Awad, H. et al. 2006. Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2 $-/-$ mice. Bone, 39: 767-772.
- Silva, R.V., Camilli, J.A. 2006. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. J Craniofac Surg, 17: 297-301.
- Stegemann, H., Stalder, K., 1967. Determination of hydroxyproline. Clin. Chim. Acta, 18: 267-273.
- Turner, C.H., Burr, D.B. 1993. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. Bone, 14: 595-608.

RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho permitiram a elaboração de dois artigos científicos. Paralelamente, também foram elaborados uma mini-revisão relacionando ossos e ausência de distrofia e um estudo do tendão calcâneo do camundongo *mdx*, disponíveis em TRABALHOS PARALELOS.

- 1) Artigo I – Publicado na revista *Bone* (IF = 4,089)

Wilson Romero Nakagaki, Celso Aparecido Bertran, Cintia Yuri Matsumura, Humberto Santo-Neto, José Angelo Camilli. 2011. “Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of *mdx* mice”. *Bone* 48 (2): 372-379.

- 2) Artigo II – Em processo de tradução.

Wilson Romero Nakagaki, José Angelo Camilli. “Análise da capacidade osteogênica durante cicatrização espontânea de defeito ósseo da calvária de camundongos *mdx* em diferentes tempos de cicatrização”.



Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of *mdx* mice

Wilson Romero Nakagaki ^a, Celso Aparecido Bertran ^b, Cintia Yuri Matsumura ^a,
Humberto Santo-Neto ^a, José Angelo Camilli ^{a,*}

^a Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^b Chemistry Institute, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2010

Revised 20 August 2010

Accepted 7 September 2010

Available online 17 September 2010

Edited by: R. Baron

Keywords:

mdx

Femur

Mechanical strength

Collagen

Inorganic bone matrix

ABSTRACT

The bone tissue abnormalities observed in patients with Duchenne muscular dystrophy are frequently attributed to muscle weakness. In this condition, bones receive fewer mechanical stimuli, compromising the process of bone modeling. In the present study we hypothesize that other factors inherent to the disease might be associated with bone tissue impairment, irrespective of the presence of muscle impairment. *Mdx* mice lack dystrophin and present cycles of muscle degeneration/regeneration that become more intense in the third week of life. As observed in humans with muscular dystrophy, bone tissue abnormalities were found in *mdx* mice during more intense muscle degeneration due to age. Under these circumstances, muscle deficit is probably one of the factors promoting these changes. To test our hypothesis, we investigated the changes that occur in the femur of *mdx* mice at 21 days of age when muscle damage is still not significant. The mechanical (structural and material) and biochemical properties and morphometric characteristics of the femur of *mdx* and control animals were evaluated. The results demonstrated a lower strength, stiffness and energy absorption capacity in *mdx* femurs. Higher values for structural (load and stiffness) and material (stress, elastic modulus and toughness) properties were observed in the control group. *Mdx* femurs were shorter and were characterized by a smaller cortical area and thickness and a smaller area of epiphyseal trabecular bone. The hydroxyproline content was similar in the two groups, but there was a significant difference in the Ca/P ratios. Thermogravimetry showed a higher mineral matrix content in cortical bone of control animals. In conclusion, femurs of *mdx* mice presented impaired mechanical and biochemical properties as well as changes in collagen organization in the extracellular matrix. Thus, *mdx* mice developed femoral osteopenia even in the absence of significant muscle fiber degeneration. This weakness of the *mdx* femur is probably due to genetic factors that are directly or indirectly related to dystrophin deficiency.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Bone remodeling not only occurs to replace injured or dead tissue, but also due to the ability of tissue to adapt to mechanical loads and nutritional or metabolic alterations [1]. Mechanical loading of bone is the result of muscle activity, ground reaction and gravity [2]. The forces originating from muscle contraction act on bone and are responsible for overloading of bone, producing osteogenic stimulation. In addition, phenomena of disuse bone loss as observed in botox-induced muscle paralysis [3], and bone gain after *in vivo* mechanical loading [4] certainly emphasize the importance of mechanical stimulation for bone tissue regulation [5]. As a consequence, patients with myopathies such as muscular dystrophy present significant alterations in bone metabolism concomitant with muscle weakness, increasing the fragility of bones and reducing their mechanical strength [6].

The most common and severe type of muscular dystrophy in humans is Duchenne muscular dystrophy (DMD). This disease is caused by a mutation in the gene located in band Xp21 of the X chromosome, which encodes the protein dystrophin that is essential for the maintenance of the integrity of cardiac and skeletal muscle cells [7,8]. Human studies have shown a lower mineral density in bones of the trunk, hip and lower limbs of patients with DMD [6,9–11]. The decline in mineral density is probably due to the rapid progression of muscle fiber degeneration and also to a significant reduction in lean mass early in life [12].

The *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) mouse is an experimental model widely used for the study of DMD [8,13,14]. As observed in humans with muscular dystrophy, *mdx* mice carry a genetic mutation that results in the lack of dystrophin and in an intense inflammatory process in muscle [8,14,15]. Although some signs of muscle degeneration have already been observed before 21 days of age in dystrophic muscles of *mdx* mice, it has been widely accepted that cycles of degeneration/regeneration are most marked after the third week of life mainly in hind limb muscles [16–21]. Thus, this suggests that it has not yet sustained significant muscle damage up to 21 days of life. In addition, Aoyagi et al. [22] demonstrated significantly elevated

* Corresponding author. Fax: +55 19 3521 6185.

E-mail address: jcamilli@unicamp.br (J.A. Camilli).

activity of most enzymes in dystrophic mice at 7 weeks of age, especially in muscles and bones, suggesting that therapeutic research should focus not only on muscles but also on other tissues such as bone.

Studies on humans [6,10,23,24] and mice [12,25] have demonstrated that the deleterious effects of muscular dystrophy on bones occur after the onset of intense manifestation of disease symptoms. Under these conditions, bone tissue impairment is expected to occur as a consequence of muscle disuse in patients with muscular dystrophy. However, in view of the metabolic changes already demonstrated in *mdx* mice [22], the alterations observed in bone tissue may not exclusively be due to muscle impairment. Thus, bone abnormalities might exist in *mdx* mice even before clinical manifestation of the disease, i.e., before the onset of the intense cycles of muscle degeneration/

regeneration. These alterations can be attributed to the direct influence of the lack of dystrophin or to another abnormal biological mechanism inherent to the disease. In view of these considerations, the objective of the present study was to identify possible bone tissue abnormalities that occur in the femur of *mdx* mice at 21 days of age when the bone is still not influenced by hind limb muscles impairment.

Materials and methods

Animals

Male 21-day-old C57BL/10-Dmd^{mdx} ($n=38$; *mdx* group) and C57BL/210-ScCr ($n=38$; control group) mice obtained from the

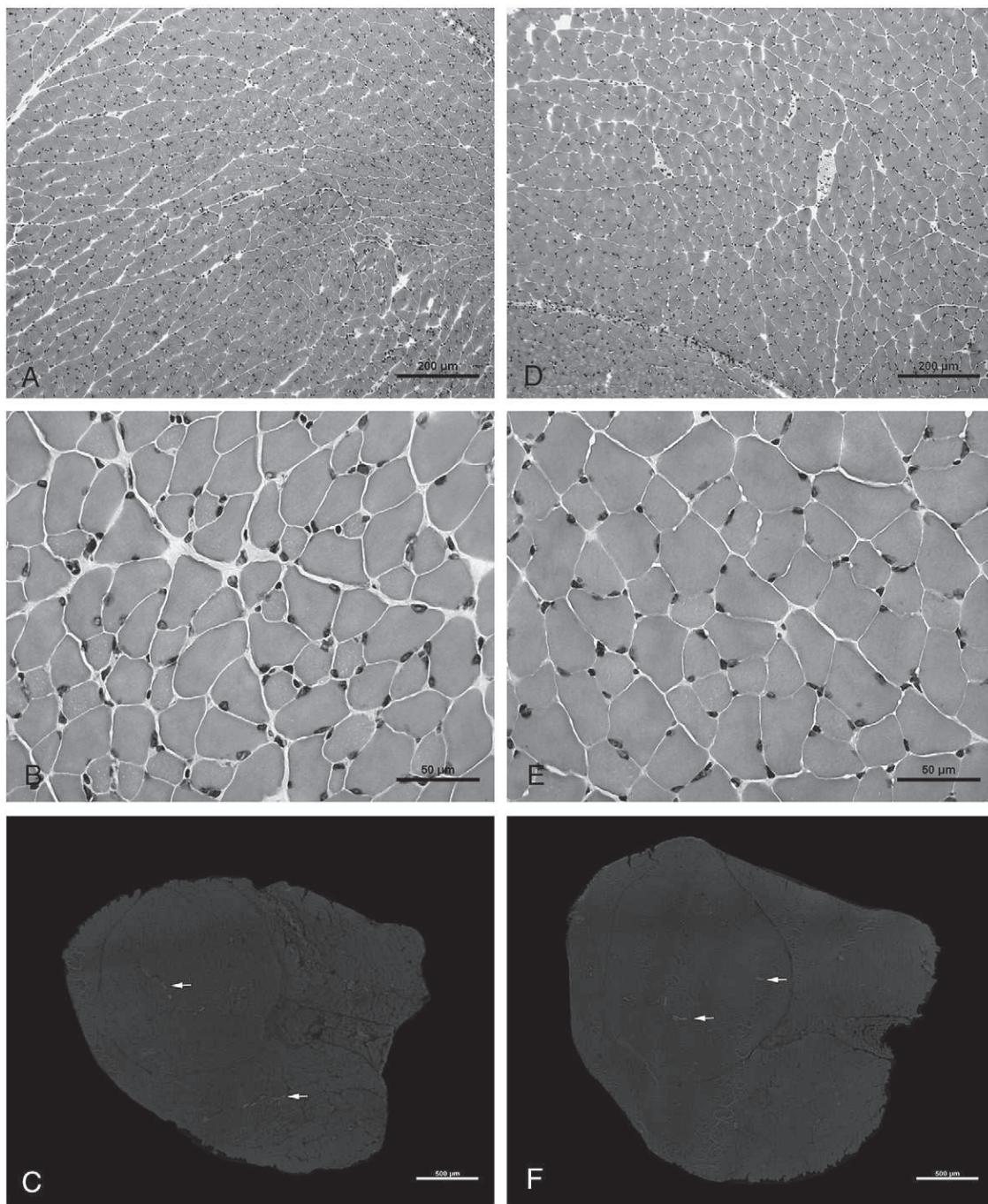


Fig. 1. Cross-sections of quadriceps muscles stained with hematoxylin–eosin: *mdx* (A and B) and control (D and E) groups showing intact muscle fibers with peripheral nuclei. Note in C (*mdx*) and F (control) the absence of EBD-positive myofibers. Arrows indicate muscle blood vessels.

Table 1

Structural and material properties of control and *mdx* femurs.

Mechanical properties	<i>mdx</i>	Control
<i>Structural properties</i>		
Maximum load (N)	2.25 ± 0.41	4.60 ± 1.05*
Yield load (N)	1.76 ± 0.37	2.98 ± 0.51*
Stiffness (N/mm)	5.82 ± 2.69	10.76 ± 1.62*
<i>Material properties</i>		
Maximum stress (MPa)	121.20 ± 13.33	209.14 ± 18.07*
Yield stress (MPa)	94.42 ± 9.52	136.97 ± 16.69*
Modulus of toughness (N/mm ²)	5.64 ± 1.08	11.72 ± 3.44*
Elastic modulus (MPa)	1891.92 ± 862.48	3114.22 ± 404.89*

The asterisk indicates a statistically significant difference between the two groups.

Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB) of the State University of Campinas (UNICAMP) were studied. The animals were weighed and sacrificed by an overdose (0.50 mL/100 g) of ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride (1:1) and the femurs and quadriceps muscles were removed. Animal experimentation was carried out according to the Ethical Guidelines on Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). The study was approved by the Institutional Ethics Committee of UNICAMP (protocol number 1359-1).

Muscle morphological analysis

For morphological visualization of muscle fiber leakiness/degeneration, mice ($n = 3$ per group) were injected with Evans blue dye (EBD), a marker of sarcolemmal damage that emits a bright red color when analyzed under a fluorescence microscope [26]. The animals received an intraperitoneal injection of 1% EBD in PBS (0.15 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) at a dose of 100 μ L per 10 g body weight. Twelve hours later, the mice were sacrificed and quadriceps muscle was dissected out, snap frozen in n-hexanes, cooled in liquid nitrogen and stored at -70°C . Cryostat cross-sections (7 μm) were mounted in DABCO (mounting media for fluorescence; Sigma) to detect the presence of myonecrosis. Others cryostat cross-sections were stained with hematoxylin-eosin to verify the presence of regenerated muscle fibers (indicated by the presence of central cell nuclei).

Mechanical test

For the mechanical test, femurs ($n = 15$ per group) were submitted to three-point bending testing until complete fracture at a velocity of

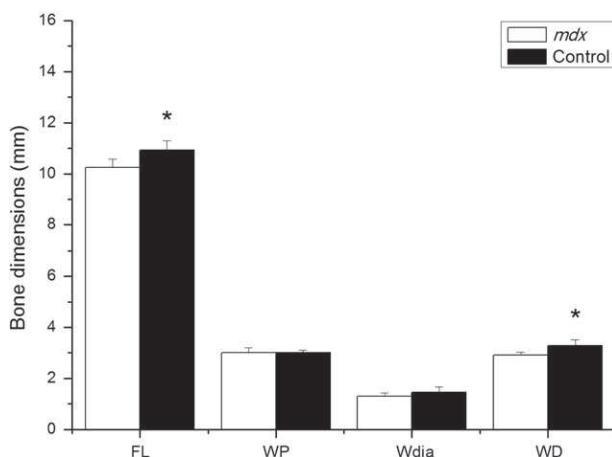


Fig. 2. Bone dimensions of control and *mdx* femurs determined with a digital caliper. The asterisk indicates a statistically significant difference. FL = femur length; WP = width of the proximal femur; Wdia = width of the femoral diaphysis; WD = width of the distal femur.

3 mm/min. An MTS TestStar II apparatus with a load cell of 100 kgf was used. The upper point and the two lower supports had a tip radius of 0.5 mm [27]. The distance between the two lower supports was 5 mm [24]. Each femur was tested in the anteroposterior plane (concave-up position), with the anterior surface of the bone facing upwards. The load and displacement data were obtained directly from the MTS system and recorded with a computer coupled to the testing machine. These data were used for the acquisition and calculation of the structural properties: maximum load, yield load, and extrinsic stiffness. The extrinsic stiffness was calculated as the slope of the most linear portion of the elastic region of the load-displacement curve [28,29]. After testing of the specimens in three-point bending, the failure sites of all bone specimens were photographed, together with a measurement standard, by a high-resolution digital camera at a standardized distance according to Huang et al. [29]. The parameters of cross-sectional cortical bone area of the diaphysis were measured on the images using the NIS-Elements 3.0 software (Advanced Research, USA). The cross-sectional moment of inertia (CSMI) at the point of failure was calculated by the method of Turner and Burr [30] for irregular cross-sections:

$$I = \sum_{i=1}^n \left(\frac{wh^3}{12} + whd_i^2 \right)$$

where I is the CSMI, n is the number of pixels, w and h are the height and width of each pixel, respectively, and d_i is the distance from the center of the element of the area to a given axis on the cross-section [30]. The material properties were obtained from the structural properties [28,30]. The following material properties were evaluated: maximum stress, yield stress, elastic modulus, and modulus of toughness. On the basis of the load-displacement data, a stress-strain curve was constructed using the following equations:

$$\sigma = \frac{\text{load} \cdot L \cdot c}{4I}$$

$$\varepsilon = \frac{12 \cdot c \cdot d}{L^2}$$

$$E = \frac{\text{stiffness} \cdot L^3}{48I}$$

where σ is the stress, L is the distance between the two lower supports, c is the maximum distance from pixels to the line that crosses the center of the mass, ε is the strain, d is the displacement, and E is the elastic modulus. Modulus of toughness corresponds to the area under the stress-strain curve and is the energy required to cause failure of the bone matrix itself, independent of the bone's size or geometry [31]. Yield load and yield stress were determined by the 0.2%-offset method [30]. A 0.002 strain offset line was constructed parallel to the linear portion of the stress-strain curve. The intersection point between this offset line and the stress-strain curve was called the yield stress. The

Table 2

Morphometric parameters of trabecular bone of the distal epiphysis of control and *mdx* femurs.

Morphometric parameter	<i>mdx</i>	Control
Trabecular bone area (mm^2)	0.025 ± 0.002	0.042 ± 0.007*
Trabecular bone area fraction (mm^2/mm^2)	0.132 ± 0.013	0.223 ± 0.038*
Mean trabecular bone thickness (mm)	0.018 ± 0.001	0.029 ± 0.001*
Number of osteoblasts/tissue area (#/ mm^2)	130.36 ± 63.23	218.17 ± 94.56*
Number of osteoclasts/tissue area (#/ mm^2)	19.23 ± 7.27	27.20 ± 11.33*
Number of osteoblasts/bone perimeter (#/mm)	1.08 ± 0.53	2.69 ± 1.08*
Number of osteoclasts/bone perimeter (#/mm)	0.15 ± 0.05	0.33 ± 0.13*

Results are reported as the mean ± standard deviation.

The asterisk indicates a statistically significant difference between the two groups.

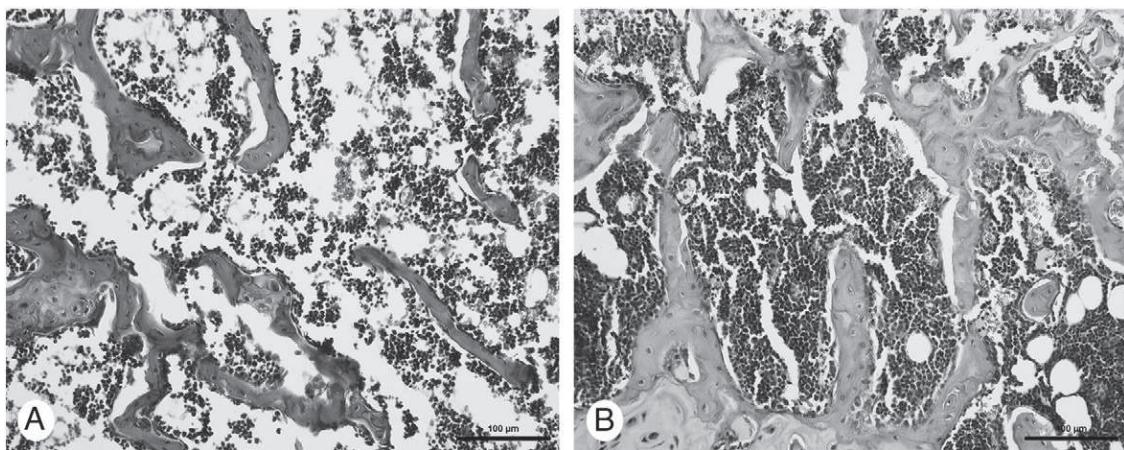


Fig. 3. Light microscopy of spongy bone of the distal epiphysis of *mdx* (A) and control (B) femurs (hematoxylin–eosin staining). The smaller thickness of trabecular bone in *mdx* femur is clearly visible.

original loading value of this point was called yield load. The yield point (yield load and yield stress) is an imaginary point that separates the elastic region from the plastic region and is defined as the highest load that the material can withstand without leaving any permanent deformation when unloaded. The tests were carried out at the Laboratory of Mechanical Properties, Faculty of Mechanical Engineering, UNICAMP.

Femur morphometry

Anatomical dimensions of the femur

After removal of all soft tissue from the femurs, the following four measurements were obtained with a digital caliper and magnifying glass according to Lammers et al. [32]: 1) femur length (measured from the most proximal point of the femoral head to the most distant end of the femur); 2) width of the femoral diaphysis (measured at the narrowest point of the mid-femur); 3) width of the proximal femur (measured from the anterior point of the femoral head to the tip of the greater trochanter); 4) width of the distal femur (corresponding to the width of the condyle in the anteroposterior direction perpendicular to the length of the femur).

Epiphyseal trabecular bone

The distal epiphysis of the femur ($n=6$ per group) was used for this analysis. Six histological sections were prepared for each femur and two fields of each section were captured. The specimens were fixed in 10% buffered formalin for 72 h and decalcified in a solution of formic acid, formalin and sodium citrate for 35 days. Next, the specimens were submitted to routine histological processing and embedded in paraffin. Longitudinal sections (5 μm) were obtained and stained with hematoxylin–eosin. The histological sections were examined under a Nikon 80i photomicroscope using a 20 \times objective. The images were captured with a Nikon DS-Ri1 camera for the analysis of trabecular bone area, area fraction and mean thickness using the NIS-Elements 3.0 Advanced Research software. However, to quantify the number of osteoblasts and

osteoclasts per tissue area (#/ mm^2) and per bone perimeter (#/ mm) were captured four fields of each histological section using a 40 \times objective. The counted cells considered as osteoclasts were large multinucleated cells found next to excavated surfaces of trabecular bone, and the counted cells considered as osteoblasts, were typically secretory osteoblasts that were cuboidal cells, smaller than osteoclast cells, with a round nucleus and found in a single layer adherent to bone surfaces.

Diaphyseal cortical bone

The middle third of the femoral diaphysis ($n=6$ per group) was used for this analysis. Cross-sections (5 μm) were obtained and stained with hematoxylin–eosin. Twelve histological sections (1 section = 1 field) were prepared for each bone. The images were captured using a 4 \times objective and the cortical bone area (cross-section area – medullary area) and mean cortical thickness were calculated.

Quantification of hydroxyproline

The middle third of the femoral diaphysis ($n=6$ per group) was used for the determination of hydroxyproline content, which is an estimate of collagen concentration, as described by Stegemann and Stalder [33]. The specimens were dehydrated in acetone PA and chloroform/ethanol (1:1), dried, and hydrolyzed in 6 N HCl (1 mL/10 mg tissue) for 16 h at 107 °C. An aliquot (15 μL) of the hydrolyzed material was used for analysis after the addition of 1 mL chloramine-T solution. After 20 min, 1 mL of a perchloric acid/aldehyde solution was added and the samples were incubated for 15 min at 60 °C, cooled to 20 °C and read in a spectrophotometer ($\lambda=550$ nm).

Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP/OES)

The middle third of the femoral diaphysis ($n=6$ per group) was macerated under running water for 1 week for the removal of soft tissues. Next, the samples were dried at room temperature, triturated and dissolved in HNO_3 until complete dissolution, followed by the addition of water. This solution was used to determine the Ca/P ratio by ICP/OES. Calibration curves were constructed using solutions of known concentrations of Ca^{2+} and PO_4^{3-} .

Thermogravimetry

The middle third of the femoral diaphysis ($n=24$ per group) was macerated, dried at room temperature and ground to a powder. Samples of 5 to 10 mg were used for analysis. Thermogravimetry was performed using a Universal V2.3C Thermogravimetric Analyzer (TA

Table 3

Morphometric parameters of cortical bone of the diaphysis of control and *mdx* femurs.

Morphometric parameter	<i>mdx</i>	Control
Cross-sectional area (mm^2)	0.615 ± 0.09	$0.812 \pm 0.11^*$
Medullary area (mm^2)	0.501 ± 0.08	0.608 ± 0.09
Cortical bone area (mm^2)	0.114 ± 0.01	$0.204 \pm 0.02^*$
Mean cortical bone thickness (mm)	0.037 ± 0.005	$0.065 \pm 0.004^*$

Results are reported as the mean \pm standard deviation.

The asterisk indicates a statistically significant difference between the two groups.

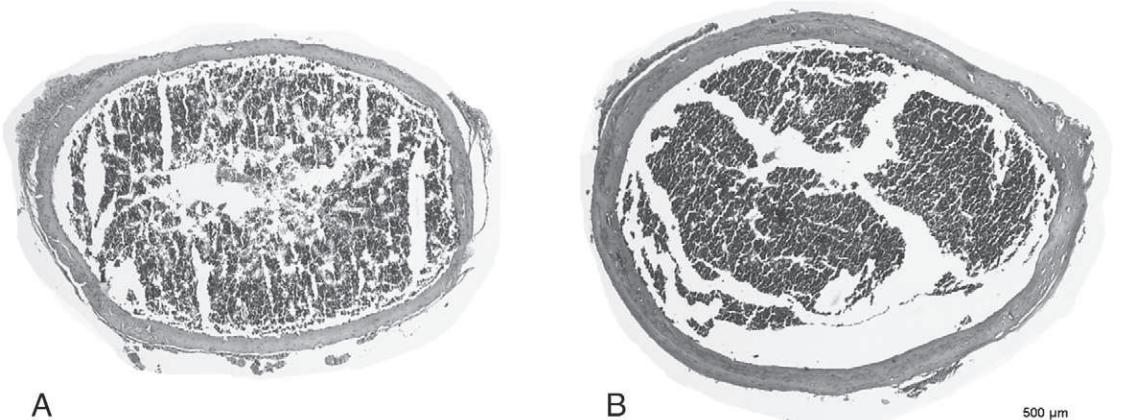


Fig. 4. Light microscopy of diaphyseal cortical bone of *mdx* (A) and control (B) femurs (hematoxylin–eosin staining). Note the greater thickness of control femur.

Instruments) within a temperature range of 25° to 1000 °C at a heating rate of 10 °C/min in an oxidant atmosphere (synthetic air).

Statistical analysis

The results are reported as the mean \pm standard deviation. The data were analyzed statistically using the Student *t*-test, with the level of significance set at 5% for all tests ($P < 0.05$).

Results

No significant difference in body weight was observed between the control (10.65 ± 0.53 g) and *mdx* (9.45 ± 1.02 g) groups. Histological analysis of quadriceps muscle is shown in Fig. 1. Almost all muscle fibers had peripheral nuclei, an indicator of non regenerated fibers in control and *mdx* mice (Figs. 1A, B, D and E). Additionally, EBD-positive fibers were not seen in both groups (Figs. 1C and F), indicating the absence of muscle fiber damage (sarcolemmal leakiness). Overall these results demonstrated no muscle fiber degeneration and regeneration at 21 days of age in *mdx* mice.

Mechanical testing showed significant differences in all structural and material properties analyzed, with the observation of higher values in the control group (Table 1).

Analysis of femur dimensions revealed a greater length and distal width in the control group (Fig. 2). Significant differences were observed in all morphometric parameters of trabecular bone of the distal femoral epiphysis, with higher values in the control group (Table 2). Light microscopy showed a smaller trabecular bone area and thickness in the distal epiphysis of *mdx* femurs (Fig. 3). Morphometric analysis of the

cortical layer of the diaphysis revealed a significantly greater cross-sectional area, diaphyseal cortical area and cortical bone thickness in the control group (Table 3). Light microscopy demonstrated a smaller diaphyseal cortical area and thickness in *mdx* femurs (Fig. 4).

No significant differences in the hydroxyproline content of diaphyseal cortical bone were observed between the two groups studied (Fig. 5). There was a difference in the Ca/P ratio of diaphyseal cortical bone between the two groups (Fig. 6).

Thermogravimetry revealed the loss of water up to 100 °C and loss of organic matrix up to 500 °C (peaks between 300 and 400 °C) in all specimens. In addition, control diaphyseal cortical bone contained more inorganic matrix than *mdx* bone as demonstrated by statistical comparison of masses, in percentage, of each group at 600, 650, 700 and 900 °C (Fig. 7 and Table 4).

Discussion

According to some studies, muscle weakness and reduced mechanical loading are responsible for the occurrence of osteoporosis in patients with DMD since the bones of these patients receive fewer mechanical stimuli due to deficient muscle contraction and the inability to sustain weight [6,9–11,34]. Particularly during the growth and development of an individual, these stimuli are responsible for important structural changes in the diaphysis of long bones and in the trabecular structure of short bones [35,36]. This demonstrates that, if the intensity of the muscle stimulus is reduced during childhood, the skeleton will be deprived of major factors involved in the increase of bone mass [37]. However, this does not imply that the reduction of bone quality in patients with DMD exclusively results from muscle damage

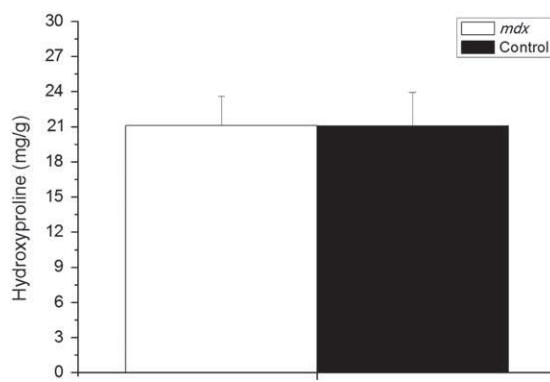


Fig. 5. Quantification of hydroxyproline in diaphyseal cortical bone of control and *mdx* femurs. No significant differences were observed between groups.

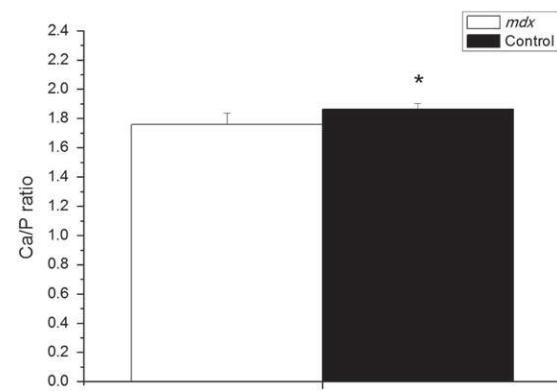


Fig. 6. Determination of the Ca/P ratio in diaphyseal cortical bone of control and *mdx* femurs. The asterisk indicates a statistically significant difference between groups.

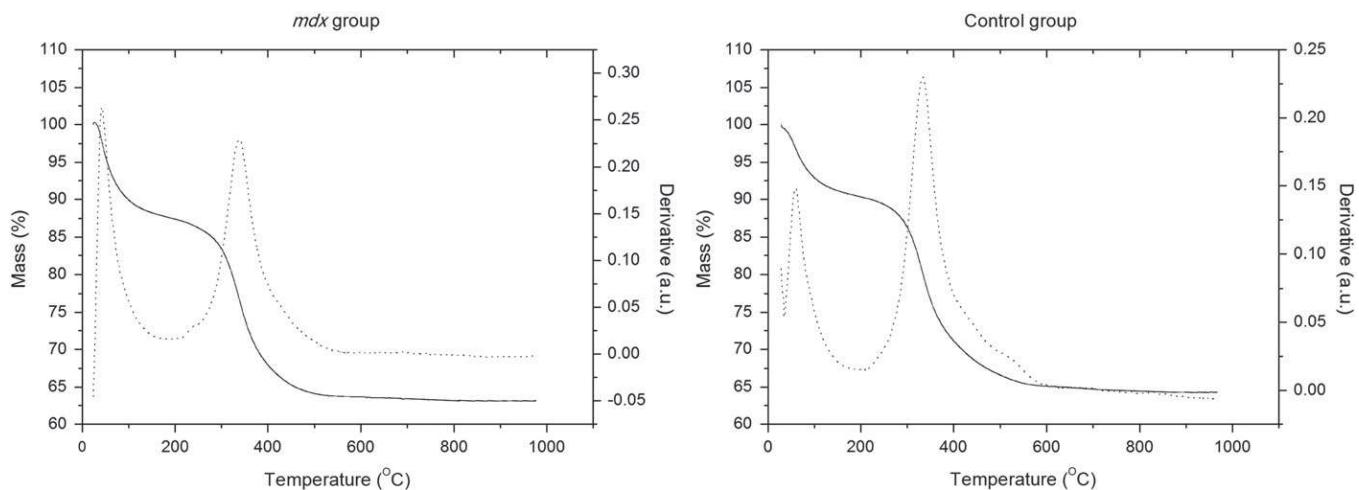


Fig. 7. Thermograms of diaphyseal cortical bone obtained for control and *mdx* femurs showing a lower percentage of inorganic mass in the *mdx* diaphysis compared to the control group (see Table 4).

since other factors inherent to the genetic mutation that causes the disease may also play a role. Since *mdx* mice show a more intense impairment of muscle fibers after the third week of life [16–21], we compared the biomechanical, biochemical and morphometric properties of the femur between 21-day-old *mdx* mice and a control group.

The Ca/P ratio is a good indicator of bone quality and a reduction in this ratio is intimately related to bone loss [38]. In the present study, the Ca/P ratio and thermogravimetry and morphometry values were lower in the *mdx* group. These findings demonstrate a lower bone mass, bone mineral content and bone mineral density in *mdx* femurs. Thus, compared to the control group the dystrophic femur showed the characteristic presentation of osteopenia at a time when muscle fiber degeneration was still not significant.

Considering the age of the animals and the similar body weight, no difference in muscle mass was observed between the control and *mdx* groups, suggesting that dystrophic mice presented osteopenia that was not influenced by muscle impairment or reduced mobility and locomotion. On the basis of the present results, we suggest the existence of intrinsic factors (growth factors, interleukins, etc.) that trigger mechanisms related directly or indirectly to the lack of dystrophin, which promote a reduction in bone quality. Thus, the reduced mechanical loading and motor activity in children with DMD may interact with these unknown intrinsic factors and compromise the quality and development of bone tissue.

Results similar to those observed in the present study have been reported by Anderson et al. [25]. These authors found a lower tibial cortical thickness and area, increased porosity and lower mechanical strength in dystrophic mice at 4 weeks of age. It should be noted that, since the cycles of degeneration/regeneration are effectively installed in the hind limb muscles after the third week of life [16–21], the animals used by Anderson et al. [25] already presented more intense muscle fiber degeneration.

Biomechanical analysis revealed higher values for structural (load and structural stiffness) and material properties (stress, elastic modulus and modulus of toughness) in control femurs, demonstrating that these

bones are stronger and more resistant and therefore less susceptible to fractures. In this respect, it is interesting to mention that the mechanical properties of bones are determined at two different levels of biological complexity, i.e., at the tissue and at the organ level. According to Ferretti et al. [39], material properties refer to the composition of bone tissue and are directly related to bone cells (types and functions) and organic and inorganic matrix components. Structural properties refer to the organ as a whole and are determined by a combination of bone architecture, mass, size, and spatial distribution. Thus, not only bone mass and bone mineral density but also the cellular, molecular and mineral composition of the femur might be compromised in *mdx* mice. This may be true due to a higher number of osteoblasts and osteoclasts per bone tissue area and bone perimeter in the control group. As there is higher bone mass quantity in the epiphysis of this group, we suggest that the *mdx* group may have delayed modeling/remodeling mechanism due to decreased stimulation of proliferation and to abnormal process of the differentiation of mesenchymal osteoprogenitor cells.

Ruppel et al. [40] suggested that a reduction in the mineral matrix of bone may increase the fragility of sick bones, affecting mainly the mechanical properties of the tissue. Hernandez et al. [41] observed that a low mineralization rate is associated with low bone stiffness and strength. In addition, Burstein et al. [42] demonstrated that yield stress and elastic modulus decreased significantly with increasing decalcification of bovine bone. Thus, the present results of the mechanical test, together with the thermogravimetry results and Ca/P ratio, demonstrate a lower degree of mineralization in the femur of *mdx* mice. In addition, our data suggest that the reduced mineralization observed in *mdx* femur resulted in a reduction of bone intrinsic stiffness (elastic modulus) and bone strength (stress).

According to Ruppel et al. [40], changes in bone mineral crystals may contribute to increased bone fragility at the microscopic level. Ionic substitutions that occur in bone mineral crystals may drastically alter the physical properties of bone, such as solubility, hardness, brittleness and thermal stability [43]. One of the most frequent anionic substitutions that occur in bone matrix is the replacement of carbonate with phosphate [43,44]. Similar changes may have occurred in the femur of *mdx* mice since the Ca/P ratio was lower in these animals compared to the control group, indicating alterations in the concentrations of calcium and phosphate and consequently greater bone fragility in *mdx* mice.

Collagen is the most abundant protein of the bone matrix, which exerts an influence on bone fragility [40] and is associated with bone toughness [31,40]. Toughness is related to impact strength, i.e., the capacity of bone to absorb energy before fracture [31]. The organization and content of collagen in the bone matrix are the main factors that contribute to the toughness of bone [45,46]. Currey et al. [47] observed

Table 4

Inorganic masses (in percentage) of diaphyseal cortical bone at different temperatures.

Temperature (°C)	<i>mdx</i>	Control
600	63.76 ± 0.69	64.97 ± 0.56*
650	63.68 ± 0.70	64.91 ± 0.55*
700	63.60 ± 0.70	64.87 ± 0.54*
900	63.38 ± 0.90	64.31 ± 0.47*

Results are reported as the mean ± standard deviation.

The asterisk indicates a statistically significant difference between the two groups.

that bone toughness decreases when the bone is exposed to ionizing radiation which damages collagen. Since in the present study the amount of collagen was the same in the two groups but toughness was lower in the *mdx* group, we suggest that control femurs presented a better organization of collagen molecules.

The degree of mineralization and enzymatic cross-links between collagen molecules are important factors for bone quality [48] and a reduction in the number of cross-links coincides with reduced bone strength [49,50]. Studying osteoporosis in humans, Oxlund et al. [50] observed a reduction in the number of reducible cross-links in the absence of alterations in the concentration of collagen. In osteoporosis, other studies demonstrated disorganized and altered collagen in bone tissue [51–53]. These data support our suggestion that femurs of *mdx* mice might present a lower degree of collagen organization. In addition, the number of collagen cross-links might be reduced in the cortical diaphysis of *mdx* mice.

Collagen regulates the spatial aspect of mineralization by defining the site for mineral deposition and growth [54], whereas the temporal aspect of this process is usually regulated by macromolecules (non-collagen proteins) of the bone matrix, such as proteoglycans [55]. These macromolecules facilitate nucleation of the hydroxyapatite crystal, sequester mineral ions to increase the local concentration of calcium and/or phosphorus, or facilitate heterogenous nucleation [56]. The bone matrix contains various macromolecules, with proteoglycans such as aggrecan, biglycan and decorin exerting important functions. Aggrecan participates in matrix organization and in the retention of calcium/phosphorus, whereas biglycan binds to collagen fibrils and is a genetic determinant of peak bone mass [56]. A lack of biglycan is associated with the inhibition of mineralization. Male mutant mice that do not express biglycan were found to present decreased bone mass, shorter femurs and fewer trabeculae than normal mice [57]. No alterations in bone mass but a reduction in collagen fibril diameter was demonstrated in decorin knockout mice [58]. Thus, both decorin and biglycan participate in collagen fibrillogenesis. In this respect, *mdx* femurs may show a lower degree of mineralization and decreased bone mass due to a reduction in the content of these proteoglycans or to inhibition in their activity. In addition, the assumption that *mdx* femurs contain less organized collagen or collagen with a smaller number of cross-links suggests a higher content or activity of these proteoglycans in the femur of control mice.

In conclusion, the reduced mechanical resistance and increased fragility of *mdx* femurs are the result of impaired mineralization and probably of altered organization of extracellular matrix molecules, especially collagen. These abnormalities may also manifest in humans. This is supported by the recent study of Rufo et al. [59] who observed that osteoblasts from healthy humans did not mineralize bone matrix when exposed to sera from patients with DMD. Finally, the femurs of 21-day-old *mdx* mice, which still present no significant impairment of muscle activity, may show abnormalities associated with some genetic factor that is directly or indirectly related to the lack of dystrophin.

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgments

Wilson Romero Nakagaki and Cintia Yuri Matsumura were the recipients of fellowships from FAPESP (2007/07638-0 and 2008/54775-5 respectively) and CAPES/PROEX, Brazil. This study was supported by a grant from FAPESP (2008/57041-2).

References

- [1] Sommerfeld DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001;10:586–95.
- [2] Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 2006;86:77–91.
- [3] Warner SE, Shea JE, Miller SC, Shaw JM. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif Tissue Int* 2006;79:395–403.
- [4] Gross TS, Srinivasan S, Liu CC, Clemens TL, Bain SD. Noninvasive loading of the murine tibia: an in vivo model for the study of mechanotransduction. *J Bone Miner Res* 2002;17:493–501.
- [5] Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, Gross TS. Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* 2006;38:257–64.
- [6] Bianchi ML, Mazzanti A, Galbiati E, Sarafoglu S, Dubini A, Cornelio F, et al. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int* 2003;14:761–7.
- [7] Cohn RDE, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000;23:1456–71.
- [8] Lovering RM, Porter NC, Bloch RJ. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Phys Ther* 2005;85:1372–88.
- [9] Palmieri G, Bertorini T, Griffin J, Igarashi M, Karas J. Assessment of whole body composition with dual energy X-ray absorptiometry in Duchenne muscular dystrophy: correlation of lean body mass with muscle function. *Muscle Nerve* 1996;19:777–9.
- [10] Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop* 2000;20:71–4.
- [11] Söderpalm AC, Magnusson P, Ahlander AC, Karlsson J, Kroksmark AK, Tulinius M, et al. Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2007;17:919–28.
- [12] Montgomery E, Pennington C, Isales CM, Hamrick MW. Muscle–bone interactions in dystrophin-deficient and myostatin-deficient mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005;286:814–22.
- [13] Muller J, Vayssiére N, Royuela M, Leger ME, Muller A, Bacou F, et al. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male *mdx* mice. *J Muscle Res Cell Motil* 2001;22:133–9.
- [14] Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PCG, Martins PCM, Lopes VF, Zilberstajn D, et al. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. *J Mol Neurosci* 2008;34:241–8.
- [15] Biggar WD, Klamut HJ, Demacio PC, Stevens DJ, Ray PN. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. *Clin Orthop Relat Res* 2002;401:88–106.
- [16] McGaughie JK, Grounds MD, Partridge TA, Morgan JE. Age-related changes in replication of myogenic cells in *mdx* mice: quantitative autoradiographic studies. *J Neurol Sci* 1993;119:169–79.
- [17] Pastoret C, Sebille A. *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 1995;129:97–105.
- [18] Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Khanna S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (*mdx*) mice. *Hum Mol Genet* 2003;12:1813–21.
- [19] Bruguet A, Courdier-Fruh I, Foster M, Meier T, Magyar JP. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. *Neuromuscul Disord* 2004;14:675–82.
- [20] Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNF α (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J* 2004;18:676–82.
- [21] Reed P, Bloch RJ. Postnatal changes in sarcolemmal organization in the *mdx* mouse. *Neuromuscul Disord* 2005;15:552–61.
- [22] Aoyagi T, Wada T, Kojima F, Nagai M, Umezawa H. Various enzyme activities in muscle and other organs of dystrophic mice. *J Clin Invest* 1981;67:51–9.
- [23] McDonald DG, Kinlally M, Gallagher AC, Mercuri E, Muntoni F, Roper H, et al. Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 2002;44:695–8.
- [24] Douvillez B, Braillon P, Hodgkinson I, Berard C. Pain, osteopenia and body composition of 22 patients with Duchenne muscular dystrophy: a descriptive study. *Ann Readapt Med Phys* 2005;48:616–22.
- [25] Anderson J, Lentz D, Johnson R. Recovery from disuse osteopenia coincident to restoration of muscle strength in *mdx* mice. *Bone* 1993;14:625–34.
- [26] Matsuda R, Nishikawa A, Tanaka H. Visualization of dystrophic muscle fibers in *mdx* mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 1995;118:959–64.
- [27] Robertson G, Xie C, Chen D, Awad H, Schwarz EM, O'Keefe RJ, et al. Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2 $−/−$ mice. *Bone* 2006;39:767–72.
- [28] Akhter MP, Cullen DM, Gong G, Recker RR. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP₁ and EP₂ knockout mice. *Bone* 2001;29:121–5.
- [29] Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol* 2003;95:300–7.
- [30] Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14:595–608.
- [31] Burr DB. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone* 2002;31:8–11.
- [32] Lammers AR, German RZ, Lightfoot PS. The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat* 1998;162:199–208.
- [33] Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1967;18:267–73.
- [34] Biggar WD, Bachrach LK, Henderson RC, Kalkwarf H, Plotkin H, Wong BL. Bone health in Duchenne muscular dystrophy: a workshop report from the meeting in Cincinnati, Ohio, July 8, 2004. *Neuromuscul Disord* 2005;15:80–5.

- [35] Whalen RT, Carter DR, Steele CR. Influence of physical activity on regulation of bone density. *J Biomech* 1988;21:825–37.
- [36] Slemenda WC, Miller JZ, Hui SL, Reister TK, Jonston Jr CC. Role of physical activity in the development of skeletal mass in children. *J Bone Miner Res* 1991;6:1227–33.
- [37] Bailey DA. Physical activity and bone mineral acquisition during adolescence. *Osteoporos Int* 2000;11:S2–3.
- [38] Tzaphlidou M. Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps. *J Biol Phys* 2008;34:39–49.
- [39] Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Capiglioni R, Chiappe MA. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle–bone interactions in small animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1:263–74.
- [40] Ruppel ME, Miller LM, Burr DB. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos Int* 2008;19:1251–65.
- [41] Hernandez CJ, Beaupré GS, Keller TS, Carter DR. The influence of bone volume fraction and ash fraction on bone strength and modulus. *Bone* 2001;29:74–8.
- [42] Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L. Contribution of collagen and mineral to the elastic–plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:956–61.
- [43] Elliott JC. Calcium phosphate biominerals. Phosphates: geochemical, geobiological, and materials importance. *Rev Mineral Geochem* 2002;48:427–53.
- [44] LeGeros RZ. Calcium phosphates in demineralization/remineralization processes. *J Clin Dent* 1999;10:65–73.
- [45] Boskey AL, Wright TM, Blank RD. Collagen and bone strength. *J Bone Miner Res* 1999;14:330–5.
- [46] Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 2001;19:1021–6.
- [47] Currey JD, Foreman J, Laketic I, Mitchel J, Pegg DE, Reilly GC. Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 1997;15:111–7.
- [48] Saito M, Fujii K, Soshi S, Tanaka T. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int* 2006;17:986–95.
- [49] Oxlund H, Barkman M, Ortoft G, Andreassen TT. Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone* 1995;17:365S–71S.
- [50] Oxlund H, Mosekilde L, Ortoft G. Reduced concentration of collagen reducible cross-links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone* 1996;19:479–84.
- [51] Fountos G, Kounadi E, Tzaphlidou M, Yasumura S, Glaros D. The effects of inflammation-mediated osteoporosis (IMO) on the skeletal Ca/P ratio and on the structure of rabbit bone and skin collagen. *Appl Radiat Isot* 1998;49:657–9.
- [52] Kafantari H, Kounadi E, Fatouros M, Milonakis M, Tzaphlidou M. Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone* 2000;26:349–53.
- [53] Tzaphlidou M, Kafantari H. Influence of nutritional factors on bone collagen fibrils in ovariectomized rats. *Bone* 2000;27:635–8.
- [54] Siperko LM, Landis WJ. Aspects of mineral structure in normally calcifying avian tendon. *J Struct Biol* 2001;135:313–20.
- [55] Young MF. Bone matrix proteins: Their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 2003;14:S35–42.
- [56] Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3: S131–9.
- [57] Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, et al. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 1998;20:78–82.
- [58] Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers–Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res* 2002;17:1180–9.
- [59] Rufo A, Del Fattore A, Bianchi ML, Morandi L, Bertini E, Musarò A, et al. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne Muscular Dystrophy. *Bone* 2009;44:S237–8.

Análise da capacidade osteogênica durante cicatrização espontânea de defeito ósseo da calvária de camundongos *mdx* em diferentes tempos de cicatrização

Wilson Romero Nakagaki ^a, José Angelo Camilli ^{a,*}

^a Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

* Autor para correspondência

Telefone: +55 19 3521-6104; fax: +55 19 3521-6185.

E-mail: jcamilli@unicamp.br (J.A. Camilli).

Resumo

O camundongo *mdx* é um modelo experimental largamente utilizado para estudo da distrofia muscular de Duchenne (DMD). Ele apresenta ausência de distrofina e ciclos de degeneração/regeneração muscular. Além disso, estudos demonstraram níveis elevados de fatores de crescimento em seu metabolismo, como o fator de crescimento de fibroblasto e proteína quimiotática de monócito 1. Também foi observado aceleração do reparo de lesões na sua pele. Com base nessas evidências, elaboramos a hipótese de que o processo de reparo ósseo também possa estar alterado. O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo espontâneo de defeitos produzidos na calvária de camundongos *mdx* através de estudo histomorfométrico. Trinta animais com 45 dias de idade foram divididos em 2 grupos: *mdx* e controle. Cirurgicamente foi produzido defeito ósseo de 2 mm de diâmetro no parietal direito de cada animal. Após 15, 30 e 60 dias pós-cirúrgicos, os animais foram sacrificados e os crânios processados histologicamente. A análise dos dados demonstrou que não há diferença estatisticamente significante entre camundongos dos grupos controle e *mdx* nos 3 tempos pós-operatório quanto ao volume de osso formado no interior do defeito. Também não foi verificada diferença entre os tempos ao analisar cada grupo separadamente. No entanto, as médias das taxas de osso formado do grupo *mdx* foram maiores numericamente quando comparados ao grupo controle. O osso neoformado foi encontrado somente nas margens do defeito e a dura-máter estava intacta em todos os grupos. Considerando a menor qualidade óssea do fêmur do camundongo *mdx* observada em estudo prévio e a similaridade estatística encontrada na taxa de regeneração óssea entre os grupos controle e *mdx*, entendemos que a capacidade osteogênica da calvária dos camundongos *mdx* foi mais expressiva do que a dos camundongos controle. A elevação da quantidade de fatores osteogênicos liberados das miofibras injuriadas e fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (essenciais na modulação da regeneração e diferenciação da célula muscular) poderiam ter favorecido a osteogênese no reparo do defeito ósseo no camundongo *mdx*.

INTRODUÇÃO

A distrofina muscular de Duchenne (DMD) é a mais freqüente das distrofias que ocorrem na infância e é transmitida como uma desordem recessiva ligado ao cromossomo X. O curso da doença é relativamente rápido e progressivo, degenerando os músculos e, consequentemente, levando a uma intensa e profunda fraqueza muscular (Aparicio et al., 2002). A fraqueza muscular torna os ossos mais finos e desmineralizados, retardando o surgimento dos centros de ossificação (Hsu, 1982). Deste modo, a diminuição da densidade mineral ocorre paralelamente com o avanço da doença (Larson & Henderson, 2000; McDonald et al., 2002; Bianchi et al., 2003), demonstrando osteoporose e tornando os ossos mais suscetíveis às fraturas (Bianchi et al., 2003; Söderpalm et al., 2007). Além disto, a utilização de glicocorticoides para evitar a fraqueza e inflamação muscular também exerce efeito colateral em longo prazo sobre o metabolismo ósseo, aumentando a apoptose osteoblástica e a osteoclastogênese (Canalis et al., 2004).

Esta associação entre a distrofia muscular e o metabolismo do tecido ósseo tem sido observada em humanos (Larson and Anderson, 2000; Vestergaard et al., 2001; Aparicio et al., 2002; McDonald et al., 2002; Bianchi et al., 2003; Biggar et al., 2005; Söderpalm et al., 2007) e em camundongos *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) (Anderson et al., 1993; Montgomery et al., 2005; Nakagaki et al., 2011). Tal como no humano com DMD, o camundongo *mdx* apresenta mutação genética resultando na ausência da proteína distrofina, processo inflamatório intenso nos músculos e presença de ciclos de degeneração/regeneração que se iniciam de forma intensa, marcante e significativa após o vigésimo primeiro dia de vida (Pastoret & Sebille, 1995; Porter et al., 2003; Briguet et al., 2004; Grounds and Torrisi, 2004; Reed and Bloch; 2005). No entanto, ao contrário do que

acontece nos humanos com DMD, a regeneração das fibras musculares no camundongo *mdx* parece compensar o processo degenerativo com menor fibrose e, consequentemente, mantendo a função muscular (Yablonka-Reuveni and Anderson, 2006).

Anderson e colaboradores (1993) verificaram que a tíbia de camundongos *mdx* com 28 dias de vida tinha menor espessura e área cortical, aumento da porosidade e menor resistência mecânica e atribuíram estas deficiências da tíbia à fraqueza muscular decorrentes da intensa degeneração das fibras musculares. No entanto, na ausência de sinais de degeneração do quadríceps, Nakagaki e colaboradores (2011) observaram osteopenia, menor quantidade de osteoblastos, menor conteúdo mineral e menor resistência mecânica do fêmur de camundongos *mdx* aos 21 dias de vida em relação ao grupo controle. Isto demonstra que a perda da qualidade óssea em camundongos *mdx* não ocorre somente em função do enfraquecimento muscular.

Montgomery e colaboradores (2005) verificaram que o fêmur do camundongo *mdx* (4 meses de idade) apresentava maior densidade mineral e maior resistência mecânica em relação ao grupo controle, bem como maior massa muscular nos membros posteriores, mesmo apresentando fraqueza muscular sistêmica causada por episódios de degeneração muscular. Observaram também que o terço proximal do fêmur era maior e mais expandido lateralmente, demonstrando que em períodos de regeneração muscular há estímulos localizados de formação óssea nas junções osteotendíneas. Segundo os autores, o aumento de tecido ósseo nestes locais é uma adaptação para acomodar os aumentos do tamanho e da massa do músculo, mesmo sem um aumento da força contrátil. Além disto, o metabolismo do tecido ósseo do camundongo *mdx* também sofre interferência da ação de fatores

osteogênicos que são liberados das miofibras injuriadas, que estão elevados em pacientes com DMD (D'Amore et al., 1994).

Os fatores de crescimento, as citocinas e as quimiocinas representam elementos essenciais na modulação da regeneração e diferenciação da célula muscular (Straino et al., 2004). Estudos têm demonstrado que há níveis elevados de fatores de crescimento e de quimiocinas no metabolismo de camundongos *mdx*, tais como o fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) (D'Amore et al., 1994), a proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) (Porter et al., 2003) e o fator de crescimento neural (Toti et al., 2003). Neste sentido, Straino e colaboradores (2004) observaram um aumento do número de arteríolas durante a isquemia dos membros posteriores e rápida cicatrização da pele em camundongos *mdx* quando comparados aos camundongos normais. Estes pesquisadores identificaram uma ligação entre a ausência da distrofina e a neovascularização, sugerindo que o aumento da vasculogênese poderia representar uma resposta adaptativa do organismo aos níveis patológicos da degeneração muscular.

A existência de evidências demonstrando maior conteúdo de fatores osteogênicos em pacientes com DMD (D'Amore et al., 1994), níveis elevados de fatores de crescimento e aceleração do processo de reparo de lesões na pele do animal (Straino et al., 2004) fornece elementos importantes para acreditar que a osteogênese e, consequentemente, os processos de modelagem e reparo ósseo também possam estar alterados. Deste modo, o objetivo deste estudo foi analisar o reparo espontâneo de defeitos (falhas) ósseos produzidos cirurgicamente no crânio de camundongos *mdx* para analisar a capacidade osteogênica durante o processo de reparo ósseo em tempos diferentes de pós-operatório.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Camundongos machos C57BL/10-ScCr ($n = 15$; grupo controle) e C57BL/10-Dmd^{mdx} ($n = 15$; grupo *mdx*) foram operados aos 45 dias de vida. Após 15, 30 e 60 dias pós-operatório os animais (5 por grupo) foram sacrificados com dose excessiva de anestésico e seus crânios foram retirados e preparados para análise. O experimento com animais foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP), certificado com protocolo número 1359-1.

2. Procedimento cirúrgico no crânio

Os animais foram anestesiados com uma solução de 1:1 de Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Cetamina, administrada por via intramuscular com dose de 5mg/Kg e 100mg/Kg, respectivamente. Após a anestesia, foram feitas a tricotomia na região fronto-parietal da cabeça do animal e a assepsia da região com iodofor alcoólico. Após o isolamento da área cirúrgica, uma incisão longitudinal de aproximadamente 6 centímetros foi feita na pele com auxílio de um bisturi. Em seguida o periosteio foi afastado para expor a superfície do osso parietal direito. Com auxilio de um *punch* foi produzido um defeito ósseo, com 2 mm de diâmetro, que atravessou por completo a espessura da parede do osso. O defeito permaneceu vazio. O periosteio foi reposicionado e a pele suturada. Todos os animais foram tratados com analgésico (dipirona sódica 500 mg/mL) adicionado à água (*ad*

libitum) na dose de 875 mg/kg durante os 5 primeiros dias do pós-operatório. Este procedimento foi baseado no estudo de Silva e Camilli (2006).

3. Estudo histológico

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas e descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 35 dias. Em seguida, as amostras foram processadas através de técnicas histológicas de rotina. Para cada calota foram obtidos 5 cortes histológicos. Cortes transversais com 5 μm de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina. As secções histológicas foram examinadas com auxílio de um fotomicroscópio da marca Nikon modelo 80i com objetivas de 10X e 20X e suas imagens foram capturadas com uma câmera Nikon modelo DS-Ri1.

4. Estudo morfométrico

A quantificação de osso neoformado no interior do defeito ósseo foi baseada no estudo de Gosain et al. (2000), sendo determinado pela combinação de dois métodos. O primeiro método calculou a razão entre o comprimento linear do osso neoformado e o comprimento linear inicial do defeito, expresso em porcentagem, medidos através do eixo central e perpendicular às duas extremidades do defeito ósseo. O comprimento linear do osso neoformado correspondia à somatória de todos os comprimentos de cada porção de osso que viesse a ser formado no interior do defeito. No segundo método, a porcentagem de osso foi calculada com base na razão entre a área de osso neoformado e a área total do defeito inicial. As medidas morfométricas das imagens das secções histológicas foram feitas com o software *NIS-Elements: Advanced Research 3.0*.

5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) de 2 fatores para medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey se necessário. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A análise dos cortes histológicos demonstrou que não ocorreu formação de osso na região central do defeito em nenhum dos grupos, independentemente do tempo de cicatrização óssea. O osso neoformado foi encontrado somente nas margens do defeito. Porções de tecido conjuntivo mole foram encontradas no centro do defeito frente à dura-máter, que permaneceu intacta (Figuras 1 e 2).

A análise dos dados demonstrou que não há diferença estatisticamente significante do volume de osso formado entre camundongos dos grupos controle e *mdx* nos 3 tempos pós-operatórios. Além disto, o tempo de regeneração não interferiu no reparo ósseo em nenhum dos grupos, quando cada um foi analisado separadamente. A análise estatística também demonstrou que não houve interação entre a doença e o tempo de regeneração (Figura 3).

Embora os dados da morfometria correspondentes à razão de osso neoformado em área e em comprimento linear (ambos em porcentagem) no interior do defeito ósseo tenham sido similares estatisticamente, as médias do grupo *mdx* se mostraram maiores do que as do grupo controle (Figura 3).

DISCUSSÃO

A diminuição da massa óssea é observada em portadores de DMD similarmente a outras condições que reduzem a mobilidade (Biggar et al., 2005). Mesmo pacientes que ainda conseguem deambular apresentam diminuição da densidade mineral óssea, podendo aumentar o risco às fraturas (Larson e Anderson, 2000; Aparicio et al., 2002). As fraturas causam um impacto negativo na qualidade de vida e podem contribuir para a perda da deambulação e uso definitivo de cadeira de rodas (Larson e Anderson, 2000; Vestergaard et al., 2001). Como o camundongo *mdx* é um bom modelo para estudo da DMD e tem demonstrado uma ligação entre a ausência da distrofina e a neovascularização e cicatrização acelerada da pele (Straino et al., 2004), nós avaliamos a capacidade osteogênica do camundongo *mdx* frente a produção do defeito ósseo na calvária em diferentes tempos de regeneração.

O complexo processo de regeneração de defeitos ósseos requer uma coordenada interação de fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular, osteoblastos e células osteoprogenitoras (Aalami et al., 2004). Aalami e colaboradores (2004) relataram que, além destes fatores, o periôsteo, a dura-máter, o tempo pós-operatório e a idade contribuem para a cicatrização em defeitos produzidos na calvária de camundongos. Segundo estes pesquisadores, a cicatrização espontânea do defeito ósseo na calvária de animais é prejudicada quando ocorre a lesão da dura-máter durante a cirurgia. No presente estudo a dura-máter contribuiu normalmente com a cicatrização do osso, pois a mesma estava preservada em todos os animais.

Greenwald e colaboradores (2000a) sugeriram que as células da dura-máter de camundongos jovens tiveram maior capacidade para se diferenciar em osso do que as dos

camundongos adultos, em virtude do aumento da atividade da fosfatase alcalina e da síntese de osteocalcina. Outros estudos têm verificado que a dura-máter e os osteoblastos da calvária derivados de ratos com 6 dias de vida tiveram maior potencial osteogênico *in vitro* do que células derivadas de animais com 60 dias de vida (Greenwald et al., 2000b; Cowan et al., 2003). Aalami e colaboradores (2004) observaram que camundongos jovens (6 dias de vida) tiveram uma capacidade significativamente maior para formar novo osso em defeitos de calvária quando comparados com camundongos adultos (60 dias de vida) após 8 semanas de cicatrização. Nossos dados corroboram com estes estudos e demonstraram que nossos animais, que são adultos, apresentaram taxas de regeneração óssea similares estatisticamente entre os três tempos de regeneração pós-operatórios (15, 30 e 60 dias), independentemente do grupo analisado.

Estudo recente relatou que o osso da calvária de camundongos *mdx* apresenta alteração no seu metabolismo, demonstrando aumento da quantidade de osteoclastos (Rufo et al., 2009). Nakagaki e colaboradores (2011) observaram osteopenia do fêmur de camundongos *mdx* na ausência de sinais de degeneração do quadríceps aos 21 dias de vida, sugerindo a existência de algum fator intrínseco que desencadeia a diminuição da qualidade óssea, que pode estar relacionado direta ou indiretamente à ausência da distrofina. Acreditamos que mecanismo semelhante também pode acontecer em humanos. Rufo e colaboradores (2009) verificaram que osteoblastos humanos saudáveis não mineralizavam a matriz óssea quando eram expostos ao soro sangüíneo de portadores de DMD. Considerando esta diminuição da qualidade óssea e a similaridade estatística encontrada na taxa de regeneração óssea entre os grupos controle e *mdx*, entendemos que a capacidade osteogênica da calvária dos camundongos *mdx* foi mais expressiva do que a dos

camundongos controle entre 45 e 105 dias de vida. Estas idades correspondem à idade dos camundongos no momento da cirurgia e à idade de sacrifício do último tempo de regeneração estudado. Deste modo, a similaridade obtida entre as taxas de regeneração de ambos os grupos demonstrou um resultado positivo para o grupo *mdx*, considerando o fato de que camundongos *mdx* possuem um comprometimento do tecido ósseo decorrente de alteração genética.

Os fatores de crescimento, as citocinas e as quimiocinas representam elementos essenciais na modulação da regeneração e diferenciação da célula muscular (Straino et al., 2004). Segundo D'Amore e colaboradores (1994), os fatores osteogênicos como o *fgf-2*, por exemplo, estão elevados em pacientes com DMD, uma vez que são liberados das miofibras injuriadas. Como entre 35 e 90 dias a necrose da fibra muscular atinge seu ápice e mais de 50% das fibras musculares dos camundongos *mdx* se encontram em processo de regeneração (Tanabe et al., 1986), é provável que estímulos específicos oriundos das miofibras injuriadas teriam aumentado a vasculogênese neste período, estimulando a formação óssea. A liberação de citocinas e quimiocinas desempenha um papel importante no recrutamento de leucócitos e macrófagos. Estas células podem aumentar a deposição de colágeno e a migração de fibroblastos para a região em cicatrização (Straino et al., 2004). Deste modo, a liberação de moléculas de sinalização celular envolvidas na mediação e regulação da resposta inflamatória e imunitária parece ter compensado a má qualidade óssea de camundongos *mdx*, favorecendo a capacidade de reparo ósseo. Além disso, podemos sugerir que esta capacidade de reparo ósseo dependerá diretamente da idade e da quantidade de ciclos de degeneração e regeneração muscular, considerando o fato de que

estes ciclos diminuem nos camundongos *mdx* por volta dos 100-120 dias de vida (Tanabe et al., 1986).

Nakagaki e colaboradores (2011) concluíram que o fêmur do camundongo *mdx* tem menor grau de organização do colágeno e sugeriram que pode haver redução da quantidade de *cross-links* e de proteoglicanos envolvidos na sua fibrilogênese. O colágeno regula o aspecto espacial da mineralização por definir o local para deposição e crescimento mineral (Siperko & Landis, 2001) e o aspecto temporal deste processo é comumente regulado por algumas macromoléculas (proteínas não-colagênicas) da matriz óssea, como os proteoglicanos (Young, 2003). Estas macromoléculas podem facilitar a nucleação do cristal de hidroxiapatita, seqüestrar íons minerais para aumentar a concentração local de cálcio e/ou fósforo ou facilitar a nucleação heterogênea (Clarke, 2008). Considerando estes aspectos, o mecanismo de compensação discutido anteriormente pode ter favorecido a organização da matriz extracelular óssea e a taxa de mineralização.

Em virtude dos fatos apresentados, a deficiência genética do camundongo *mdx* pode ser compensada por uma resposta adaptativa do organismo aos níveis patológicos da degeneração muscular. Então, a idade e a quantidade de ciclos de degeneração muscular provavelmente interferiram na regeneração óssea do camundongo *mdx*, compensando uma deficiência genética por favorecer sua taxa de formação óssea.

AGRADECIMENTOS

Wilson Romero Nakagaki foi financiado pela FAPESP (2007/07638-0) e CAPES/PROEX. O estudo recebeu auxílio a pesquisa da FAPESP (2008/57041-2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalami, O.O., Nacamuli, R.P., Lenton, K.A., Cowan, C.M., Fang, T.D., Fong, K.D., Shi, Y.Y., Song, H.M., Sahar, D.E., Longaker, M.T. 2004. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg*, 114: 713-720.
- Anderson, J., Lentz, D., Johnson, R. 1993. Recovery from disuse osteopenia coincident to restoration of muscle strength in *mdx* mice. *Bone*, 14: 625–634.
- Aparicio, L.F., Jurkovic, M., DeLullo, J. 2002. Decreased bone density in ambulatory patients with duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*, 22: 179-81.
- Bianchi, M.L., Mazzanti, A., Galbiati, E., Saraifoger, S., Dubini, A., Cornelio, F., Morandi, L. 2003. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int*, 14: 761-767.
- Biggar, W.D., Bachrach, L.K., Henderson, R.C., Kalkwarf, H., Plotkin, H., Wong, B.L. 2005. Bone health in Duchenne muscular dystrophy: a workshop report from the meeting in Cincinnati, Ohio, July 8, 2004. *Neuromuscul Disord*, 15: 80-85.
- Briguet, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., Meier, T., Magyar, J.P. 2004. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. *Neuromuscul Disord*, 14: 675-82.
- Canalis, E., Bilezikian, J.P., Angeli, A., Giustina, A. 2004. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 34: 593–598.
- Clarke, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3: S131-9.

- Cowan, C.M., Quarto, N., Warren, S.M., Salim, A., Longaker, M.T. 2003. Age-related changes in the biomolecular mechanisms of calvarial osteoblast biology affect fibroblast growth factor-2 signaling and osteogenesis. *J Biol Chem*, 278: 32005-13.
- D'Amore, P.A., Brown, R.H.Jr., Ku, P.T., Hoffman, E.P. et al. 1994. Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 35: 362-365.
- Gosain, A.K., Song, L., Yu, P., Mehrara, B.J., Maeda, C.Y., Gold, L.I., Longaker, M.T. 2000. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. *Plast Reconstr Surg*, 106: 360-371.
- Greenwald, J.A., Mehrara, B.J., Spector, J.A., Chin, G.S., Steinbrech, D.S., Saadeh, P.B., Luchs, J.S., Paccione, M.F., Gittes, G.K., Longaker, M.T. 2000a. Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: immature versus mature dura mater. *Plast Reconstr Surg*, 105: 1382-92.
- Greenwald, J.A., Mehrara, B.J., Spector, J.A., Warren, S.M., Crisera, F.E., Fagenholz, P.J., Bouletreau, P.J., Longaker, M.T. 2000b. Regional differentiation of cranial suture-associated dura mater in vivo and in vitro: implications for suture fusion and patency. *J Bone Miner Res*. 2000, 15: 2413-30.
- Grounds, M.D., Torrisi, J. 2004. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*, 18: 676-82.
- Hsu, J.D. 1982. Skeletal changes in children with neuromuscular disorders. In: *Factors and Mechanisms Influencing Bone Growth*. New York: Alan R. Liss, pp. 553-7.
- Larson, C.M., Henderson, R.C. 2000. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*, 20: 71-74.

- McDonald, D.G.M., Kinali, M., Gallagher, A.C., Mercuri, E., Muntoni, F., Roper, H., Jardine, P., Jones, D.H., Pike, M.G. 2002. Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 44: 695-698.
- Montgomery, E., Pennington, C., Isales, C.M., Hamrick, M.W. 2005. Muscle-bone interactions in dystrophin-deficient and myostatin-deficient mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 286: 814-822.
- Nakagaki, W.R., Bertran, C.A., Matsumura, C.Y., Santo-Neto, H., Camilli, J.A. 2011. Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of *mdx* mice. *Bone*, 48: 372-379.
- Pastoret, C., Sebille, A. 1995. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of Neurological Science*, 129: 97-105.
- Porter, J.D., Guo, W., Merriam, A.P., Khanna, S. et al. 2003a. Persistent over-expression of specific CC class chemokines correlates with macrophage and T-cell recruitment in *mdx* skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*, 13: 223–235.
- Porter, J.D., Merriam, A.P., Leahy, P., Gong, B., Khanna, S. 2003b. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (*mdx*) mice. *Hum Mol Genet*, 12: 1813-21.
- Reed, P., Bloch, R.J. 2005. Postnatal changes in sarcolemmal organization in the *mdx* mouse. *Neuromuscul Disord*, 15: 552-61.
- Rufo, A., Del Fattore, A., Bianchi, M.L., Morandi, L., Bertini, E., Musarò, A., Ferrari, S., Pierroz, D., Capulli, M., Rucci, N., De Benedetti, F., Teti, A. 2009. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne Muscular Dystrophy. *Bone*, 44(2): S237-S238.

- Silva, R.V., Camilli, J.A. 2006. Repair of bone defects treated with autogenous bone graft and low-power laser. *J Craniofac Surg*, 17: 297-301.
- Siperko, L.M., Landis, W.J. 2001. Aspects of mineral structure in normally calcifying avian tendon. *J. Struct. Biol.*, 135: 313–320.
- Söderpalm, A.C., Magnusson, P., Ahlander, A.C., Karlsson, J., Kroksmark, A.K., Tulinius, M., Swolin-Eide, D. 2007. Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 17: 919-928.
- Straino, S., Germani, A., Di Carlo, A., Porcelli, D., De Mori, R., Mangoni, A., Napolitano, M., Martelli, F., Biglioli, P., Capogrossi, M.C. 2004. Enhanced arteriogenesis and wound repair in dystrophin-deficient *mdx* mice. *Circulation*, 110: 3341-3348.
- Tanabe, Y., Esaki, K., Nomura, T. 1986. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *Acta Neuropathol*, 69, 91-95.
- Toti, P., Villanova, M., Vatti, R., Schuerfeld, K., Stumpo, M., Barbagli, L., Malandrini, A., Costantini, M. 2003. Nerve growth factor expression in human dystrophic muscles. *Muscle Nerve*, 27: 370-373.
- Vestergaard P, Glerup H, Steffenson BF, Rejnmark L, Rahbeck J, Mosekilde L. 2001. Fracture risk in patients with Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *J Rehab Med*, 33:150-155.
- Yablonka-Reuveni, Z., Anderson, J.E. 2006. Satellite cells from dystrophic (*mdx*) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Developmental Dynamics*, 235: 203-212.
- Young, M.F. 2003. Bone matrix proteins: Their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos. Int.*, 14: S35–S42.

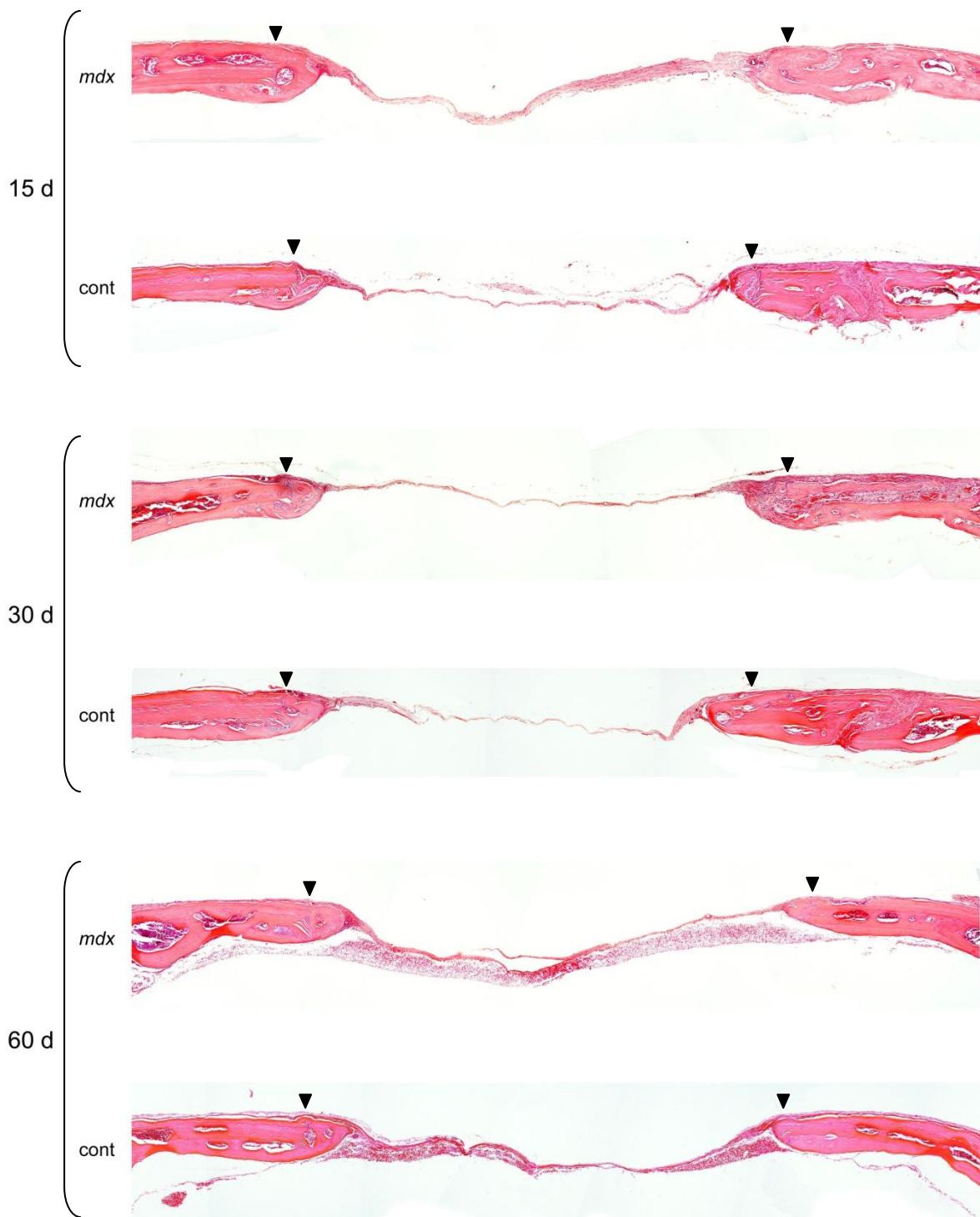


Figura 1. Microscopia de luz do defeito ósseo da calvária dos grupos *mdx* (n = 5, por tempo) e controle (n = 5, por tempo) aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório. Pontas de seta indicam a divisão entre o osso original e o neoformado. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Barra = 500 μ m.

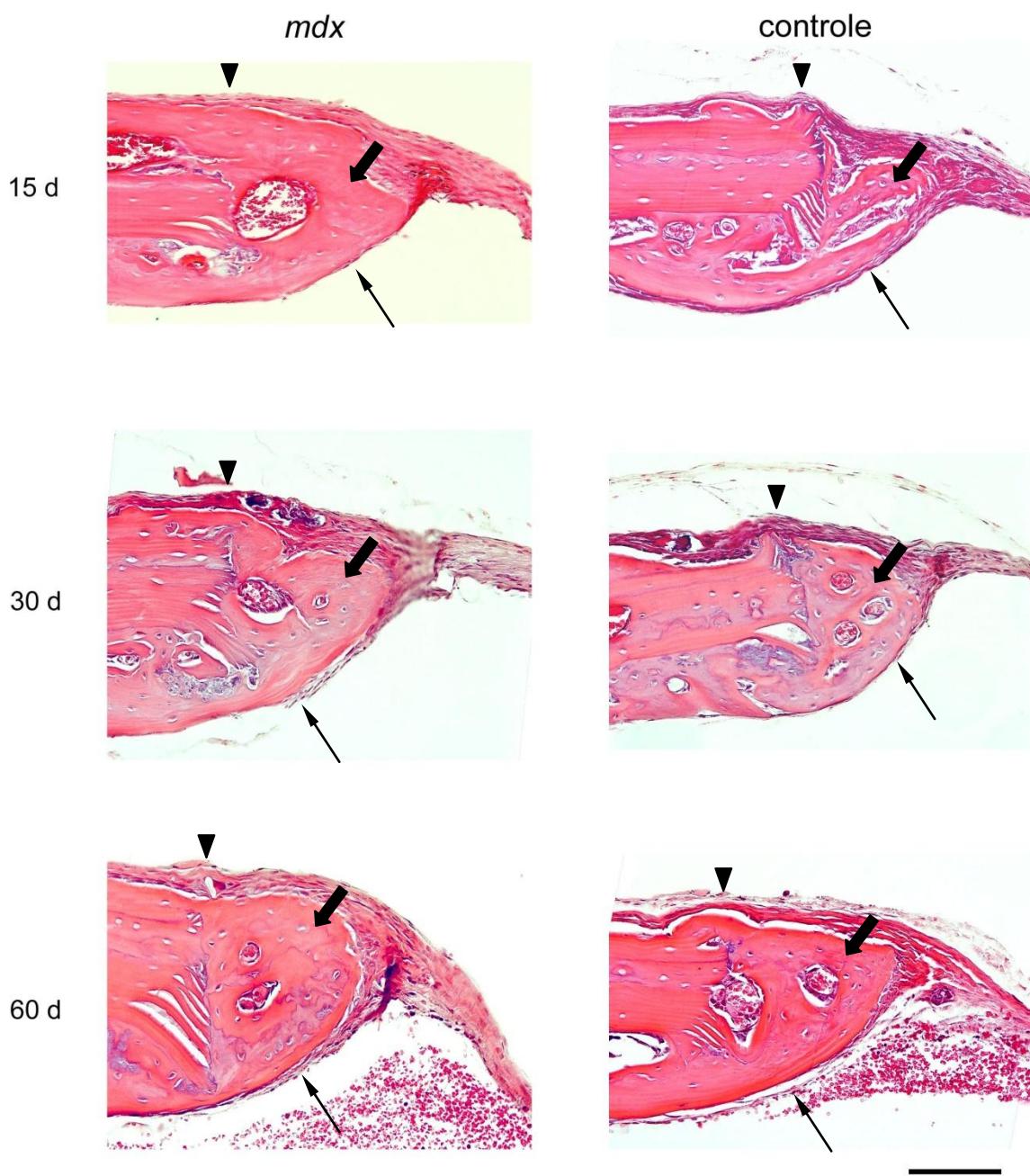
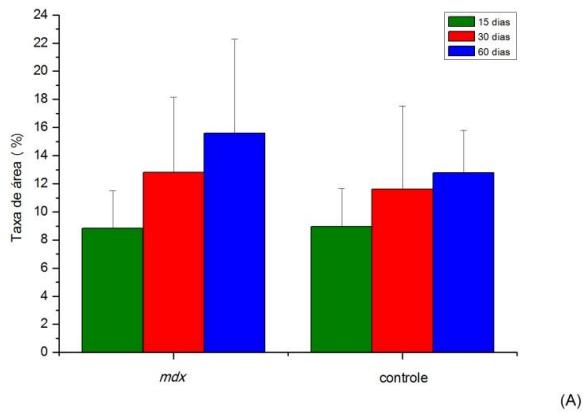
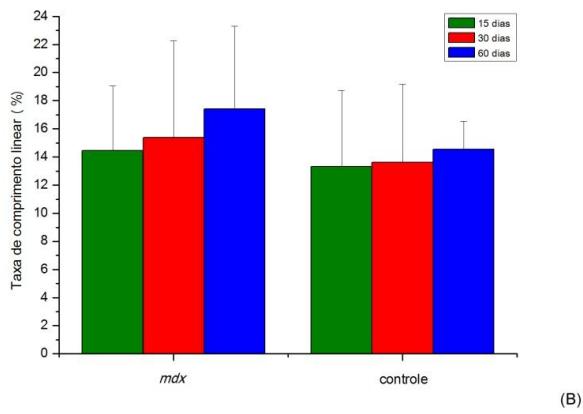


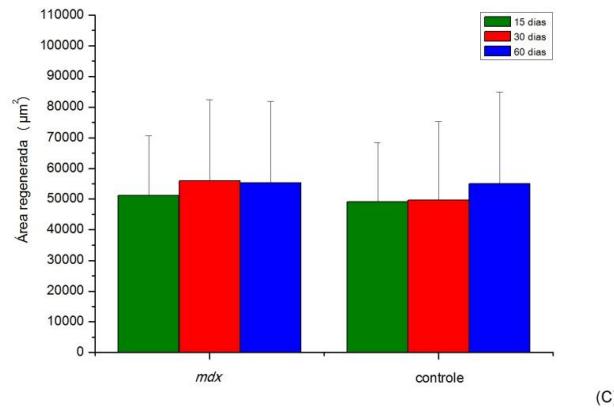
Figura 2. Margem do defeito ósseo da calvária dos grupos *mdx* ($n = 5$, por tempo pós-operatório) e controle ($n = 5$, por tempo pós-operatório) aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório. Pontas de seta indicam a divisão entre o osso original e o neoformado. Setas largas apontam osso neoformado. Setas finas indicam que a dura-máter permaneceu intacta em todos os grupos. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Barra = 100 μ m.



(A)



(B)



(C)

Figura 3. Parâmetros morfométricos do osso neoformado de camundongos dos grupos *mdx* ($n = 5$, por tempo pós-operatório) e controle ($n = 5$, por tempo pós-operatório). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos independentemente do tempo pós-operatório. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tempos pós-operatórios quando analisado cada grupo separadamente.

TRABALHOS PARALELOS

- 1) Artigo III – Submetido para o periódico *Joint Bone Spine* (IF = 2,25) sob o manuscrito número: BONSOI-D-10-00458.

Wilson Romero Nakagaki, José Angelo Camilli. “Bone tissue and muscle dystrophin deficiency”.

- 2) Artigo IV – Em processo de tradução.

Wilson Romero Nakagaki, Tatiana Carla Tomiosso, Edson Rosa Pimentel, José Angelo Camilli. “Alteração da resistência mecânica do tendão calcâneo de camundongos *mdx*”.

Bone tissue and muscle dystrophin deficiency

Wilson Romero Nakagaki, José Angelo Camilli *

Department of Anatomy, Cell Biology and Physiology and Biophysics, Institute of Biology,

State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

* Corresponding author: Phone: +55 19 3521-6104; fax: +55 19 3521-6185.

E-mail address: jcamilli@unicamp.br (J.A. Camilli).

Short title: Bone and muscular dystrophy

Article type: Review

Summary

Duchenne muscular dystrophy is a neuromuscular disease caused by the lack of dystrophin that affects skeletal muscles, causing degeneration of muscle fibers and replacing them with fibrous and adipose tissue, events that gradually lead to functional loss. Patients with Duchenne muscular dystrophy have shown that bones become more fragile with age and with advancement of the disease. Muscle weakness, reduced mobility and the use of glucocorticoids have been suggested to be the factors that promote bone deterioration. However, it seems that this does not occur in *mdx* mice. It has been identified in *mdx* mice evidence of a factor related or not to the lack of dystrophin that also participates in the impairment of bone quality. *Mdx* mice also exhibit muscle degeneration, but unlike human it is compensated by muscle regeneration. In consequence, there is an increasing of muscle mass, but there is not necessarily an increasing of muscle contractile strength. The accommodation of this increased muscle mass promotes bone formation at specific sites, such as at tendo-osseous junctions. In addition, the inflammatory response to muscle injury may be responsible for the increase in angiogenesis and regeneration observed in *mdx* mice, inducing the release of cytokines and chemokines that play an important role in the recruitment of leukocytes and macrophages. Then, *mdx* mice may possess compensatory mechanisms in bone in response to a genetic defect.

Keywords: bone; dystrophin; *mdx* mice; muscular dystrophy.

Duchenne muscular dystrophy

The term “progressive muscular dystrophy” refers to a group of hereditary degenerative diseases caused by mutations in genes that encode a wide variety of proteins, such as extracellular matrix proteins, membrane-associated proteins and nuclear matrix proteins of the muscle fiber [1]. The most common and severe form of muscular dystrophy in humans is Duchenne muscular dystrophy (DMD). This disease is caused by a mutation in the gene located in band Xp21 of the X chromosome that encodes dystrophin, a protein essential for the maintenance of the integrity of cardiac and skeletal muscle cells [1]. In the sarcolemma, dystrophin is associated with glycoproteins and forms the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) [2,3]. Dystrophin is found in skeletal muscle, cardiac muscle, smooth muscle, brain [4], and cerebellum [5].

Dystrophin has a relative molecular mass of 427 kDa and is located on the cytoplasmic side of the sarcolemma. Structurally, dystrophin can be divided into four distinct domains: an amino-terminal domain, a large central rod domain, a cysteine-rich domain, and a carboxyl-terminal domain [6]. Other proteins of the DGC include dystroglycans (α and β), sarcoglycans (α , β , γ and δ), sarcospan, dystrobrevin (α), and syntrophins ($\alpha 1$ and $\beta 1$) [7]. α -Dystroglycan is present in the extracellular space where it binds to laminin-2 in the basal lamina and to β -dystroglycan, a transmembrane protein. β -Dystroglycan serves as a link between α -dystroglycan and dystrophin [8]. The sarcoglycans are a group of four subunits of transmembrane proteins, α -, β -, γ - and δ -sarcoglycan, that bind to each other and function as a single protein. The sarcoglycans bind to α -dystroglycan [9]. Syntrophins are intracellular proteins that exist in muscle cells in the form of subunits $\alpha 1$ and $\beta 1$. Both subunits bind directly to the C-terminal end of dystrophin

[10]. $\alpha 1$ -Syntrophin also binds to neuronal nitric oxide synthase (nNOS). nNOS is the most abundant isoform of NOS in skeletal muscle, although small amounts of the endothelial and inducible isoforms are also found. In muscle fibers, nNOS is found close to the sarcolemma bound to $\alpha 1$ -syntrophin and also as free cytosolic form. In the absence of dystrophin, this enzyme is only found in the cytosol and its total amount, as well as its activity, and the production of nitric oxide (NO) are reduced [11].

In skeletal muscle, NO participates in the maintenance of adequate blood flow to muscle tissue during contraction, the release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum, glucose metabolism [11,12], and the activation of satellite cells [13]. For the maintenance of adequate blood flow, NO reduces sympathetic vasoconstriction in the muscle during contraction to adapt the blood flow to the physiological needs of the tissue. This protective action of NO is deficient in dystrophic muscles, which become susceptible to the occurrence of ischemia during muscle activities [12].

The interactions of DGC proteins mediate the binding of the cytoskeleton to laminin-2 in the basal lamina of the extracellular matrix. This arrangement suggests the importance of dystrophin and other proteins for the maintenance of sarcolemmal stability, with the former being fundamental for the physical integrity of the muscle fiber [14,15]. The lack of dystrophin interrupts the link between the extracellular matrix and the fiber cytoskeleton, causing sarcolemmal instability (muscle fibers lose their stability) and disorganization of DGC components during cycles of muscle contraction and relaxation. These events, in turn, lead to the exacerbated inflow of calcium ions, activation of calcium-dependent endogenous proteases, inhibition of mitochondrial activity, and muscle fiber hypercontraction [1,16]. A process of muscle regeneration then starts through the activation

of satellite cells, followed by the formation and maturing of myotubes in muscle fibers. However, this process is impaired or insufficient in DMD. Muscles are gradually replaced with fat and fibrous tissue, an event that explains the loss of muscle function observed in these patients [17].

The first clinical signs of DMD occur between 3 and 5 years of age and are characterized by muscle weakness in the lower limbs and difficulties in climbing stairs and running. Falls are frequent. Histopathological analysis reveals extensive muscle fiber necrosis. The loss of muscle function progresses and the patients become wheelchair bound and dependent on mechanical ventilation. DMD patients usually die between the age of 20 and 30 because of respiratory or heart failure [1,18].

***Mdx* mice**

The *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) mouse is an experimental model widely used for the study of DMD, which is derived from a spontaneous mutation identified in the C57BL/10-ScCr mouse line [1, 19]. Like dystrophic humans, these animals carry a genetic mutation that causes the lack of dystrophin and an intense inflammatory process in muscles [1,19]. In *mdx* mice, intense and most marked muscle fiber degeneration begins by about 21 days of postnatal life and is followed by a rapid response of muscle regeneration, especially in skeletal muscles of the hind limb [20-25]. Studies have shown that about 0.62% of muscle fibers are regenerated by postnatal day 7 versus 2.2% and 5% by day 14 and day 21, respectively. No significant muscle damage is observed during these periods, which are characterized as a pre-necrotic state [26,27].

Reed and Bloch [25] found little evidence of inflammation, central nuclei or other pathological signs at 18 days of age. According to these authors, the fourth week of life is a crucial period for the tibialis anterior muscle, with more severe muscle degeneration being observed at 28 days of life. At this age, *mdx* mice presented intense muscle fiber inflammation, significant loss of sarcolemmal organization and abundant central nuclei in myofibers when compared to the control group. It is believed that the sudden onset of myonecrosis observed after 21 days of age is due to an increased muscle activity after the nursing period associated with alterations in the concentration of cytoplasmic components, with muscle fibers becoming more susceptible to damage [28-30].

By 30 days of age, muscle fibers show significant histological alterations and between 35 and 90 days more than 50% of the muscle fibers are in the process of regeneration characterized by the presence of a central nucleus and variable diameter. At 120 days of age, practically all muscle fibers have a central nucleus, indicating regenerated fibers [28]. Heterogeneity in muscle fiber diameter and a significant increase in the number of fibers with central nuclei are observed up to 9 months of age [23]. The regenerative capacity of muscles decreases after 20 months of age due to a gradual decline in the number and proliferation capacity of satellite cells [31]. The animals start to show pathological features similar to those observed in humans, such as progressive motor weakness and loss of muscle fibers that are replaced with connective tissue [32].

Despite similarities, differences exist in the development of dystrophy between *mdx* mice and patients with DMD. In *mdx* mice, both genders are affected and muscle fibers are able to regenerate successively after degeneration during most of the animal's life [29]. In humans, only boys are affected by DMD and functional loss already occurs at the

beginning of childhood [1,18]. This difference might be explained by the existence of compensatory mechanisms in *mdx* mice, for example, a greater regenerative capacity of muscle fibers or replacement of dystrophin with utrophin.

Utrophin is structurally homologous to dystrophin and is found on the cytoplasmic side of the sarcolemma during fetal development. After birth, this protein is only present on the cytoplasmic side of neuromuscular and myotendinous junctions [33]. Utrophin is expressed in large amounts in *mdx* mice [33] and is found on the cytoplasmic side of the sarcolemma, replacing and performing a function similar to that of dystrophin [34]. This replacement possibly explains why *mdx* mice show less severe symptoms of dystrophy than humans [6].

Dystrophin deficiency and bone tissue

Bone tissue undergoes biochemical, morphological and/or biomechanical changes under the influence of age [35], immobilization [36], exercise [37,38], metabolic disorders [38], or neuromuscular diseases [39-40]. Therefore, bone remodeling is not only required to replace damaged or dead tissue, but also occurs due to the capacity of this tissue to adapt to mechanical requirements and to respond to nutritional and/or metabolic changes [41].

The skeleton possesses a sensitive and specialized response system that recognizes the intensity of a mechanical stimulus in order to adapt to mechanical loading. A reduction in this stimulus causes bone resorption, whereas an increased stimulus favors the preservation and formation of bone. Bone cells should therefore be able to respond to load reduction or loss by inducing bone resorption. The consequences of this resorption can be

observed in bones of paraplegic patients, astronauts and guinea pigs with an immobilized limb [42].

Muscle weakness results in thinner and demineralized bones and delays the occurrence of ossification centers [43]. Studies have shown a lower bone mineral density in the trunk, hip and lower limb bones of patients with DMD [40,44-46]. Thus, the loss of bone mineral density occurs in parallel with advancement of the disease [39,40,45] and, consequently, patients develop osteoporosis and their bones become more susceptible to fractures [40,46]. Fractures are especially frequent in children who still can walk [39,40,46,47]. Since DMD weakens pelvic and knee muscles, getting up from the floor and walking become difficult and falls are frequent [1].

It is interesting to note that the studies demonstrating the deleterious effects of muscular dystrophy on bone in humans [39,40,45,47] and *mdx* mice [48] were conducted after the occurrence of symptoms of the disease, i.e., after the onset of significant muscle degeneration. These studies have attributed bone weakness to two factors: muscle fiber degeneration that provokes a reduction of the mechanical stimuli and the use of medications. However, in view of the various metabolic alterations that occur in bone tissue of *mdx* mice, such as a reduction in alkaline phosphatase concentration [49], it cannot be concluded that the bone alterations found are exclusively due to these factors.

Anderson et al. [48] observed reduced cortical thickness, increased porosity and lower mechanical resistance in the tibia of 28-day-old *mdx* mice and attributed these deficiencies to muscle weakness resulting from intense muscle fiber degeneration. However, Nakagaki et al. [50] found osteopenia, lower mineral content and reduced mechanical resistance in the femur of 21-day-old *mdx* mice in the absence of signs of

quadriceps degeneration. The authors suggested the existence of some intrinsic factor that triggers a reduction in bone quality and that may be directly or indirectly related to the lack of dystrophin. Therefore, the loss of bone quality in *mdx* mice is not only due to muscle weakness. This muscle weakness may interact with the unknown intrinsic factor and compromise bone quality in these animals [50]. A similar mechanism may be present in humans. Rufo et al. [51] showed that healthy human osteoblasts do not mineralize bone matrix when exposed to blood serum from patients with DMD.

Medications and muscular dystrophy

The objective of pharmacological strategies for the treatment of DMD is to reduce muscle impairment, minimizing functional damage caused by the disease. In addition, this approach permits to study the function of molecules involved in the process of necrosis and muscle regeneration [52]. Corticosteroids such as prednisone and deflazacort are the drugs most used for the treatment of DMD in humans in an attempt to minimize progression of the disease. However, these drugs are associated with serious side effects such as weight gain, loss of bone mass, and edema [53,54].

Aparicio et al. [55] diagnosed osteoporosis in the proximal femur and lumbar spine of children with DMD who were still able to walk without assistance and who were not treated with corticosteroids. Bianchi et al. [40] observed a marked reduction of bone mineral density in patients treated or not with corticosteroids when compared to the control group (healthy children). However, bone mineral density was lower in patients treated with corticosteroids, demonstrating that these drugs contribute to bone weakness in patients with DMD.

Although corticosteroid treatment increases muscle strength in patients with DMD by reducing the inflammatory response resulting from the degeneration of muscle fibers, long-term administration of these drugs reduces bone mass and mechanical resistance [40]. In this respect, the use of corticosteroids has been shown to increase osteoblastic apoptosis and osteoclastogenesis [56].

Influence of age on *mdx* bones

Studies on patients with DMD have shown that their bones become more fragile with increasing age and advancement of the disease due to muscle weakness and reduced mobility [40,44,45]. However, it seems that this does not occur in bones of *mdx* mice. Loss of bone quality (strength and mineral content) has been observed in the presence [48] or absence [50] of muscle impairment.

Montgomery et al. [57] demonstrated higher femoral bone mineral density and fracture strength, as well as increased hind limb muscle mass, in 4-month-old *mdx* mice even in the presence of systemic muscle weakness caused by episodes of muscle degeneration. In addition, radiography revealed that the proximal third of the femur was laterally expanded in *mdx* mice when compared to the control group, suggesting the presence of localized stimuli of bone formation at tendo-osseous junctions during periods of muscle regeneration. Montgomery et al. [57] based their hypothesis on two situations. One is related to loads that emanate from the total muscle mass (loads transmitted to limb segments) and the other to the action of osteogenic factors such as *fgf-2* that are released from injured myofibers and are elevated in patients with DMD. According to the authors, the increase in bone tissue at these sites is an adaptation to accommodate the increased

muscle size and mass, irrespective of muscle contractile strength. In addition, the inflammatory response to muscle injury may be responsible for the increase in angiogenesis and regeneration observed in *mdx* mice, inducing the release of cytokines and chemokines that play an important role in the recruitment of leukocytes and macrophages [58].

Anderson et al. [48] showed that the osteopenic symptoms observed in the tibia of 4-week-old *mdx* mice were reversed during the period of muscle regeneration at 12 months of age. At this age, *mdx* tibial cortical bone was hypermineralized and less porous when compared to the control group, but cortical thickness continued to be lower and there were no signs of immature bone deposition in the subperiosteal region. According to the authors, this recovery differs from that observed in immobilized bones re-exposed to normal mechanical loads (walking, sitting, etc.). The authors proposed that this difference is due to genetic defects in bone formation or to a delay of bone development in *mdx* mice.

The majority of the studies about bone alterations in *mdx* mice suggest that the process of muscle degeneration and regeneration observed in these animals also serves as a factor of bone adaptation by stimulating bone formation in specific osseous regions. In other words, a compensatory mechanism exists in bone in response to the genetic defect and it becomes more refined with age as a function of muscle degeneration and regeneration. However, the simultaneous investigation of muscles and bones at an advanced age of *mdx* mice would be interesting to identify and understand the relationship between degeneration/regeneration cycles, muscle mass and bone. Weekly analyses should be performed since the regenerative capacity of muscle is lost in *mdx* mice after prolonged cycles of degeneration/regeneration [31].

Conclusion

There is no doubt that the loss of bone mass (especially trunk and lower limbs) observed in patients with DMD is associated with a reduction in mechanical stimuli and muscle weakness. These factors may potentiate the genetic deficiency of a specific but still unknown mechanism related to the metabolism of bone tissue in the absence of dystrophin. However, in *mdx* mice muscle degeneration and regeneration that occurs with advancing age seems to induce compensatory mechanisms in response to this bone impairment.

Acknowledgments

Wilson Romero Nakagaki was the recipient of fellowships from FAPESP (2007/07638-0) and CAPES/PROEX, Brazil. This study was supported by a grant from FAPESP (2008/57041-2).

Conflict of interest

There are no conflicts of interest related to the manuscript. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- [1] Lovering RM, Porter NC, Bloch RJ. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Phys Ther* 2005;85:1372-88.
- [2] Petrof BJ. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81 Suppl:162-74.
- [3] Spencer MJ, Mellgren RL. Overexpression of a calpastatin transgene in *mdx* muscle

- reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet* 2002;11:2645-55.
- [4] Prior TW, Bridgeman SJ. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn* 2005;7:317-26.
 - [5] Cyrulnik SE, Hinton VJ. Duchenne muscular dystrophy: a cerebellar disorder? *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:486-96.
 - [6] Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:108-17.
 - [7] Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:349-61.
 - [8] Watchko JF, O'Day TL, Hoffman EP. Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J Appl Physiol* 2002;93:407-17.
 - [9] Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, et al. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve* 2005;32:563-76.
 - [10] Jones KJ, Compton AG, Yang N, et al. Deficiency of the syntrophins and alpha-dystrobrevin in patients with inherited myopathy. *Neuromuscul Disord* 2003;13:456-67.
 - [11] Rando TA. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech* 2001;55:223-35.
 - [12] Kaminski HJ, Andrade FH. Nitric oxide: biologic effects on muscle and role in muscle diseases. *Neuromuscul Disord* 2001;11:517-24.
 - [13] Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:575-84.

- [14] Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 2004;94:1023-31.
- [15] Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic* 2007;8:177-83.
- [16] Salimena MC, Lagrota-Candido J, Quírico-Santos T. Gender dimorphism influences extracellular matrix expression and regeneration of muscular tissue in *mdx* dystrophic mice. *Histochem Cell Biol* 2004;122:435-44.
- [17] Grounds MD, Sorokin L, White J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. *Scand J Med Sci Sports* 2005;15:381-91.
- [18] Biggar WD. Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Rev* 2006;27:83-8.
- [19] Vainzof M, Ayub-Guerrieri D, Onofre PC, et al. Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci* 2008;34:241-8.
- [20] McGeachie JK, Grounds MD, Partridge TA, et al. Age-related changes in replication of myogenic cells in *mdx* mice: quantitative autoradiographic studies. *J Neurol Sci* 1993;119:169-79.
- [21] Pastoret C, Sebille A. *mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 1995;129:97-105.
- [22] Porter JD, Merriam AP, Leahy P, et al. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (*mdx*) mice. *Hum Mol Genet* 2003;12: 1813-21.
- [23] Briguet A, Courdier-Fruh I, Foster M, et al. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. *Neuromuscul Disord* 2004;14:675-82.

- [24] Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J* 2004;18:676-82.
- [25] Reed P, Bloch RJ. Postnatal changes in sarcolemmal organization in the *mdx* mouse. *Neuromuscul Disord* 2005;15:552-61.
- [26] Minatel E, Neto HS, Marques MJ. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice. *Muscle Nerve* 2003;28:561-9.
- [27] Porter JD, Merriam AP, Khanna S, et al. Constitutive properties, not molecular adaptations, mediate extraocular muscle sparing in dystrophic *mdx* mice. *FASEB J* 2003;17:893-5.
- [28] Tanabe Y, Esaki K, Nomura T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. *Acta Neuropathol* 1986;69:91-5.
- [29] Cullen MJ, Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (*mdx*) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 1988;77:69-81.
- [30] Disatnik MH, Dhawan J, Yu Y, et al. Evidence of oxidative stress in *mdx* mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci* 1998;161:77-84.
- [31] Luz M, Marques M, Santo-Neto H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:691-695.
- [32] Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. Phenotype of dystrophinopathy in old *mdx* mice. *Anat Rec* 1995;242:70-6.
- [33] Deconinck AE, Potter AC, Tinsley JM, et al. Postsynaptic abnormalities at the

- neuromuscular junctions of utrophin-deficient mice. *J Cell Biol* 1997;136:883-94.
- [34] Blake DJ, Weir A, Newey SE, et al. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002;82:291-329.
- [35] Hamrick MW, Ding KH, Pennington C, et al. Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone* 2006;39:845-53.
- [36] Kaneps AJ, Stover SM, Lane NE. Changes in canine cortical and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise. *Bone* 1997;21:419-23.
- [37] Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, et al. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol* 2001;91:1663-8.
- [38] Renno AC, Silveira Gomes AR, Nascimento RB, et al. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. *Exp Gerontol* 2007;42:517-22.
- [39] McDonald DG, Kinali M, Gallagher AC et al. Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 2002;44:695-8.
- [40] Bianchi ML, Mazzanti A, Galbiati E, et al. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int* 2003;14:761-7.
- [41] Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001;10 Suppl :86-95.
- [42] Rubin J, Greenfield EM. Osteoclast: Origin and Differentiation. In: Bronner F, Farach-Carson MC, Rubin J, Eds. *Bone Resorption*, 1st ed. London: Springer-Verlag London Limited; 2005. p.15.

- [43] Hsu JD. Skeletal changes in children with neuromuscular disorders. In: Dixon AD, Sarnat BG, Eds. Factors and mechanisms influencing bone growth, 1st ed. New York: Alan Liss; 1982. p. 553-7.
- [44] Palmieri GM, Bertorini TE, Griffin JW, et al. Assessment of whole body composition with dual energy x-ray absorptiometry in Duchenne muscular dystrophy: correlation of lean body mass with muscle function. *Muscle Nerve* 1996;19:777-9.
- [45] Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop* 2000;20:71-4.
- [46] Söderpalm AC, Magnusson P, Ahlander AC, et al. Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2007;17:919-28.
- [47] Douvillez B, Braillon P, Hodgkinson I, et al. Pain, osteopenia and body composition of 22 patients with Duchenne muscular dystrophy: a descriptive study. *Ann Readapt Med Phys* 2005;48:616-22.
- [48] Anderson JE, Lentz DL, Johnson RB. Recovery from disuse osteopenia coincident to restoration of muscle strength in *mdx* mice. *Bone* 1993;14:625-34.
- [49] Aoyagi T, Wada T, Kojima F, et al. Various enzyme activities in muscle and other organs of dystrophic mice. *J Clin Invest* 1981;67:51-9.
- [50] Nakagaki WR, Bertran CA, Matsumura CY, et al. Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of *mdx* mice. *Bone* 2011; 48: 372-9
- [51] Rufo A, Del Fattore A, Bianchi ML, et al. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne Muscular Dystrophy. *Bone* 2009;44 Suppl:237-8.

- [52] Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient *mdx* mice. *Hum Mol Genet* 2002;11:263-72.
- [53] Muntoni F, Fisher I, Morgan JE, et al. Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research. *Neuromuscul Disord* 2002;12 Suppl:162-5.
- [54] Khurana TS, Davies KE. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:379-90.
- [55] Aparicio LF, Jurkovic M, DeLullo J. Decreased bone density in ambulatory patients with duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop* 2002;22:179-81.
- [56] Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, et al. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*. 2004;34:593-8.
- [57] Montgomery E, Pennington C, Isales CM, et al. Muscle-bone interactions in dystrophin-deficient and myostatin-deficient mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005;286:814-22.
- [58] Straino S, Germani A, Di Carlo A, et al. Enhanced arteriogenesis and wound repair in dystrophin-deficient *mdx* mice. *Circulation* 2004;110:3341-8.

Alteração da resistência mecânica do tendão calcâneo de camundongos *mdx*

Wilson Romero Nakagaki ^a, Tatiana Carla Tomiosso ^b, Edson Rosa Pimentel ^a, José Angelo Camilli ^{a,*}

^a Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Departamento de Histologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil

* Autor para correspondência

Telefone: +55 19 3521-6104; fax: +55 19 3521-6185.

E-mail: jcamilli@unicamp.br (J.A. Camilli).

Resumo

Mudanças quantitativas e qualitativas nos componentes da matriz extracelular dos tendões ocorrem em função do envelhecimento, da prática de atividades físicas e de patologias específicas, como a distrofia muscular de Duchenne (DMD). Nesta doença há ausência da proteína distrofina que é essencial para a manutenção da integridade e estabilidade das células musculares cardíacas e esqueléticas. Estudo mostrou que há relação entre músculos com sua função comprometida e as propriedades mecânicas de seus tendões de camundongos *mdx*, um modelo muito usado para o estudo da DMD. Considerando as evidências de que os tecidos do *mdx* apresentam metabolismo alterado, como no fêmur, elaboramos a hipótese de que podem existir alterações no tendão calcâneo do *mdx* mesmo antes do início dos ciclos mais intensos de degeneração das fibras musculares, que se iniciam de forma abrupta após os 21 dias de vida. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar possíveis alterações no tendão calcâneo de camundongos *mdx*. Foram utilizados 12 animais machos de cada grupo: *mdx* e controle. Foi realizado teste mecânico de tração, quantificação de hidroxiprolina, coloração com azul de toluidina e de picrosírius red. O conteúdo de hidroxiprolina foi ligeiramente maior no *mdx*, embora tenha sido estatisticamente igual ao controle. O tendão do grupo controle demonstrou maior resistência mecânica, mais fibroblastos arredondados, núcleo com cromatina bem descondensada e material citoplasmático bem corado, ligeiramente metacromático. No entanto, a região de sua matriz extracelular comparada com o *mdx* é menor, indicando que o *mdx* pudesse ter maior quantidade de material colagênico. A coloração com picrosírius demonstrou maior grau aparente de agregação dos feixes de colágeno no *mdx*. No entanto, não significa que ele obrigatoriamente tenha um tendão mais forte, pois as propriedades mecânicas do tendão não dependem somente da quantidade ou agregação de colágeno, mas também da distribuição e organização dos feixes de colágeno. Deste modo, podemos considerar que a ausência da distrofina prejudica a funcionalidade dos tendões *mdx*, independentemente de ocorrer comprometimento das fibras musculares. Finalmente, concluímos que a ausência da distrofina em camundongos *mdx* promove alteração da resistência mecânica do tendão calcâneo.

Introdução

O tendão é uma forma especializada de tecido conjuntivo fibroso denso, consistindo de fibras colágenas altamente orientadas que transmitem a força mecânica da contração muscular ao osso (Kannus, 2000). Quando saudáveis, os tendões apresentam textura fibroelástica, demonstrando grande resistência às cargas mecânicas (Kannus, 2000) e capacidade de retornar a sua forma original após ser tracionado (Hayem, 2001). Mudanças quantitativas e qualitativas nos componentes da matriz extracelular dos tendões ocorrem em função do envelhecimento, da prática de atividades físicas (Kannus, 2000; Nakagaki et al., 2007; Nakagaki et al., 2010; Marqueti et al., 2010) e de patologias específicas (Rizzuto et al., 2009; Beason et al., 2011; Fox et al., 2011), como variações no conteúdo de colágeno (Nakagaki et al., 2007; Nakagaki et al., 2010) ou na quantidade de *cross-links* entre as moléculas de colágeno (Tuite et al., 1997).

Os tendões são estruturas afetadas em portadores de distrofia muscular e o desenvolvimento de contraturas simultaneamente ao aumento da fraqueza muscular, especialmente do tendão calcâneo (Aquiles), contribui para o aumento da quantidade de quedas, perda definitiva da deambulação e contratura articular (Vignos et al., 1996; Forst and Forst, 1999; Moxley III, 2006). Muitos regimes de tratamento têm sido estudados e empregados para evitar a perda precoce da deambulação (Vignos et al., 1996; Aparicio et al., 2002; Moxley III, 2006). A combinação de fisioterapia (alongamento e cinesioterapia), órtese de joelho-tornozelo-pé e técnicas cirúrgicas de liberação e transferência de tendões (Vignos et al., 1996) têm sido empregadas para melhorar a qualidade de vida dos portadores de distrofia muscular e amenizar os problemas ortopédicos (Moxley III, 2006).

A forma mais comum e severa das distrofias musculares nos humanos é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). Esta se deve a mutação do gene localizado na banda Xp21 do cromossomo X que codifica a proteína distrofina, essencial para a manutenção da integridade das células musculares cardíacas e esqueléticas (Cohn & Campbell, 2000; Lovering et al., 2005).

O camundongo *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) representa um modelo animal clássico utilizado para o estudo da DMD (Lovering et al., 2005; Vainzof et al., 2008). Tal como no humano com DMD, os camundongos *mdx* apresentam mutação genética resultando na ausência da distrofina e demonstrando degeneração e processo inflamatório intenso no músculo (Biggar et al., 2002; Lovering et al., 2005; Vainzof et al., 2008). Rizzuto e colaboradores (2009) investigaram a relação entre músculos com sua funcionalidade comprometida e as propriedades mecânicas de seus tendões de camundongos *mdx*. Eles observaram que o tendão tibial anterior e o tendão extensor digital longo de camundongos *mdx* com 14-18 semanas de idade apresentavam uma redução de sua elasticidade e um aumento no número de células mortas em relação aos camundongos normais.

Nos músculos distróficos de camundongos *mdx*, os ciclos de degeneração e regeneração se iniciam de forma mais intensa aproximadamente aos 21 dias de vida do animal (McGeachie et al., 1993; Pastoret & Sebille, 1995; Porter et al., 2003; Briguet et al., 2004; Grounds and Torrisi, 2004; Reed and Bloch, 2005; Nakagaki et al., 2011). Nesta idade, Nakagaki e colaboradores (2011) demonstraram alterações mecânicas, morfológicas e bioquímicas no fêmur de camundongos *mdx* mesmo na ausência de sinais de degeneração das fibras do músculo quadríceps e concluíram que o tecido ósseo pode conter um distúrbio

interligado a algum fator genético, diretamente ou não relacionado com a ausência de distrofina. Além disso, Aoyagi e colaboradores (1981) encontraram alterações metabólicas em diferentes tecidos de camundongos distróficos com 7 semanas de idade e sugeriram que a pesquisa terapêutica deveria focalizar suas metas não somente para os músculos, mas também para outros tecidos. Neste contexto, levantamos a hipótese de que possam também existir alterações no tendão calcâneo de camundongos *mdx* mesmo antes dos ciclos mais intensos de degeneração e regeneração das fibras musculares. Com base nestas evidências, o objetivo deste trabalho foi identificar possíveis alterações no tendão calcâneo de camundongos *mdx* aos 21 dias de vida.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Camundongos machos C57BL/10-ScCr ($n = 12$; grupo controle) e C57BL/10-Dmd^{mdx} ($n = 12$; grupo *mdx*) com 21 dias de vida foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram pesados e sacrificados com dose excessiva (0.50ml/100g) de Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilazina (1:1) e o tendão calcâneo foi removido. O experimento com animais foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNICAMP), certificado com protocolo número 1359-1.

2. Ensaio Biomecânico

O tendão calcâneo, os músculos gastrocnêmio e sóleo e a pata foram retirados em conjunto, como uma peça única (figura 1A). Doze tendões de cada grupo foram utilizados para o ensaio mecânico e mantidos em solução fisiológica até o momento do teste para evitar o ressecamento das fibras. Os tendões foram fixados em garras metálicas (superior e inferior) de acordo com o método de Probst e colaboradores (2000). As porções com músculos e junção miotendinosa foram colocados entre uma folha de papel absorvente (figura 1B), que foi posteriormente dobrada e presa no dispositivo de fixação (figura 1C). A pata do animal foi encaixada em um *slot* de formato cônico previamente moldado em um bloco retangular de metilmetacrilato (figura 1A e 1E). Em seguida, ambas as extremidades do tendão foram fixadas em garras (figura 1D), sendo que a distância entre as mesmas foi de 5 mm. Cada tendão foi submetido a um pré-condicionamento com 10 ciclos de carregamento-descarregamento de 0 a 0,5 mm (Toyama & Yasuda, 2000) a 6 mm/mim. Na seqüência, foi realizado o teste de tração uniaxial no qual os tendões foram submetidos a um aumento gradual de carga em uma velocidade constante de 6 mm/min até a ruptura completa (Probst et al., 2000). Os dados de força e deslocamento foram registrados e armazenados em um computador acoplado à máquina de ensaio mecânico. A força e o deslocamento no limite elástico foram obtidos no ponto da curva força-deslocamento, denominado de limite elástico. Este ponto foi determinado através da elaboração da equação da reta do trecho linear da fase elástica. Desta equação da reta, onde *y* é a variável que representa a força e *x* a variável que representa o deslocamento, foram determinadas novos deslocamentos acrescidos de 0,2% para as forças. Assim, para cada força (*y*) um novo deslocamento (*x'*) foi determinado (Turner & Burr, 1993). Através destes dados

foram determinadas as propriedades materiais (tensão no limite elástico, tensão máxima, deformação no limite elástico, deformação na tensão máxima e módulo elástico) do tendão calcâneo, de acordo com o estudo de Gupte e colaboradores (2002). A tensão máxima (σ) foi obtida da razão entre força (N) e área de secção transversal (CSA) (mm^2) e dada em MPa. A CSA foi determinada de acordo com o estudo de Goodship & Birch (2005). De cada tendão foi feito um molde da CSA com pasta de impressão dental de alginata. Este molde foi cortado transversalmente e fotografado, sendo sua imagem analisada no *software NIS-Elements: Advanced Research* (USA). A deformação relativa (ε) foi calculada de acordo com a fórmula $\varepsilon = \Delta L/L_0$, onde $\Delta L = L - L_0$ (L =comprimento final e L_0 = comprimento inicial). O módulo elástico (E) que indica a rigidez do tendão foi obtido da inclinação da porção mais linear da curva de tensão-deformação. Os testes foram realizados em máquina servo-hidráulica MTS, modelo TESTSTAR II, no Laboratório de Propriedades Mecânicas da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP.

3. Quantificação de hidroxiprolina

A determinação do conteúdo de hidroxiprolina, que é uma estimativa da concentração de colágeno, foi baseada em Stegemann and Stalder (1967). Os tendões ($n = 5$, por grupo) foram hidrolisados em HCl 6N (1mL/10mg de tecido) por 16h a 107°C. Do material hidrolisado, foi utilizado 5 μL para cada leitura, sendo acrescentado 1mL de solução de clorammina-T posteriormente. Após 20min foi adicionado 1mL de solução de ácido aldeído perclórico e o material foi mantido em incubação por 15min a 60°C, resfriado até 20°C e lido em espectrofotômetro, $\lambda = 550\text{nm}$.

4. Análise morfológica

Após a dissecção, os tendões calcâneos foram fixados em solução de formol 4% em tampão Millonig pH 7,4 durante 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida as peças foram lavadas em água, desidratadas em banhos de álcool, seguido de diafanização com banhos de xanol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes longitudinais com 7 µm de espessura.

4.1. Coloração com Picrosírius Red e Azul de Toluidina

Para observação das fibras de colágeno foi usada a coloração com Picrosírius Red. Os cortes foram desparafinizados, corados por 1 hora com picrosírius, lavados em água corrente (3 minutos), corados com hematoxilina por 30 segundos, lavados em água corrente (10 minutos), desidratados, clareados e, por fim, foi feita a montagem das lâminas. Para detecção de proteoglicanos foi utilizada a coloração com Azul de Toluidina (0,025 % em tampão Mc Ilvaine pH 4.0). Os cortes foram desparafinizadas e hidratados, corados por 30 minutos, posteriormente lavados no próprio tampão e deixados para secar ao ar. Em seguida, foram mergulhadas rapidamente em xanol e as lâminas montadas com Entellan® (Merck).

5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste-t de *Student* para comparar duas amostras independentes. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância ($p < 0,05$).

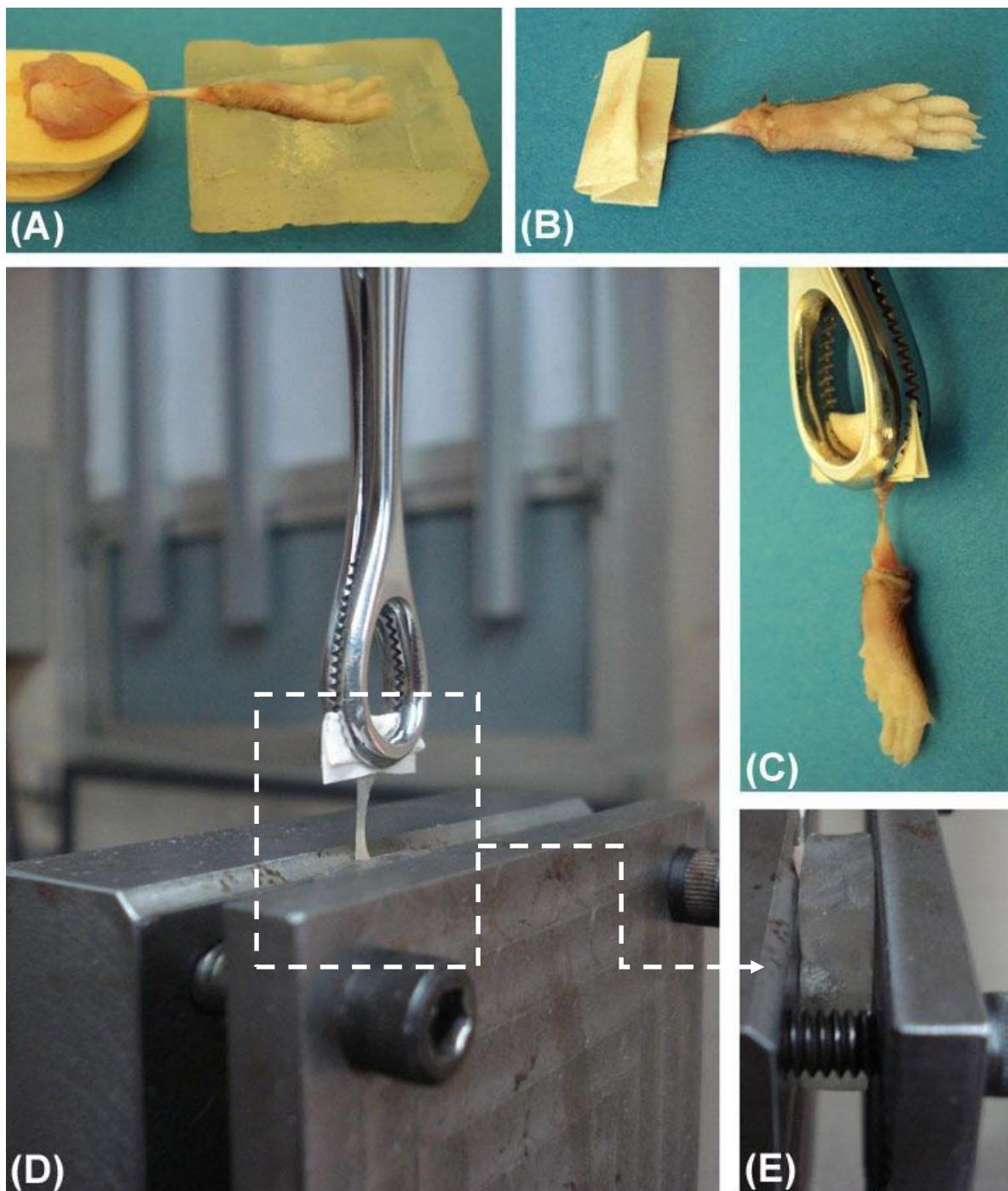


Figura 1. Preparação do tendão calcâneo para fixação na máquina de teste de tração axial. (A) Músculos, tendão e pata como uma peça única. (B) Porções com músculos e junção miotendinosa foram colocados entre uma folha de papel absorvente e (C) presa no dispositivo de fixação. (D) Fixação das extremidades do tendão em garras. (A e E) Pata do animal encaixada em bloco de metilmetacrilato.

RESULTADOS

O peso corporal dos animais, em gramas, do grupo controle ($11,24 \pm 0,68$) não apresentou diferença significativa com o grupo *mdx* ($10,51 \pm 1,21$) (dados não mostrados em tabela).

A análise do teste mecânico demonstrou que os tendões calcâneos dos camundongos *mdx* foram menos resistentes à tração uniaxial. Embora tenham apresentado as mesmas taxas de deslocamento e deformação, os valores de força e de tensão foram maiores no grupo controle, em torno de 18-20%, tanto no ponto do limite elástico quanto no ponto máximo. O módulo elástico também foi menor no grupo *mdx* (tabela 1).

Propriedades	<i>mdx</i>	Controle	<i>p</i>
a) Força no limite elástico (N)	$2,11 \pm 0,33$	$2,49 \pm 0,37$	0,0205
b) Deslocamento no limite elástico (mm)	$0,74 \pm 0,28$	$0,76 \pm 0,18$	<i>ns</i>
c) Força máxima (N)	$2,96 \pm 0,53$	$3,54 \pm 0,67$	0,0368
d) Deslocamento na força máxima(mm)	$1,30 \pm 0,38$	$1,28 \pm 0,42$	<i>ns</i>
e) Tensão no limite elástico (MPa)	$4,15 \pm 0,86$	$4,95 \pm 0,83$	0,0392
f) Deformação no limite elástico (%)	$14,98 \pm 5,64$	$15,30 \pm 3,71$	<i>ns</i>
g) Tensão máxima (MPa)	$5,77 \pm 1,05$	$6,98 \pm 1,13$	0,0175
h) Deformação na tensão máxima (%)	$26,07 \pm 7,63$	$25,79 \pm 8,45$	<i>ns</i>
i) Módulo elástico (MPa)	$33,32 \pm 5,75$	$41,90 \pm 7,99$	0,0084
j) Área de secção transversal (mm ²)	$0,519 \pm 0,08$	$0,508 \pm 0,06$	<i>ns</i>

Tabela 1. Propriedades estruturais (a-d), materiais (e-i) e geométrica (j) do tendão calcâneo dos grupos *mdx* (n = 12) e controle (n = 12). A sigla *ns* indica que não houve diferença estatisticamente significativa.

A quantificação de hidroxiprolina dos tendões calcâneo não demonstrou diferença estatística entre os dois grupos (figura 2), embora o conteúdo de hidroxiprolina dos tendões do grupo *mdx* tivesse sido numericamente maior do que o do grupo controle.

Nos tendões controle corados com azul de toluidina (AT) foram observadas a presença de células arredondadas, núcleo com cromatina bem descondensada e material citoplasmático bem corado, ligeiramente metacromático. A metacromasia observada no citoplasma pode indicar síntese de pequenos proteoglicanos (figura 3B). A região da matriz extracelular do tendão controle comparada com a do *mdx* é menor, indicando que o *mdx* provavelmente tem maior quantidade de material colagênico (figura 3A-B). Nos tendões *mdx* há muitas células alongadas, com aspecto típico de fibrócitos, núcleo com cromatina fortemente compactada e citoplasma pouco corado. Em algumas células, contudo, a cromatina parece fracamente corado, o citoplasma é fortemente corado, indicando atividade sintética. Nos casos em que o citoplasma aparece bem corado, pouco metacromático, provavelmente não está ocorrendo síntese de proteoglicanos, mas sim de colágeno. Por sua vez, a matriz que está sem nenhuma coloração com AT se mostra bem abundante (figura 3A).

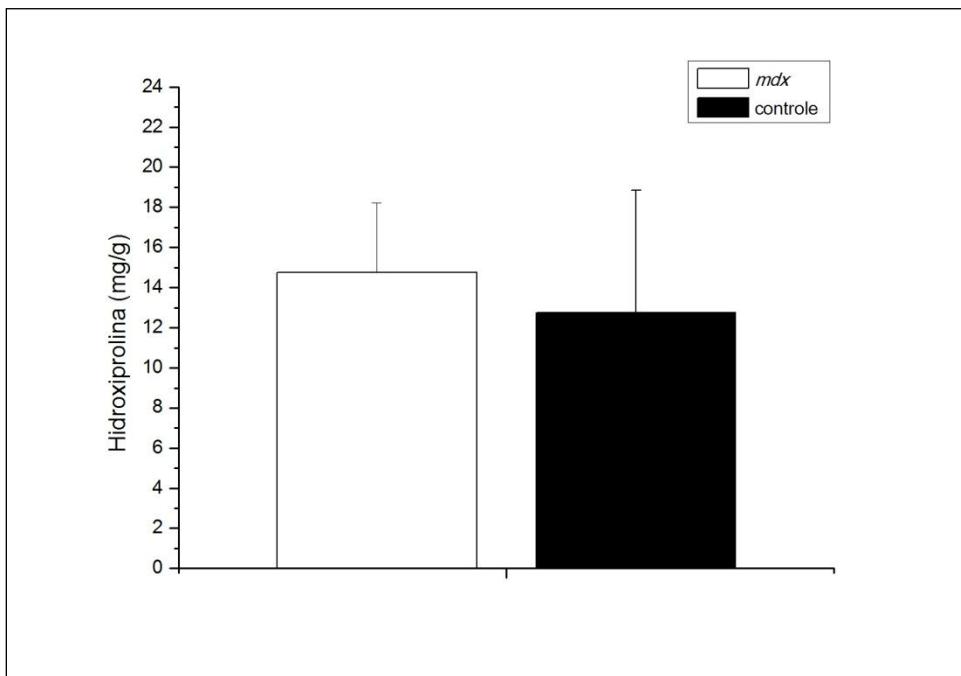


Figura 2. Quantificação de hidroxiprolina (peso úmido) do tendão calcâneo de camundongos do grupo controle ($n = 5$) e *mdx* ($n = 5$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Comparando tendões controle com *mdx* corados com picrosírius se nota matriz fibrilar menos corada e também com menor grau de agregação dos feixes de colágeno nos tendões controle, confirmando o que se viu em cortes corados com AT. A contra-coloração com hematoxilina nos cortes do tendão controle mostrou que nestes é visível o grande número de fibroblastos com núcleo arredondado, diferentemente do observado no *mdx* (figura 4 A-B).

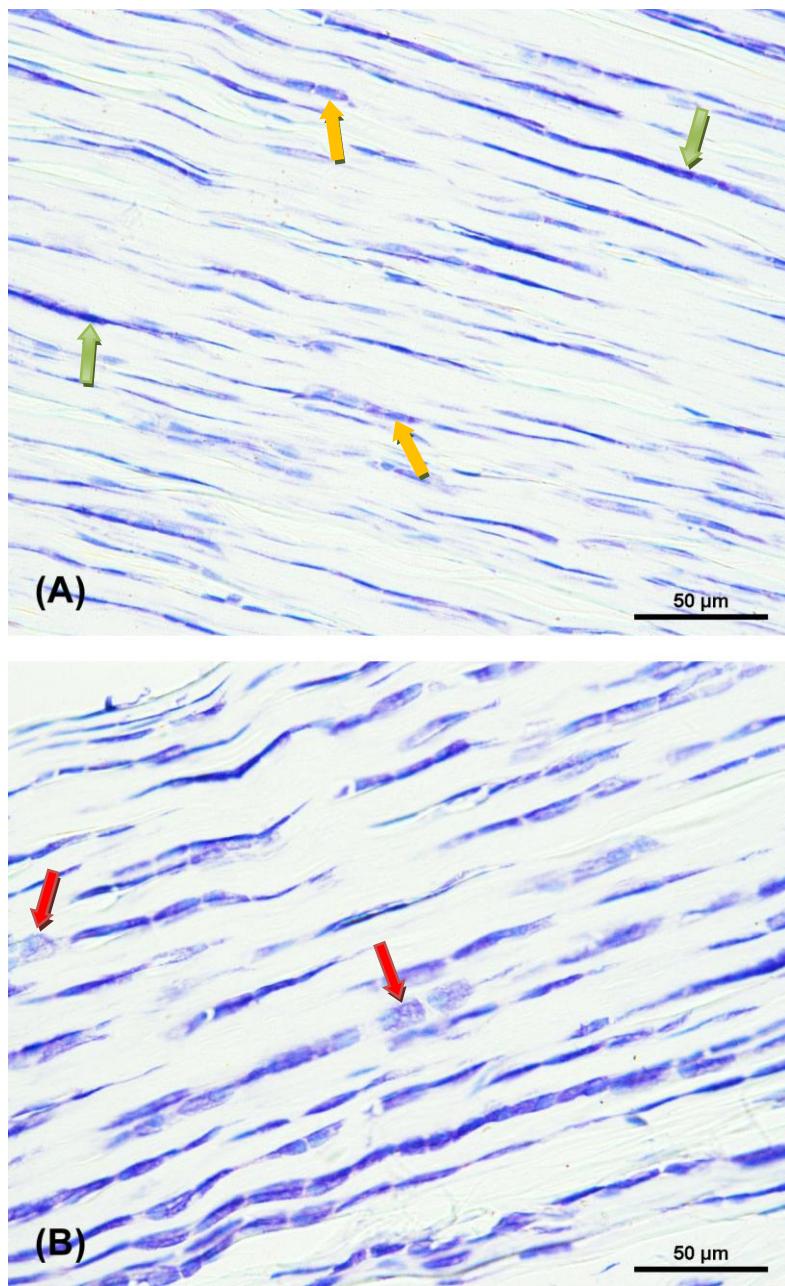


Figura 3. Cortes longitudinais dos tendões calcâneo dos grupos *mdx* (A) e controle (B), corados com azul de toluidina e observados ao microscópio óptico comum. Em (A) se nota predomínio de células alongadas, núcleos com cromatina fortemente compactada e citoplasma pouco corado (seta verde), mas também há algumas células onde a cromatina aparece fracamente corada enquanto o citoplasma aparece fortemente corado, mas pouco metacromático (seta amarela). Em (B) se observa a presença de células arredondadas, com núcleo com cromatina bem descondensada e material citoplasmático bem corado, ligeiramente metacromático (seta vermelha).

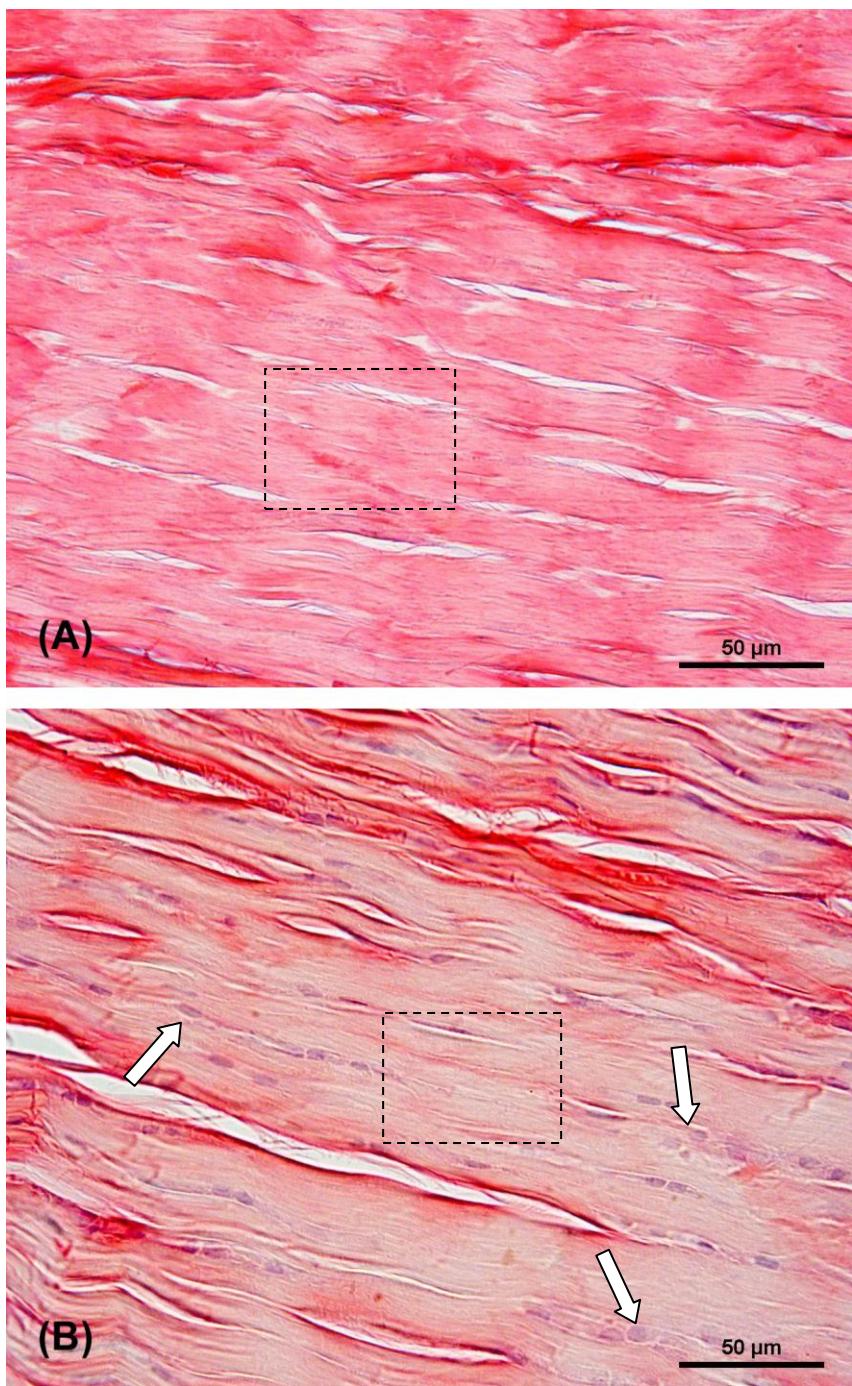


Figura 4. Cortes longitudinais dos tendões calcâneo dos grupos *mdx* (A) e controle (B), corados com picrosírius red e observados ao microscópio óptico comum. Em (A) se observa matriz fibrilar bem corada e com aparente maior grau de agregação dos feixes de colágeno (retângulo tracejado) quando comparada com (B), onde há grande número de fibroblastos com núcleo arredondado (seta branca).

DISCUSSÃO

Em camundongos *mdx* a falta da proteína distrofina torna o sarcolema frágil e suscetível à instabilidade, favorecendo a necrose da fibra muscular (Grounds and Torrisi, 2004; Lovering et al., 2005). Enquanto os eventos patogênicos oriundos da ausência desta proteína têm sido bem documentados no músculo esquelético do camundongo *mdx*, pouco se sabe sobre potenciais alterações nos tendões destes animais distróficos. Deste modo, nós estudamos de modo comparativo as propriedades biomecânicas e morfológicas do tendão calcâneo de camundongos *mdx* com 21 dias de idade.

Além da contração muscular, a transmissão de forças no tendão se deve a ação da gravidade e, consequentemente, do peso corporal (Lin et al, 2005). Como camundongos *mdx* não possuem degeneração significativa das fibras musculares aos 21 dias de vida e não foi encontrada diferença entre os pesos dos animais de ambos os grupos, pode-se concluir que a tensão no tendão calcâneo do camundongo *mdx* não sofreu influência nem do peso do animal nem da atividade muscular.

Qualquer alteração no ambiente homeostático desequilibra a integridade microestrutural da matriz extracelular do tendão (Fox et al., 2011). A resistência mecânica do tendão é altamente dependente de *cross-links* intra e intermoleculares, orientação e comprimento das fibrilas de colágeno (Maffulli et al, 2003; Lin et al, 2005). Além disto, um alto conteúdo de colágeno por unidade de área ou diâmetro maior das fibrilas de colágeno pode indicar que o tendão tem maior módulo elástico (Woo et al., 1999). Os tendões *mdx* não demonstraram diferença estatisticamente significante no conteúdo de hidroxiprolina em relação ao grupo controle, mas apresentaram força, tensão e módulo elástico menores. Então, podemos sugerir que tendões *mdx* mostraram um déficit ou na quantidade de *cross-*

links ou no diâmetro ou na organização das fibrilas de colágeno. De modo semelhante, Hansen e colaboradores (2009) constataram que a formação induzida de *cross-links* pelo glutaraldeído aumentou a resistência mecânica e o módulo elástico das fibrilas de colágeno de tendões da cauda de ratos.

No presente estudo o maior grau aparente de agregação dos feixes de colágeno observado no tendão *mdx* não significa que ele obrigatoriamente deva ser um tendão mais resistente do que o tendão controle, pois as propriedades mecânicas do tendão não dependem somente da quantidade ou agregação de colágeno, mas principalmente da distribuição e organização dos feixes de colágeno (Pins et al., 1997). Os aspectos morfológicos obtidos da coloração com picrosírius corroboram com os da coloração com AT, demonstrando matriz mais abundante com maior quantidade de material colagênico, confirmando os dados de hidroxiprolina.

Proteoglicanos consistem de um esqueleto protéico central contendo pelo menos uma cadeia de glicosaminoglicanos ligados covalentemente e exercem um importante papel na fibrilogênese do colágeno. Estudos demonstraram que os pequenos proteoglicanos como decorim, lumatic e fibromodulim regulam a formação, organização e maturação das fibrilas de colágeno (Birk et al., 1995; Ezura et al., 2000; Keene et al., 2000). O decorim regula a montagem correta das fibrilas de colágeno (empacotamaneto e ligação lateral entre as fibrilas, por exemplo) assegurando a eficiência da resistência mecânica do tendão (Zhang et al., 2006). Pins e colaboradores (1997) relataram que o decorim ligado à fibrila de colágeno promove um aumento da resistência à tração e um melhor alinhamento das fibrilas durante o alongamento. No presente estudo, os tendões do grupo controle apresentaram fibroblastos mais arredondados com material citoplasmático ligeiramente

metacromático em relação aos do grupo *mdx*. Isto pode sugerir que ocorreu maior síntese de proteoglicanos, como o decorim, nos tendões de camundongos controle.

O estudo de Rizzutto e colaboradores (2009) demonstrou que há alteração na *performance* dos tendões de camundongos *mdx*, sugerindo um papel da proteína distrofina na atividade morfológica no tecido conjuntivo ou, alternativamente, um efeito parácrino dos danos musculares nos tendões. De acordo com a literatura, camundongos *mdx* com 21 dias de vida não apresentam degeneração muscular intensa e significante (McGeachie et al., 1993; Pastoret & Sebille, 1995; Porter et al., 2003; Briguet et al., 2004; Grounds and Torrisi, 2004; Reed and Bloch, 2005; Nakagaki et al., 2011). Deste modo, podemos considerar que a ausência da distrofina prejudica a funcionalidade dos tendões *mdx*, independentemente de ocorrer comprometimento das fibras musculares. Finalmente, concluímos que a ausência da distrofina em camundongos *mdx* promove alteração da resistência mecânica do tendão calcâneo.

AGRADECIMENTOS

Wilson Romero Nakagaki recebeu bolsa de doutorado inicialmente da CAPES/PROEX e posteriormente da FAPESP (2007/07638-0).

REFERÊNCIAS

- Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Umezawa, H. 1981. Various enzyme activities in muscle and other organs of dystrophic mice. *J Clin Invest*, 67: 51-59.
- Aparicio, L.F., Jurkovic, M., DeLullo, J. 2002. Decreased bone density in ambulatory patients with duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*, 22: 179-181.

- Banos, C.C., Thomas, A.H., Kuo, C.K. 2008. Collagen fibrillogenesis in tendon development: current models and regulation of fibril assembly. Birth Defects Res C Embryo Today, 84: 228-44.
- Beason, D.P., Abboud, J.A., Kuntz, A.F., Bassora, R., Soslowsky, L.J. 2011. Cumulative effects of hypercholesterolemia on tendon biomechanics in a mouse model. J Orthop Res, 29:380-3.
- Biggar, W.D., Klamut, H.J., Demacio, P.C., Stevens, D.J., Ray, P.N. 2002. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. Clinical Orthopaedics and Related Research, 401: 88-106.
- Birk, D.E., Nurminskaya, M.V., and Zycband, E.I. 1995. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments undergo post-depositional modifications resulting in linear and lateral growth during matrix development. Dev Dyn, 202: 229-243.
- Briguet, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., Meier, T., Magyar, J.P. 2004. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. Neuromuscul Disord, 14: 675-82.
- Cohn, R.D.E., Campbell, K.P. 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. Muscle & Nerve, 23: 1456-1471.
- Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I., and Birk, D.E. 2000. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. J Cell Biol, 151: 779-788.
- Forst, J., Forst, R. 1999. Lower limb surgery in Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord, 9: 176-181.

- Fox, A.J., Bedi, A., Deng, X.H., Ying, L., Harris, P.E., Warren, R.F., Rodeo, S.A. 2011. Diabetes mellitus alters the mechanical properties of the native tendon in an experimental rat model. *J Orthop Res*, DOI: 10.1002/jor.21327.
- Goodship AE, Birch HL. 2005. Cross sectional area measurement of tendon and ligament in vitro: a simple, rapid, non-destructive technique. *J Biomech*, 38: 605-8.
- Grounds, M.D., Torrisi, J. 2004. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB J*, 18: 676-82.
- Gupte, C.M., Smith, A., Jamieson, N., Bull, A.M.J., Thomas, R.De.W., Amis, A.A. 2002. Meniscofemoral ligaments – structural and material properties. *J Biomech*, 35: 1623-1629.
- Hansen, P., Hassenkam, T., Svensson, R.B., Aagaard, P., Trappe, T., Haraldsson, B.T., Kjaer, M., Magnusson, P. 2009. Glutaraldehyde cross-linking of tendon--mechanical effects at the level of the tendon fascicle and fibril. *Connect Tissue Res*, 50: 211-22.
- Hayem, G. 2001. Tenology: a new frontier. *Joint Bone Spine*, 68: 19-25.
- Keene, D.R., San Antonio, J.D., Mayne, R., McQuillan, D.J., Sarris, G., Santoro, S.A., Iozzo, R.V. 2000. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem*, 275: 21801-21804.
- Lin, Y.L., P.A.J. Brama, G.H. Kiers, P.R. van Weeren, J. DeGroot. 2005. Extracellular matrix composition of the equine superficial digital flexor tendon: relationship with age and anatomical site. *J Vet Med A*, 52: 333-338.
- Lovering, R.M., Porter, N.C., Bloch, R.J. 2005. The muscular dystrophies: from genes to therapies. *Physical Therapy*, 85: 1372-1388.

- Kannus, P. 2000. Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports, 10: 312-320.
- Maffulli, N., Wong, J., Almekinders, L.C. 2003. Types and epidemiology of tendons. Clin Sports Med, 22: 675–692.
- Marqueti, R.C., Prestes, J., Wang, C.C., Ramos, O.H., Perez, S.E., Nakagaki, W.R., Carvalho, H.F., Selistre-de-Araujo, H.S. 2010. Biomechanical responses of different rat tendons to nandrolone decanoate and load exercise. Scand J Med Sci Sports, DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01162.x>.
- McGeachie, J.K., Grounds, M.D., Partridge, T.A., Morgan, J.E. 1993. Age-related changes in replication of myogenic cells in *mdx* mice: quantitative autoradiographic studies. J Neurol Sci, 119:169-79.
- Moxley III, R.T. 2006. Clinical Overview of Duchenne Muscular Dystrophy. In: Duchenne muscular dystrophy: advances in therapeutics. Eds: Chamberlain, JS, Rando, TA, pp. 1-20.
- Nakagaki, W.R., Biancalana, A., Benevides, G.P., Gomes, L. 2007. Biomechanical and biochemical properties of chicken calcaneal tendon under effect of age and nonforced active exercise. Connect Tissue Res, 48: 219-28.
- Nakagaki, W.R., Pimentel, E.R., Benevides, G.P., Gomes, L. 2010. The effect of age and spontaneous exercise on the biomechanical and biochemical properties of chicken superficial digital flexor tendon. Connect Tissue Res, 51: 265-73.
- Nakagaki, W.R., Bertran, C.A., Matsumura, C.Y., Santo-Neto, H., Camilli, J.A. 2011. Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of *mdx* mice. Bone, 48: 372-79.

- Pastoret, C., Sebille, A. 1995. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of Neurological Science*, 129: 97-105.
- Pins, G.D., Christiansen, D.L., Patel, R., Silver, F.H. 1997. Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophys J*, 73: 2164-72.
- Porter, J.D., Merriam, A.P., Leahy, P., Gong, B., Khanna, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (*mdx*) mice. *Hum Mol Genet* 2003;12: 1813-21.
- Probst, A., Palmes, D., Freise, H., Langer, M., Joist, A., Spiegel, H.U. 2000. A new clamping technique for biomechanical testing of tendons in small animals. *J Invest Surg*, 13: 313–318.
- Reed, P., Bloch, R.J. 2005. Postnatal changes in sarcolemmal organization in the *mdx* mouse. *Neuromuscul Disord*, 15: 552-61.
- Rizzuto, E., Musarò, A., Catizone, A., Del Prete, Z. 2009. Measuring tendon properties in *mdx* mice: cell viability and viscoelastic characteristics. *J Biomech*, 42: 2243-8.
- Stegemann, H., Stalder, K. 1967. Determination of hydroxyproline. *Clin. Chim. Acta*, 18: 267-273.
- Tohyama, H., Yasuda, K. 2000. The effects of stress enhancement on the extracellular matrix and fibroblasts in the patellar tendon. *J Biomech*, 33: 559-565.
- Turner, C.H., Burr, D.B. 1993. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 14: 595-608.
- Tuite, D.J., Renström, P.A., O'Brien, M. 1997. The aging tendon. *Scand J Med Sci Sports*, 7: 72-77.

- 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. 2008. Animal Models for Genetic Neuromuscular Diseases. *J Mol Neurosci*, 34: 241–248.
- Vignos, P.J. Jr, Wagner, M.B., Karlinchak, B., Katirji, B. 1996. Evaluation of a program for long-term treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Bone Joint Surg Am*, 78: 1844-1852.
- Woo, S.L., Debski, R.E., Withrow, J.D., Janaushek, M.A. 1999. Biomechanics of knee ligaments. *Am J Sports Med*, 27: 533-43.
- Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P.S., Beason, D.P., Carine, E.T., Soslowsky, L.J., Iozzo, R.V., Birk, D.E. 2006. Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J Cell Biochem*, 98: 1436-49.

CONCLUSÕES

- 1) A diminuição da resistência mecânica e o menor conteúdo mineral e celular do fêmur do grupo *mdx* ocorreram porque há prejuízo da mineralização e provavelmente da organização das moléculas da matriz extracelular, principalmente do colágeno. Estas alterações encontradas no fêmur dos camundongos *mdx* com 21 dias de idade, anteriormente aos ciclos mais intensos de degeneração/regeneração muscular, demonstraram a existência de um distúrbio no tecido ósseo relacionado com algum fator genético que pode estar direta ou indiretamente associado à ausência de distrofina. Deste modo, o comprometimento ósseo não ocorre somente em função da diminuição de estímulo mecânico oriundo do dano muscular.
- 2) A similaridade encontrada na taxa de regeneração do osso da calvária entre camundongos *mdx* e controle sugere a existência de um mecanismo de compensação no camundongo *mdx* diante de um comprometimento do tecido ósseo decorrente de uma alteração genética ainda desconhecida. Esta resposta adaptativa possivelmente ocorre por meio da ação dos fatores osteogênicos liberados de miofibras injuriadas.

ANEXOS

- I. Direitos de autores que publicaram em revista da Elsevier (*Authors' Rights*).
- II. Declaração do Comitê de Ética

ELSEVIER

- [Home](#)
- [Products](#)
- [User Resources](#)
- [About Us](#)
- [Support & Contact](#)
- [Elsevier Websites](#)

Search
[Advanced Product Search](#)

0

For Authors

- [Journal authors' home](#)
- [Why publish with Elsevier](#)
- [Resource center](#)
- [Guide to publishing with Elsevier](#)
- [Funding body agreements/policies](#)
- [Authors' rights](#)
- [Track your accepted article](#)
- [FAQ](#)
- [Book authors' home](#)
- [Permissions](#)

Products

- ▶ [Support & contact](#)
- ▶ [About Elsevier](#)
- ▶ [User Resources](#)

Authors' Rights

Copyright
 Intellectual property, in particular, copyright (rights in editorial content), trademarks (rights in brands for services or journals), and database rights (rights in compilations of information), form the foundation of Elsevier's publishing services and communications businesses. Elsevier embraces the opportunities the digital environment offers for communication and access, while at the same time recognizing the new risks that this environment poses: the ease with which unauthorized copies can be made and distributed worldwide.

Our Objective
 We aim to manage digital rights and brands amidst the structural changes that the "information society" represents, while at the same time recognizing the shared goals we have with our customers and authors. These include providing the widest possible distribution of scientific and medical content and services in a financially sustainable business model.

Elsevier wants to ensure a proper balance between the scholarly rights which authors retain (or are granted/transferred back in some cases) and the rights granted to Elsevier that are necessary to support our mix of business models. We routinely analyze and modify our policies to ensure we are responding to authors' needs and concerns, and the concerns generally of the research and scholarly communities.

What rights do you retain as a journal author?
***Commercial purposes and systematic distribution**
When Elsevier changes its journal usage policies, are those changes also retroactive?
How do I obtain a Journal Publishing Agreement?
Why does Elsevier request transfer of copyright?
Can you provide me with a PDF file of my article?
Authors' Responsibilities
Obtaining permissions
What rights do you retain as a journal author?

As a journal author, you retain rights for a large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from Elsevier. These include:

- the right to make copies (print or electronic) of the journal article for your own personal use, including for your own classroom teaching use;
- the right to make copies and distribute copies (including via e-mail) of the journal article to research colleagues, for personal use by such colleagues for scholarly purposes*;
- the right to post a pre-print version of the journal article on Internet web sites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites for scholarly purposes* (with some exceptions such as The Lancet and Cell Press. See also our information on electronic preprints for a more detailed discussion on these points)*;
- the right to post a revised personal version of the text of the final journal article (to reflect changes made in the peer review process) on your personal or institutional web site or server for scholarly purposes*, incorporating the complete citation and with a link to the Digital Object Identifier (DOI) of the article (but not in subject-oriented or centralized repositories or institutional repositories with mandates for systematic postings unless there is a specific agreement with the publisher- see www.elsevier.com/fundingbody agreements for further information);
- the right to present the journal article at a meeting or conference and to distribute copies of such paper or article to the delegates attending the meeting;
- for your employer, if the journal article is a 'work for hire', made within the scope of the author's employment, the right to use all or part of the information in (any version of) the journal article for other intra-company use (e.g. training);
 - patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the journal article;
 - the right to include the journal article, in full or in part, in a thesis or dissertation;
 - the right to use the journal article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of the article in the journal); and
 - the right to prepare other derivative works, to extend the journal article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.

*Commercial purposes and systematic distribution

Authors of Elsevier-published articles may use them only for scholarly purposes as set out above and may not use or post them for commercial purposes or under policies or other mechanisms designed to aggregate and openly disseminate manuscripts or articles or to substitute for journal-provided services. This includes the use or posting of articles for commercial gain or to substitute for the services provided directly by the journal including the posting by companies of their employee-authored works for use by customers of such companies (e.g. pharmaceutical companies and physician-prescribers); commercial exploitation such as directly associating advertising with such postings; the charging of fees for document delivery or access; the systematic distribution to others via e-mail lists or list servers (to parties other than known colleagues), whether for a fee or for free; the posting of links to sponsored articles by commercial third parties including pharmaceutical companies; institutional, funding body or government manuscript posting policies or mandates that aim to aggregate and openly distribute the accepted, peer reviewed manuscripts or published journal articles authored by its researchers or funded

researchers; and subject repositories that aim to aggregate and openly distribute accepted peer reviewed manuscripts or published journal articles authored by researchers in specific subject areas.

For a more detailed discussion of our article posting policies and the different stages of a journal article development that are relevant from a policy perspective, please see  [posting policies information page](#).

When Elsevier changes its journal usage policies, are those changes also retroactive?

When Elsevier changes its policies to enable greater academic use of journal materials (such as the changes several years ago in our web-posting policies) or to clarify the rights retained by journal authors, Elsevier is usually prepared to extend those rights retroactively with respect to articles published in journal issues produced prior to the policy change. Elsevier is pleased to confirm that, unless explicitly noted to the contrary, all policies apply retrospectively to previously published journal content. If, after reviewing the material noted above, you have any questions about such rights, please contact [Global Rights](#).

How do I obtain a Journal Publishing Agreement?

You will receive a form automatically by post or email once your article is received by Elsevier's Editorial-Production Department. View a generic example of the agreement here. Some journals will use another variation of this form.

Why does Elsevier request transfer of copyright?

The research community needs certainty with respect to the validity of scientific papers, which is normally obtained through the editing and peer review processes. The scientific record must be clear and unambiguous. Elsevier believes that, by obtaining copyright transfer, it will always be clear to researchers that when they access an Elsevier site to review a paper, they are reading a final version of the paper which has been edited, peer-reviewed and accepted for publication in an appropriate journal. This eliminates any ambiguity or uncertainty about Elsevier's ability to distribute, sub-license and protect the article from unauthorized copying, unauthorized distribution, and plagiarism.

Can you provide me with a PDF file of my article?

Many Elsevier journals are now offering authors e-offprints – free electronic versions of published articles. E-offprints are watermarked PDF versions, and are usually delivered within 24 hours, much quicker than print copies. These PDFs may not be posted to public websites. For more information, please see your Journal's Guide to Authors or contact sciencereprints@elsevier.com.

Authors' Responsibilities

Authors will also need to know about their responsibilities within publishing:

- What is Elsevier's policy on [Conflicts of Interest](#)?
- [Under what circumstances must i disclose information](#) about my working relationships?
- What is my role of [my Funding Source](#)?
- What information is available [about Ethics in Publishing](#)?
- What is Elsevier's policy on [using patient photographs](#)?
- Are articles ever [withdrawn from Elsevier publications or database](#)?

Obtaining permissions

As an author, you may wish to use references you have found in other publications. Conversely, you may be seeking information on using an Elsevier-published work as a reference. The information you seek can be found on the links below:

- If you are an Elsevier-author and wish to use material from a non-Elsevier publication, please see our permissions guidance page for more information
- If you are an author and wish to use material from any Elsevier publication, please visit our permissions pages
- If you are an Elsevier author and another author wishes to use all or part of your article as a resource, please refer them to the permissions page or ask them to email our Global Rights Department: permissions@elsevier.com.

Contact information

*Please Note: The rights listed above apply to journal authors only. For information regarding book author rights and for other uses by journal authors, please contact the Global Rights Department.

Elsevier Global Rights Department
phone (+44) 1865 843 830
fax (+44) 1865 853 333
email: permissions@elsevier.com

 [Printer-friendly version](#)



[Home](#) | [Elsevier Sites](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [Feedback](#) | [Site Map](#) | [A Reed Elsevier Company](#)

Copyright © 2011 [Elsevier B.V.](#) All rights reserved.

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

C E R T I F I C A D O

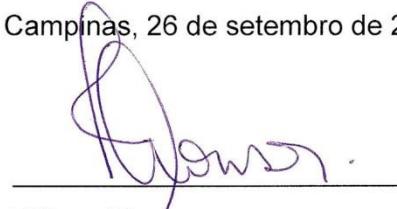
Certificamos que o Protocolo nº 1359-1, sobre "Alterações da morfologia, resistência mecânica e capacidade osteogênica dos ossos de camundongos mdx", sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Angelo Camilli / Wilson Romero Nakagaki, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 1359-1, entitled "Alterations of morphology, mechanical resistance and osteogenic capacity of mdx mice bones", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva