

COMPORTAMENTO DE CÉLULAS CARTILAGÍNEAS FRENTE A UM AMBIENTE DE DEBILIDADE MUSCULOESQUELÉTICA

Francisco Gerlai Lima Oliveira¹
Jodonai Barbosa da Silva²

RESUMO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é uma doença degenerativa ligada ao cromossomo X caracterizada pela perda progressiva de força muscular, se não tratada leva a incapacidade grave e morte precoce no final da adolescência. Os músculos orais são afetados causando disfagia no último estágio da doença, piorando com a idade e esforços da mastigação. Objetivou-se observar o comportamento morfológico dos condrócitos da cartilagem do processo condilar (PC) da mandíbula em camundongos controle (C57BL10) e afetados pela distrofia muscular ligada ao cromossomo X (MDX) e verificar se a cartilagem está afetada indiretamente pela debilidade da massa muscular. Utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos normais (grupo controle) e da linhagem mdx (portadores de distrofia muscular – grupo experimental). Estes foram eutanasiados, os PC's removidos e processados histologicamente. Utilizou-se o programa Axiovision para mensuração da área dos condrócitos e o Image-Pro Plus para contagem dos condrócitos. Observa-se que estatisticamente as células do grupo controle são maiores do que o grupo que apresenta a distrofia muscular. Também apresentam maiores desvio padrão ($88,55 \mu\text{m}^2$) e variância ($7840,52 \mu\text{m}^2$), indicando dados mais dispersos. Sobre a contagem de células, observa-se que o grupo controle apresenta um número maior de condrócitos. Conclui-se que a área e o número de condrócitos do grupo MDX são em média menores que a do grupo controle. Infere-se que a distrofia muscular afeta a cartilagem do PC devido causar o envelhecimento do tecido cartilágneo e afetar a parte de estimulação mecânica que é um estímulo extrínseco e está diretamente associado ao desenvolvimento desta cartilagem.

Palavras-chave: Morfologia; Tecido Cartilágneo; Distrofia Muscular.

INTRODUÇÃO

A distrofia muscular de Duchenne (DMD), é uma doença degenerativa, afetando aproximadamente 1 em cada 3.500 a 5.000 indivíduos do sexo masculino. Tal condição é caracterizada pela perda progressiva de força muscular, com alguns meninos apresentando marcos motores atrasados com ou sem deficiência intelectual. Leva a incapacidade grave e

¹ Graduando do Curso de Enfermagem da Universidade Federal do Piauí – UFPI, gerlailima@gmail.com;

² Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo, docente do Curso de Enfermagem da Universidade Federal do Piauí- UFPI, jodonai@ufpi.edu.br;

Projeto de pesquisa vinculado ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – UFPI

morte precoce no final da adolescência, se não tratada (ARAÚJO et al., 2018). Nos portadores de DMD há a falta ou mesmo a redução da expressão da proteína chamada distrofina, o que leva a redução do complexo de proteínas ligadas a distrofina, causando alterações e/ou destruição entre o citoesqueleto e a matriz extracelular da membrana plasmática, levando a ruptura e necrose de fibras musculares (GAO; McNALLY, 2015).

A proteína implicada nessa condição patológica, a distrofina, apresenta um papel estrutural, uma vez que atua como um agente ligante entre a actina do citoesqueleto e a matriz extracelular (GAO; McNALLY, 2015) e, quando associada à glicoproteína atua na maturação dos receptores de membrana nas junções neuromusculares (PILGRAM et al., 2010).

Como essa proteína está intimamente correlacionada com a manutenção da integridade muscular, a musculatura estriada esquelética é severamente comprometida (JOHNSTONE; VIOL; HOOL, 2017). Os músculos orais também são afetados causando disfagia no último estágio da doença, que só piora cada vez mais com a idade e com os esforços da mastigação. Os músculos afetados pelo distúrbio neuromuscular influenciam negativamente nas funções orais e morfologia orofacial e a partir delas provoca má oclusões, como aberturas anteriores e posteriores na mordida ou mordidas cruzadas (VAN DE ENGEL-HOEK et al., 2016).

Acredita-se que o padrão mastigatório esteja diretamente relacionado ao padrão de crescimento craniofacial (LIMA et al., 2006), desta forma, pode-se inferir que a distrofia muscular prejudica o desenvolvimento craniofacial.

Esse crescimento envolve diversas estruturas, como a sincondrose esfenoccipital e a cartilagem do processo condilar da mandíbula. Este último influencia no crescimento dos terços inferior e médio da face, seu crescimento ocorre por um processo de aposição óssea (PIRTTINIEMI et al., 2017). É necessário que haja um crescimento de forma sincronizada entre os ossos que compõem o complexo craniofacial para a obtenção de uma face harmônica e equilibrada. O crescimento vertical e horizontal da mandíbula varia de acordo com a direção de crescimento do côndilo (KREIA et al., 2011). A cartilagem em questão é altamente responsiva a fatores internos (CAVALLI et al., 2015) e externos (força mecânica da musculatura) (YONEMITSU; MURAMOTO; SOMA, 2007).

Desta forma, deseja-se observar o comportamento morfológico dos condrócitos que constituem a cartilagem do processo condilar (PC) da mandíbula em camundongos controle (C57BL10) e afetados pela distrofia muscular ligada ao cromossomo X (MDX) e verificar se a cartilagem está sendo afetada indiretamente pela debilidade da massa muscular.

DESENVOLVIMENTO

Revisão de literatura

Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença de caráter recessivo ligado ao cromossomo X causado por mutação no gene DMD. É mais comum entre crianças do sexo masculino. O gene distrofina é o maior gene humano identificado, contendo 79 éxons, pelo menos sete promotores diferentes tecido-específico e dois locais de poliadenilação. Contudo o RNA distrofina é diferencialmente processado produzindo múltiplos transcritos que codificam um conjunto de isoformas da proteína. A proteína traduzida a partir do transcrito maior é uma proteína de citoesqueleto importante, que ajuda cada fibra muscular a conectar-se com a lâmina basal subjacente. Alterações ou perda de distrofina força o excesso de cálcio na membrana celular, resultando em excesso de água na mitocôndria, portanto, o músculo do esqueleto afetado sofre distrofia, disfunção mitocondrial, e necrose (BIANCO et al., 2017).

A DMD não apresenta características evidentes até os três ou cinco anos de idade e quando os sintomas aparecem, iniciam-se pela musculatura dos membros inferiores, conseqüentemente, os portadores apresentam dificuldades em sua locomoção e no ato de subir e descer escadas e, posteriormente, esses pacientes se tornam dependentes da cadeira de rodas (SILVA, 2013).

O diagnóstico pode ser dado de várias maneiras e deve ser realizado por um especialista neuromuscular, que possa avaliar o indivíduo clinicamente e rapidamente acessar e interpretar as investigações apropriadas no contexto da apresentação clínica. Um diagnóstico clínico pode ser feito quando um indivíduo tem fraqueza muscular progressiva simétrica. Uma biópsia muscular pode ser feita para procurar níveis anormais de distrofina no músculo. A proteína distrofina pode ser visualizada pela coloração da amostra muscular com um corante especial. Um músculo que tem quantidades médias de distrofina aparecerá com a técnica de coloração. Um paciente com DMD não apresentará esta coloração ao redor das células musculares. Testes genéticos em uma amostra de sangue para mudanças no gene DMD podem ajudar a estabelecer o diagnóstico de DMD, sem realizar uma biópsia muscular (BARBOSA, 2017).

Distrofia Muscular e os Músculos da Mastigação

Azevedo (2010), diz que a progressiva deterioração do complexo orofaríngeo dos pacientes com DMD possibilita o aparecimento de má oclusão, afetando seriamente a capacidade mastigatória.

Segundo Hoek (2013), a fraqueza muscular afeta o preparo do bolo alimentar, dificultando o ato de alimentar-se, ocasionando em menor aporte calórico e conseqüente perda de peso. A redução funcional leva à progressão degenerativa dos músculos esqueléticos, incluindo os da face, língua e os mastigatórios.

A força realizada pela língua para mover o bolo alimentar é crucial para a deglutição adequada. Em seus estudos, os autores Pizolato, Freitas Fernandes e Gavião (2009) e Torriani et al., (2012), afirmam que tal ação nos sujeitos com DMD está reduzida desde a fase oral, já que o contato da língua com a cavidade oral é garantido por meio da ativação dos músculos do órgão em combinação com a atividade da musculatura submental correspondendo ao ventre anterior do digástrico, genio-hióideo e milohióideo.

Cartilagem Condilar

A cartilagem condilar é o mais importante local de crescimento da mandíbula sendo responsável pelo seu crescimento final. Desenvolve-se a partir das membranas ósseas durante a embriogênese. Nesse contexto, considera-se uma cartilagem secundária em vez de uma cartilagem primária. A presença de dois tipos de cartilagem, uma fibrocartilagem na superfície e uma cartilagem hialina abaixo, permite que a cartilagem condilar se adapte melhor às forças do que as cartilagens primárias (RAMIREZ-YAÑEZ, 2004).

Está localizada abaixo da camada articular fibrosa e sofre alterações atróficas, assumindo o crescimento ósseo endocondral ou crescimento de adaptação, de acordo com a ausência ou presença de exigência funcional. Durante o crescimento mandibular ou após seu cessado seu crescimento, o côndilo mandibular pode ser continuamente estimulado sob a influência de forças extrínsecas, essas forças podem ser fisiológicas, funcional ou excessiva (VENTURIN, et al., 2010).

O desenvolvimento da cartilagem condilar da mandíbula é marcado por processos muito peculiares visto que essa articulação possui, mesmo na fase adulta, a capacidade de adaptação e remodelamento sob estímulos externos. A condrogênese e osteogênese iniciam na vida uterina com a proliferação ectomesenquimal a partir da qual aparecerá uma cartilagem hialina de formato esférico que dará origem ao côndilo. Durante esse desenvolvimento observa-se zonas de organização e maturação dos componentes tissulares, essas zonas são as

superficial ou tissular, de proliferação, de condroblastos e condrócitos, e a zona de erosão (CAVALCANTI, 2008).

METODOLOGIA

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

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

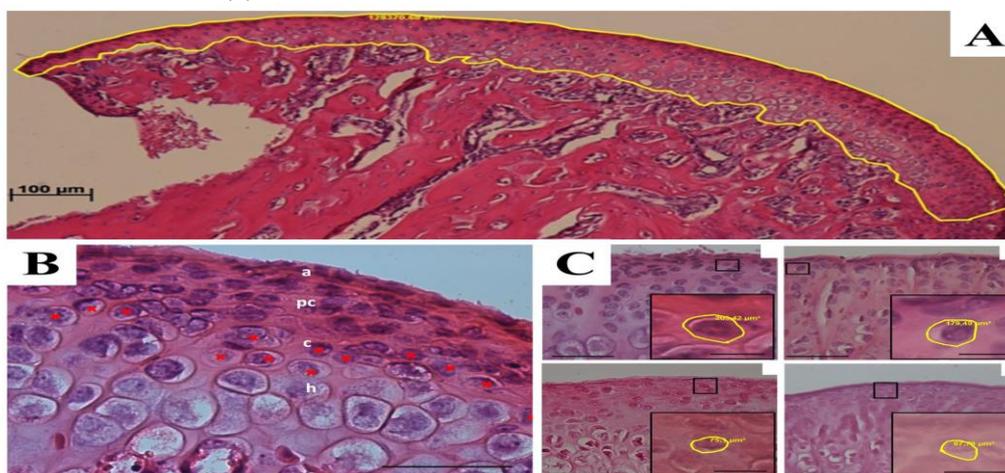
Acomodados em gaiolas de polipropileno com uma grade metálica, cada uma contendo de quatro a cinco indivíduos, os animais dos dois grupos foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo sob condições controladas de temperatura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

Os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com a idade e a linhagem. Os animais do grupo controle são os C57BL10 com 4 e 10 semanas de idade e os animais do grupo experimental são os MDX com 4 e 10 semanas de idade.

Esses animais foram eutanasiados de acordo com os procedimentos do Comitê de Ética em Animal da USP e os processos condilares foram removidos e passaram por processamento histológico. Em seguida o tecido foi cortado em micrótomo (Leica SM 2000 R) com 5 µm no plano sagital. Após desparafinados, as lâminas histológicas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e com Safranina-O. Portanto, foram utilizadas lâminas histológicas advindas desses animais e não serão feitas lâminas novas.

As imagens foram obtidas através um microscópio binocular (Axioscope 40, Zeiss) e em seguida as imagens analisadas e realizadas as medidas da área total da cartilagem condilar, do número total de condrócitos por camada da cartilagem, área total dos condrócitos com o auxílio do programa Axiovision Rel. 4.8 (figura 1) e a análise da matriz extracelular com o auxílio do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

Figura 1: Cartilagem condilar: área total (a), número total de condrócitos por camada (b) e área dos condrócitos (c).



Fonte: Elaborado por Jodonai Barbosa da Silva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A área dos condrócitos da cartilagem do processo condilar (PC) da mandíbula de camundongos controle (C57BL10) e afetados pela distrofia muscular ligada ao cromossomo X (MDX) foram mensuradas utilizando como unidade de medida micrômetro quadrados (μm^2), utilizou-se o programa Axiovision para a mensuração da área e o programa Image-Pro Plus para a contagem de condrócitos. A tabela 1 apresenta o resultado da contagem dos condrócitos. As tabelas 2 e 3 apresentam o resultado da análise de estatística descritiva (média, desvio padrão e variância) utilizando o Microsoft Excel 2010.

Tabela 1: contagem dos condrócitos realizado através do programa Image-Pro Plus.

Imagem do tecido	Número de condrócitos	Imagem do tecido	Número de condrócitos
C57BL-10_4_II_H.E	408	MDX_4_III_HE_5X_1	230
C57BL-10_4_V_H.E_10X_1	248	MDX_4_IX_HE_10X_2	304
C57BL-10_4_VI_H.E	274	MDX_4_IX_HE_10X_3	392
C57BL-10_4_VII_H.E	266	MDX_4_VI_HE_5X_2	224
C57BL-10_4_X_H.E	234	MDX_4_II_HE_10X_1	301
C57BL-10_10_I_H.E.10X_5	334	MDX_10_I_HE_5X_1	180
C57BL-10_10_I_H.E	323	MDX_10_II_HE_5X_1	265
C57BL-10_VI_HE_5X_2	352	MDX_10_III_HE_5X_1	152
C57B-10_VII_HE_10X_1	384	MDX_10_VI_HE_5X_1	358
C57BL-10_VII_HE_10X_4	337	MDX_10_X_HE_10X_2	353

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 2: Média, desvio padrão e variância da área dos condrócitos.

Grupo de imagens do tecido	Média	Desvio padrão	Variância
C57BL 10	176,98 μm^2	88,55 μm^2	7840,52 μm^2
MDX	154,75 μm^2	87,99 μm^2	7742,12 μm^2

Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 3: Média, desvio padrão e variância da contagem dos condrócitos.

Grupo de imagens do tecido	Média	Desvio padrão	Variância
C57BL 10	316	58,50	3423,33
MDX	275,9	79,61	6338,98

Fonte: elaborada pelo autor

Devem ser levadas em consideração que em algumas imagens não foi possível mensurar as áreas de alguns condrócitos devido não ser possível delimitar completamente as margens da célula. Podemos observar que estatisticamente as células do grupo controle (C57BL 10) são maiores do que o grupo que apresentava a distrofia muscular (MDX). Também apresentam maiores desvio padrão e variância, o que indicam que os dados apresentam-se mais dispersos. Em relação a contagem de células, observa-se que o grupo controle apresenta um número maior de condrócitos.

O estudo desenvolvido por Papadopoulou et al. (2007) sugeriram que estímulos mecânicos são essenciais para a maturação e diferenciação dos condrócitos, pois desta forma estes são estimulados a sintetizar alguns fatores de crescimento que promovem o crescimento e desenvolvimento do processo condilar da cartilagem.

Silva (2013) em seu estudo reforça a teoria de que a DMD acelera o processo de envelhecimento da cartilagem do processo condilar. Isso justifica a redução do número de condrócitos, pois essa é uma característica do processo de envelhecimento natural do tecido colágeno. Desta forma, pode-se inferir que a diminuição do número de condrócitos no grupo MDX deve-se devido a DMD encontrar-se em uma fase em que está intensamente expressa, proporcionando o envelhecimento do tecido e conseqüentemente causando essa diminuição no número de células (YONEMITSU; MURAMOTO; SOMA, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa realizada no período de agosto de 2018 até o presente momento através da mensuração da área e da contagem dos condrócitos das camadas da cartilagem condilar da

mandíbula de camundongos MDX e C57BL10 conclui-se que a área e o número de condrocitos do grupo MDX são em média menores que a do grupo controle. Infere-se que a distrofia muscular afeta a cartilagem do processo condilar devido causar o envelhecimento do tecido cartilágneo e por afetar a parte de estimulação mecânica que é um estímulo extrínseco e que está diretamente associado ao desenvolvimento desta cartilagem.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, A. P. Q. C. et al . Brazilian consensus on Duchenne muscular dystrophy. Part 2: rehabilitation and systemic care. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo , v. 76, n. 7, p. 481-489, July 2018 . Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2018000700481&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 21 Fev. 2019.

AZEVEDO, F.C.G. **Alterações sistêmicas e orais em pacientes com Distrofia Muscular Progressiva de Duchenne**. 2010. Dissertação (Mestrado em patologia bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BARBOSA, W. B. Síntese de evidências se 11/2017: Ataluren para o tratamento da distrofia muscular de Duchenne. CENTRO COLABORADOR DO SUS: AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS E EXCELÊNCIA EM SAÚDE – CCATES. Faculdade de Farmácia UFMG, 2017.

BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; CONCEIÇÃO, G. S.; BARBOSA, C. P. Diagnóstico genético pré-implantacional associado à distrofia muscular de Duchenne. **einstein**, v. 15, n. 4, p. 489-491, 2017.

CAVALCANTI, U. D. N. T. **Aspectos morfológicos do desenvolvimento embriológico da articulação temporomandibular de ratos (Rattus norvegicus albinus) tratados com fluoxetina**. 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2008.

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

GAO, Q; MCNALLY, E. M. The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy. **Compr Physiol**. v. 5; n. 3; p. 1223–1239, 2015.

HOEK, V.D.E.L. et al. Oral muscles are progressively affected in Duchenne muscular dystrophy: Implications for dysphagia treatment. **Journal of Neurology**, v. 260, n. 5, p. 1295–1303, 2013.

JOHNSTONE, V. P. A.; VIOLA, H. M.; HOOL, L. C. Dystrophic Cardiomyopathy— Potential Role of Calcium in Pathogenesis, Treatment and Novel Therapies. **Genes (Basel)**. v. 8, n. 4, p. 108, 2017.

KREIA, T. B. et al. Tendência de crescimento facial em Ortodontia e Ortopedia Funcional dos Maxilares. **RGO - Rev Gaúcha Odontol.**, v.59, suplemento 0, p. 97-102, jan./jun., 2011.

LIMA, R. M. F; FREIRE, O. C. B; NEPOMUCENO FILHO, J. L; STAMPFORD, S; CUNHA D. A; SILVA, H. J. Padrão mastigatório em crianças de 5 a 7 anos:suas relações com crescimentocraniofacial e hábitos alimentares. **Rev CEFAC**, v.8, n.2, p. 205-215, abr./jun. 2006.

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

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

PIRTINIEMI, P.; PELTOMÄKI, T.; MÜLLER, L.; LUDER, H. U. Abnormal mandibular growth and the condylar cartilage. *Eur J Orthod*. v. 31, n 1, p. 1-11, 2009.

PIZOLATO RA, FREITAS-FERNANDES FS, GAVIÃO MBD. Deglutition and temporomandibular disorders in children. **Minerva stomatologica**. v. 58, n. 11-12, p. 567-76, 2009.

RAMIREZ-YAÑEZ, G. O. Cartilagem condilar da mandíbula: uma revisão. **Ortop Rev Int Ortop Func**, v. 1, n. 1, p. 85-94, 2004.

SILVA, J. B. **Influência da ausência de distrofina sobre o desenvolvimento cartilágneo do processo condilar da mandíbula de camundongos mdx**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

TORRIANI M, TOWNSEND E, THOMAS BJ, BREDELLA MA, GHOMI RH, TSENG BS. Lower leg muscle involvement in Duchenne muscular dystrophy: an MR imaging and spectroscopy study. **Skeletal Radiology**. v. 41, p. 437–445, 2012.

VAN DE ENGEL-HOEK, L. et al. Dystrophic changes in masticatory muscles related chewing problems and malocclusions in Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 26, p. 354–360, 2016.

VENTURIN, J. S. et al. Temporomandibular Joint Condylar Abnormalit: Evaluation, treatment planning and surgical approach. **J Oral Maxillof Surg**. v. 68, n. 5, p. 1189-1196, 2010.

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