



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**Discondroplasia da Tíbia em Aves**  
*Avaliação de um Modelo de Patologia Experimental*

Fernando Manuel Salvado Capela e Silva  
*Dissertação apresentada à Universidade de Évora para a  
obtenção do grau de Doutor em Biologia*

Orientador da Tese: Professor Doutor Raymond Leclair

*Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri*

ÉVORA  
2003



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

# Discondroplasia da Tíbia em Aves

*Avaliação de um Modelo de Patologia Experimental*



165-882

Fernando Manuel Salvado Capela e Silva

*Dissertação apresentada à Universidade de Évora para a  
obtenção do grau de Doutor em Biologia*

Orientador da Tese: Professor Doutor Raymond Leclair

*Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri*

ÉVORA  
2003

## Errata

No Resumo da Tese, na página X:

<b>Na linha</b>	<b>Onde se lê</b>	<b>Deve ler-se</b>
15	TIMP-2 (47,0% vs. 46,9%, respectivamente)	TIMP-2 (47,0% vs. 21,5%, respectivamente)
16	TIMP-3 (94,3% vs. 21,5%, respectivamente)	TIMP-3 (94,3% vs. 91,4%, respectivamente)

*“É preciso saber esquecer para saborear o gosto do presente, do instante e da espera, mas a própria memória tem necessidade de esquecimento: é preciso esquecer o passado recente para encontrar o passado antigo...”*

**Marc Augé<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Augé, M. (2001) *As Formas do Esquecimento*. Íman Edições, Almada. Tradução de Ernesto Sampaio. 109 páginas.

## **Agradecimentos**

Ao Senhor Professor Doutor Raymond Leclair, manifesto os meus reconhecidos e sinceros agradecimentos pela disponibilidade para a orientação do presente trabalho, e pelo apoio e entusiasmo que sempre me transmitiu.

Ao Senhor Professor Doutor Manuel Luiz Correia de Matos Beja, Director do Instituto de Anatomia Patológica, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, à data da realização do presente trabalho, pelas facilidades concedidas na utilização dos laboratórios do Instituto.

Ao Senhor Professor Doutor António Silvério Cabrita, do Instituto de Patologia Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pelo esclarecimento das muitas dúvidas surgidas ao longo da realização do trabalho e pelas valiosas sugestões para aprofundar este estudo.

À Senhora Dr.<sup>a</sup> Beatriz França, e às Senhoras Dona Margarida Menezes e Dona Elisa Patrício, do Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina, da Universidade de Coimbra, bem como à Senhora Dr.<sup>a</sup> Ana Rafael pelo apoio técnico na realização de parte das lâminas.

Ao Senhor Professor Doutor José Potes, do Hospital Veterinário da Universidade de Évora, pelas facilidades concedidas na utilização das instalações do Hospital, para o processamento de alguns blocos histológicos, realizado com o apoio inestimável da Senhora Eng.<sup>a</sup> Luisa Fialho, a quem manifesto igualmente os meus reconhecidos agradecimentos.

Ao Engenheiro Urs Zuber pela simpatia e pelas facilidades concedidas na instalação dos ensaios.

À minha família, em particular ao meu pai, pelo apoio e incentivos constantes.

À Elsa pela correcção minuciosa, cuidada e atenta do texto e, acima de tudo, pela paciência e carinho com que sempre me escutou e aconselhou.

À *Hospitrans*, nas pessoas das Senhoras Dr.<sup>a</sup> Susana Costa Santos e Dona Ilda Teixeira, à *Alfredo Cavalheiro*, na pessoa da Senhora Dona Carmo Lopes, e à *MC Soveia*, na pessoa do Senhor Manuel Soveia, pelas facilidades concedidas na aquisição do equipamento e reagentes necessários para a realização do presente trabalho.

À Sandra Alcobia pela simpatia e pela companhia nas horas passadas no laboratório.

## Resumo

A discondroplasia do tibiotarso consiste numa anomalia, que é caracterizada pelo aparecimento de uma massa cartilaginosa avascular opaca, não calcificada, que se estende até à metáfise. Esta patologia pode ocorrer espontaneamente, ou ser induzida por vários factores, designadamente nutricionais, micotoxinas e alguns ditiocarbamatos. No presente trabalho, procedemos ao estudo das eventuais alterações nos mecanismos homeostáticos ligados à acumulação de matriz extracelular, característica desta doença, através do modelo experimental de indução pelo ditiocarbamato Tirame [tetramethylthiuram disulfide ( $C_6H_{12}N_2S_4$ )], em frangos de carne (broilers) da estirpe Cobb. O Tirame foi administrado na dieta dos animais, desde o seu nascimento, até aos 21 dias de idade, numa concentração de 35 mg Tirame/Kg ração. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado diariamente, através da observação dos animais. Foi ainda avaliada a expressão de diversos imunomarcadores, possivelmente associados à origem e desenvolvimento das lesões discondroplásicas, em ossos de animais normais e tratados com Tirame, ao fim dos 21 dias do ensaio.

Os primeiros sinais clínicos começaram a ser evidentes a partir dos 4-5 dias, embora em apenas 12% dos animais. Estes indivíduos foram identificados com base em evidentes dificuldades de locomoção, com paragens constantes e consequente imobilização, resultados confirmados por análise histológica. No dia do sacrifício as diferenças verificadas entre os pesos corporais dos animais do grupo controlo ( $682,5 \text{ g} \pm 34,3$ ) e do grupo experimental ( $409,6 \text{ g} \pm 23,5$ ) foram significativas ( $p < 0,05$ ), não se verificando, contudo, dentro de cada grupo, diferenças significativas entre machos e fêmeas. No grupo controlo não foram observadas lesões, enquanto que no grupo experimental estas atingiram valores da ordem dos 85% nas placas de crescimento proximais da tibia e do fémur. A placa de crescimento com menor grau de incidência foi a do úmero distal (5%).

Para os marcadores de diferenciação e proliferação, a zona de hipertrofia apresentou as maiores diferenças significativas entre os animais controlo e os animais com discondroplasia, para o *c-myc* (34,4% vs. 15,3%, respectivamente), para a tubulina-beta (27,2% vs. 14,9%, respectivamente), para a ubiquitina (95,4% vs. 89,2%, respectivamente) e para a caderina (34,8% vs. 91,2%, respectivamente). Apenas o PCNA não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

A Bcl-2 e a caspase 3 foram utilizados como marcadores de apoptose. Para o primeiro a marcação foi mais intensa nos animais controlo, com alguns condrócitos hipertróficos positivos na zona de hipertrofia e com os osteoblastos e estruturas vasculares a apresentar, marcação intensa, sendo pouco intensa nas secções observadas de animais com discondroplasia. Contudo, os dois grupos não apresentaram diferenças significativas para a caspase 3, tendo

sido os osteoblastos e os canais vasculares, as zonas onde se verificou uma marcação mais intensa.

No que diz respeito aos marcadores de vascularização, não foi observada marcação dos condrócitos, em nenhum dos grupos experimentais, nem para a actina, nem para a laminina-1. No entanto, os animais controlo apresentam marcação ao longo dos canais vasculares, para qualquer um destes marcadores. Quanto ao vWF, só nos animais com discondroplasia foi observada marcação, ao contrário do VEGF, em que os condrócitos hipertróficos dos animais controlo se mostraram significativamente mais marcados do que as mesmas células dos animais com discondroplasia (88,0% vs. 72,6%, respectivamente).

Ao nível dos marcadores de degradação da cartilagem, e um pouco de acordo com os resultados obtidos para a maior parte dos marcadores anteriores, as maiores diferenças encontram-se ao nível da zona de hipertrofia. A marcação foi significativamente mais intensa nas placas de crescimento discondroplásicas, em relação às placas de crescimento normais, para os seguintes marcadores, MMP-10 (28,7% vs. 26,2% respectivamente); MMP-11 (63,5% vs. 26,5%, respectivamente); MMP-7 (46,9% vs. 24,9%, respectivamente); TIMP-2 (47,0% vs. 46,9%, respectivamente); TIMP-3 (94,3% vs. 21,5%, respectivamente); TIMP-4 (87,8% vs. 84,3%, respectivamente). As MMP-1 e MMP-14 também parece haver uma tendência para uma marcação mais intensa, para os animais com discondroplasia, ainda que as diferenças encontradas entre este e o grupo controlo não sejam significativas (93,8% e 38,2% de condrócitos hipertróficos, nas placas discondroplásicas, para a MMP-1 e MMP-14, respectivamente vs. 91,4% e 34,9%, nas placas normais, para os mesmos marcadores, respectivamente). Observou-se ainda uma marcação pouco evidente, para a MMP-13, nas placas de crescimento controlo, mas com zonas de marcação evidente nas placas de crescimento discondroplásicas. Para os marcadores MMP-9, MMP-15 e MMP-16, não se observaram diferenças entre os dois grupos experimentais. O único marcador de degradação da cartilagem, em que foi o grupo de animais com discondroplasia a apresentar uma intensidade de marcação significativamente menor, foi a MMP-9 (90,7% condrócitos hipertróficos nas placas de crescimento normais vs. 87,3% condrócitos hipertróficos nas placas de crescimento discondroplásicas).

Os resultados do presente trabalho, sugerem uma possível quebra nos mecanismos homeostáticos no processo de ossificação endocondral o que justifica uma análise mais aprofundada, com recurso a outras técnicas mais sofisticadas, particularmente das seguintes proteínas: MMP-9, TIMP-2, actina, laminina e tubulina-beta.

# **INDICE GERAL**

Nota prévia sobre Abreviaturas e Designações	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2. CRESCIMENTO DOS OSSOS LONGOS</b>	<b>5</b>
2.1 Características da placa de crescimento	8
2.2 Diferenciação dos condrócitos	16
2.3 Matriz extracelular da placa de crescimento	20
2.4 Mineralização da cartilagem	23
2.5 Vascularização na ossificação endocondral	26
2.6 Reabsorção da cartilagem	27
<b>3. MODELO EXPERIMENTAL</b>	<b>41</b>
3.1 Introdução	43
3.2 Obtenção das placas de crescimento e respectivas secções histológicas	44
3.3 Imunohistoquímica	45
3.4 Análise de imagem	48
3.5 Tratamento dos dados	48
<b>4. HISTOLOGIA DA PLACA DE CRESCIMENTO NA DISCONDROPLASIA</b>	<b>49</b>
4.1 Introdução	51
4.2 Materiais e Métodos	55
4.3 Resultados	55
4.4 Discussão	57
<b>5. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS NA DISCONDROPLASIA</b>	<b>69</b>
5.1 Introdução	71
5.2 Materiais e Métodos	75
5.3 Resultados	78
5.4 Discussão	147
<b>6. DISCUSSÃO GERAL</b>	<b>191</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>201</b>



## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela I: Abreviaturas e designações</b>	xvii
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Tabela 2.1 Metaloproteinases da matriz (MMPs)</b>	31
<b>Tabela 2.2 Nomenclatura características dos TIMPs</b>	33
<b>Tabela 2.3 Diferenças entre osteoclastos e macrófagos polícarions</b>	39
<b>Tabela 2.4 Critérios para definição dos osteoclastos e seus precursores</b>	39
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>Tabela 3.1 Processamento dos fragmentos</b>	45
<b>Tabela 3.2 Referências dos anticorpos primários utilizados no presente trabalho</b>	47
<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>Tabela 4.1 Peso corporal aos 21 dias de idade</b>	55
<b>Tabela 4.2 Número de placas de crescimento com lesões discondroplásicas aos 21 dias</b>	56
<b>Tabela 4.3 Gravidade das lesões discondroplásicas aos 21 dias</b>	56
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>Tabela 5.1 Anticorpos primários usados na avaliação da proliferação celular</b>	75
<b>Tabela 5.2 Anticorpos primários utilizados na avaliação da apoptose</b>	76
<b>Tabela 5.3 Anticorpos primários usados na avaliação da vascularização</b>	76
<b>Tabela 5.4 Anticorpos primários usados na avaliação da reabsorção da matriz</b>	77
<b>Tabela 5.5 Imunomarcacão para o PCNA e para o c-myc</b>	78
<b>Tabela 5.6 Imunomarcacão para a Tubulina-beta e para a Ubiquitina</b>	79
<b>Tabela 5.7 Imunomarcacão para as proteínas S100</b>	80
<b>Tabela 5.8 Imunomarcacão para a Bcl-2 e para a Caspase-3</b>	81
<b>Tabela 5.9 Imunomarcacão para o VEGF</b>	82
<b>Tabela 5.10 Imunomarcacão para as collagenases</b>	84
<b>Tabela 5.11 Imunomarcacão para as gelatinases</b>	84
<b>Tabela 5.12 Imunomarcacão para as estromalisinas</b>	86
<b>Tabela 5.13 Imunomarcacão para as MMPs tipo membranares</b>	87
<b>Tabela 5.14 Imunomarcacão para a matrilisina-1 (MMP-7)</b>	88
<b>Tabela 5.15 Imunomarcacão para os TIMPs</b>	89
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>Tabela 6.1 Genes candidatos a responsáveis pela discondroplasia</b>	199

## **INDICE DE FIGURAS**

### **CAPÍTULO 1**

<b>Figura 1.1</b> Secções sagitais de epífises	1
--	---

### **CAPÍTULO 2**

<b>Figura 2.1</b> Placa de crescimento proximal de tibia de avestruz	7
<b>Figura 2.2</b> Zonas da placa de crescimento	9
<b>Figura 2.3</b> Placas de crescimento de mamífero e ave	11
<b>Figura 2.4</b> Mecanismos propostos para a interacção de diferentes metaloproteinases	32

### **CAPÍTULO 3**

<b>Figura 3.1</b> Esquema da tibia e da fíbula onde são indicados os critérios para obtenção dos cortes	44
---	----

### **CAPÍTULO 4**

<b>Figura 4.1</b> Estrutura geral e condrócitos da placa de crescimento	63
<b>Figura 4.2</b> Vascularização da placa de crescimento	65
<b>Figura 4.3</b> Lesões discondroplásicas	67

### **CAPÍTULO 5**

<b>Figura 5.1</b> Imunomarcação para o PCNA	91
<b>Figura 5.2</b> Imunomarcação para o c-myc	93
<b>Figura 5.3</b> Imunomarcação para a tubulina-beta	95
<b>Figura 5.4</b> Imunomarcação para Ubiquitina	97
<b>Figura 5.5</b> Imunomarcação para a pan-caderina	99
<b>Figura 5.6</b> Imunomarcação para as proteínas S-100	101
<b>Figura 5.7a</b> Imunomarcação para a Bcl-2	103
<b>Figura 5.7b</b> Imunomarcação para a Bcl-2 (figuras de mitose)	105
<b>Figura 5.8</b> Imunomarcação para a caspase-3	107

<b>Figura 5.9</b> Imunomarcação para o VEGF	109
<b>Figura 5.10</b> Imunomarcação para o factor de von Willebrand	111
<b>Figura 5.11</b> Imunomarcação para a laminina-1	113
<b>Figura 5.12</b> Imunomarcação para a actina	115
<b>Figura 5.13</b> Imunomarcação para a MMP-1	117
<b>Figura 5.14</b> Imunomarcação para a MMP-13	119
<b>Figura 5.15</b> Imunomarcação para a MMP-2	121
<b>Figura 5.16</b> Imunomarcação para a MMP-9	123
<b>Figura 5.17</b> Imunomarcação para a MMP-3	125
<b>Figura 5.18</b> Imunomarcação para a MMP-10	127
<b>Figura 5.19</b> Imunomarcação para a MMP-11	129
<b>Figura 5.20</b> Imunomarcação para a MMP-14	131
<b>Figura 5.21</b> Imunomarcação para a MMP-15	133
<b>Figura 5.22</b> Imunomarcação para a MMP16	135
<b>Figura 5.23</b> Imunomarcação para a MMP-7	137
<b>Figura 5.24</b> Imunomarcação para o TIMP-2	139
<b>Figura 5.25</b> Imunomarcação para o TIMP-3	141
<b>Figura 5.26</b> Imunomarcação para o TIMP-4	143
<b>Figura 5.27</b> Imunomarcação para as MMPs e para os TIMPs	145

## NOTA PRÉVIA SOBRE ABREVIATURAS E DESIGNAÇÕES

O desenvolvimento a que temos assistido nos últimos anos, no campo da Biologia, em particular da Biologia Celular e da Biologia Molecular, com o aparecimento, quase diário, de novas moléculas, por um lado, e a influência crescente do inglês como língua científica universal, por outro, faz com que alguns termos, uma vez divulgados, sejam assimilados de imediato e passem a ser conhecidos, nalguns casos inclusivamente, apenas pela sua abreviatura. Adicionalmente, muitos desses termos são de difícil tradução para as diferentes línguas maternas, neste caso o português, sem que percam o seu sentido, e um pouco da sua identidade. Deste modo, decidimos manter a designação original, em inglês. Por outro lado, sempre que qualquer entidade seja apresentada pela sua abreviatura, esta dirá respeito igualmente à designação inglesa.

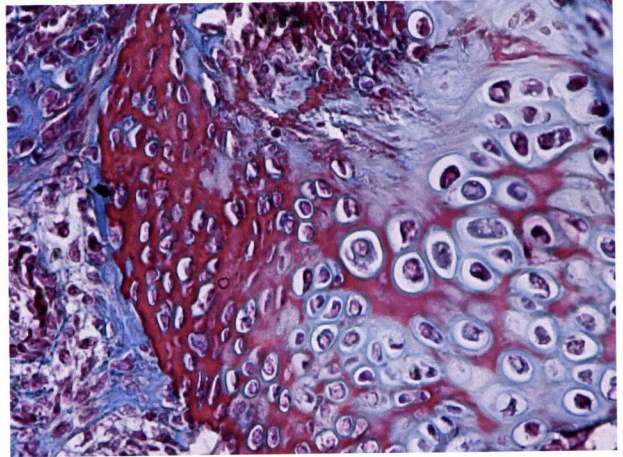
**Tabela I:** Abreviaturas e designações.

Abreviatura	Designação
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25-dihydroxycholecalciferol
24,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	24,25-dihydroxycholecalciferol
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic proteins
BrdU	bromodeoxyuridine
c-myc	c-myc
Ca <sup>2+</sup>	cálcio
Chm	chondromodulin
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
ESAF	endothelial cell stimulating angiogenic factor
Ex-FABP	extracellular fatty acid binding proteins
FGF	fibroblast growth factor
FGFr	fibroblast growth factor receptor
GAG	glicosaminoglicans
GFAP	glial fibrilar acidic protein
GH	growth hormone
GIF	growth inhibitory factor
H&E	hematoxylin and eosin
HSF	heat shock transcription factor
HT7	hydroxytryptamine <sup>7</sup>

**Tabela I: Abreviaturas e designações (cont.)**

Abreviatura	Designação
HSPs	heat shock proteins
ICAM	intercellular adhesion molecule
IGF	insulin growth factor
Ihh	indian hedgehog
kDa	kilo Dalton
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MMPs	matrix metalloproteinases
mRNA	ribonucleic acid messenger
MTs	metallothioneins
MT-MMPs	membrane-type matrix metalloproteinases
NCAM	neural cell adhesion molecule
OPG	osteoprotegerin
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PAS	periodic acid Schiff
PBS	phosphate buffer saline
PC	placa de crescimento
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PRG	parathyroid receptor gene
PTH	parathyroid hormone
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide
RANKL	receptor activator NF- $\kappa$ B ligand
RIHB	retinoic acid induced heparin binding growth factor
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
TBS	triphosphate buffer saline
TGF	transforming growth factor
TIMPs	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TNF	tumor necrosis factor
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labelling
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VDR	vitamin D receptor
vWF	von Willebrand factor

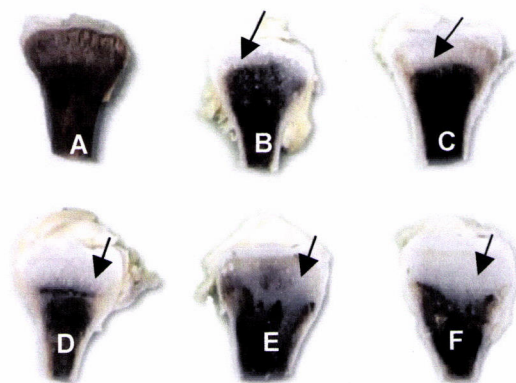
## 1. INTRODUÇÃO GERAL



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento longitudinal dos ossos longos é feito pela deposição contínua de osso, do tipo endocondral, numa zona denominada placa epifisária, ou placa de crescimento, a qual liga as regiões epifisária e metafisária do osso. A placa de crescimento epifisária desempenha, assim, um papel fundamental no desenvolvimento dos ossos longos. O processo normal de ossificação endocondral envolve uma sequência ordenada e equilibrada de fenómenos desde a proliferação dos condrócitos, passando pela sua completa diferenciação, até à sua morte por apoptose. Por outras palavras, em condições normais, a síntese de cartilagem nas placas de crescimento está em equilíbrio perfeito com a mineralização da cartilagem, com a degradação desta e com a sua substituição por osso trabecular. Alterações nos factores que contribuem para a manutenção dos processos homeostáticos no decurso da ossificação endocondral, podem traduzir-se, assim, em anomalias, mais ou menos graves, no desenvolvimento do esqueleto, designadamente, condrodistrofia, raquitismo e discondroplasia (Leach e Gay, 1987).

A discondroplasia do tibiotarso (nas aves o tibiotarso é formado pela fusão da tíbia e pela linha proximal dos ossos társicos; no entanto, no decurso do presente trabalho utilizaremos a designação "tíbia"), patologia descrita pela primeira vez por Leach e Nesheim (1965), consiste numa anomalia espontânea, ou induzida, nas placas de crescimento epifisárias dos ossos longos, das estirpes de rápido crescimento das espécies avícolas, caracterizada pelo aparecimento de uma massa cartilaginosa avascular opaca, não calcificada, que se estende até à metafíse, numa zona em que, normalmente, existe osso trabecular (Leach e Lilburn, 1992; Orth e Cook, 1994; Rath et al, 1994; Whitehead, 1997; Figura 1.1).



**Figura 1.1** Secções sagitais de epífises proximais de tíbias de animal normal (A) e de animais com discondroplasia (B-F), em que é bem visível a massa de cartilagem opaca (setas), ocupando áreas variáveis da metafíse.

A discondroplasia pode ocorrer em diferentes locais e em diferentes ossos, embora a tíbia proximal seja o local de maior incidência, sendo, por essa razão, designada por discondroplasia da tíbia (Thorp et al, 1997). As lesões podem ser transitórias, mas têm consequências permanentes no desenvolvimento do esqueleto. Do ponto de vista citológico, a discondroplasia reflecte alterações na homeostase celular no decurso normal da ossificação endocondral, ou seja, a cartilagem não calcifica e não é substituída por osso endocondral. Deste modo, os processos de proliferação dos condrócitos (que é normal) e de degradação da cartilagem (que não se verifica), não estão em equilíbrio, resultando numa acumulação de matriz extracelular (Leach e Lilburn, 1992; Cook et al, 1994; Rath et al, 1994).

Para além duma forte base genética, e duma possível influência da taxa de crescimento, vários factores, designadamente, nutricionais, micotoxinas e alguns ditiocarbamatos, induzem o aparecimento e afectam a incidência e a gravidade de lesões discondroplásicas (Leach e Gay, 1987; Orth e Cook, 1994). A sua utilização como agentes indutores da discondroplasia experimental, e o conhecimento do seu modo de acção, podem ajudar a compreender melhor esta patologia e a estabelecer os seus mecanismos de indução. No entanto, e pese embora a quantidade de trabalhos realizados, utilizando os vários modelos experimentais conhecidos (Capítulo 3), a etiologia da discondroplasia não está ainda devidamente esclarecida.

Uma anomalia similar à discondroplasia [também conhecida por osteocondrose, *osteocondritis dissecans* e *osteocondrosis dissecans* (Ekman e Carlson, 1998)], pode ser observada em várias espécies de mamíferos (equídeos: Jeffcott, 1991; suínos: Uhlhorn et al, 1995; ovinos: Doherty et al, 1996; Scott et al, 1996; bovídeos: Hill et al, 1998; Davies e Munro, 1999; Tryon e Farrow, 1999; Woodbury et al, 1999; canídeos: Fitch e Beale, 1998; rato: Kato e Onodera, 1986; 1987), incluindo a espécie humana (Koch et al, 1997). Por outro lado, algumas das características da discondroplasia são similares às da displasia metafisária de Jansen, no Homem (Juppner, 1996; Schipani et al, 1999), a doença humana de Kaschin Beck, uma osteoartrite generalizada (Kolsteren, 1992; Allander, 1994), é provocada por uma micotoxina que provoca igualmente a discondroplasia (Chu et al, 1996), e, humanos afectados com homocistinúria (Schedewie et al, 1973), apresentam algumas anomalias esqueléticas semelhantes à discondroplasia (Orth et al, 1994; Bai et al, 1994).

Embora existam algumas diferenças estruturais entre as placas de crescimento das diferentes espécies, a cartilagem que as constitui é, todavia, muito similar aos níveis celular e molecular, o que sugere mecanismos fisiológicos de controlo semelhantes (Thorp et al, 1993). Deste modo, a elevada frequência de ocorrência, a facilidade de indução e a semelhança com outras patologias encontradas noutras espécies, incluindo a humana, fazem da discondroplasia da tíbia um modelo interessante para o estudo geral da discondroplasia/osteocondrose. Convém ainda referir que alguns dos métodos utilizados com sucesso na investigação da



discondroplasia da tibia, podem dar indicações importantes acerca das estratégias de investigação da discondroplasia/osteochondrose em termos gerais.

Curiosamente, sendo a discondroplasia da tibia caracterizada pelo aparecimento de uma massa cartilágnea avascular que não é degradada e removida, resultando, portanto na sua acumulação, não têm sido realizados muitos trabalhos acerca das causas na falha de vascularização da placa de crescimento e da degradação da matriz extracelular. Com efeito, a maior parte da investigação realizada tem-se preocupado, basicamente, em caracterizar a cartilagem discondroplásica e a cartilagem normal, relativamente à expressão de vários genes, e dos seus produtos, designadamente, *parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP; Farquharson et al, 2001), *parathyroid receptor gene* (PRG; Ben-Bassat et al, 1999), receptores da vitamina D (Berry et al, 1996), osteopontina (Knopov et al, 1995; Pines et al, 1998), fosfatase alcalina e outras enzimas (Farquharson et al, 1992b, 1995; Knopov et al, 1997; Zhang et al, 1997), colagénios dos tipos II e X (Tselepis et al, 1996; Wardale e Duance, 1996; Reginato et al, 1998), sialoproteína óssea (Pines et al, 1998), *basic fibroblast growth factor* (bFGF; Twal et al, 1996), proteoglicanos (Ling et al, 1996; Tselepis et al, 1996, 2000), *c-myc* (Farquharson et al, 1992a; Loveridge et al, 1993; Thorp et al, 1993), osteonectina (Wu et al, 1996), *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ; Loveridge et al, 1993; Law et al, 1996), *transforming growth factor-alfa* (TGF- $\alpha$ ; Ren et al, 1997), *epidermal growth factor* (EGF; Ren et al, 1997), *insulin growth factor-I* (IGF-I; Ren et al, 1997) - nunca sendo apontada a causa, ou as causas, da discondroplasia.

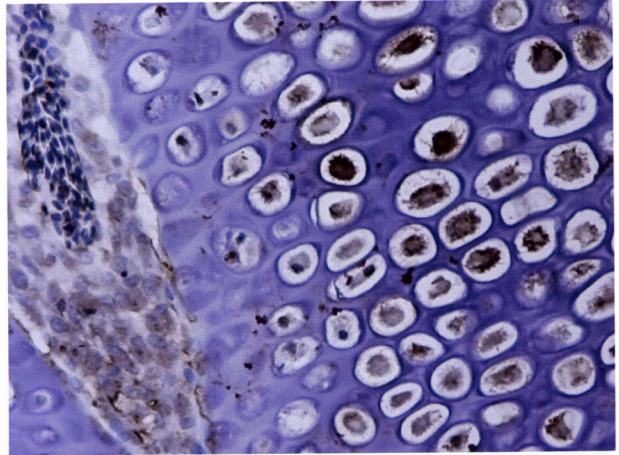
Duma maneira geral, os estudos atrás referidos limitaram-se a identificar uma expressão diferencial dos genes, ou dos seus produtos, nas placas de crescimento normais e discondroplásicas. Através de análises imunohistoquímicas, foi observada uma distribuição anormal de vários dos componentes da matriz extracelular nas lesões discondroplásicas, o que está de acordo com a ausência da hipertrofia completa dos condrócitos característica da discondroplasia (Thorp et al, 1993). Com efeito, alguns daqueles genes são marcadores da hipertrofia dos condrócitos, nomeadamente o colagénio de tipo X (Farquharson et al, 1995; Tselepis et al, 1996), o agrecano (Tselepis et al, 1996), a osteopontina e a osteonectina (Wu et al, 1996; Pines et al, 1998). Por exemplo, o colagénio da matriz das lesões discondroplásicas é altamente reticulado (de piridinolina e deoxipiridinolina), enquanto quantidades normais de reticulados de piridinium são encontradas abaixo das lesões (Farquharson et al, 1996). Estes factos indicam que há uma falha na renovação do tecido das lesões, possivelmente devido a uma redução na actividade das metaloproteínases da matriz. Esta falha, por seu lado, pode exacerbar a condição patológica, tornando as lesões menos sensíveis à invasão vascular e à reabsorção osteoclástica – mas parece pouco provável que seja a causa primeira da patologia. Por outro lado, e apesar dos resultados de diferentes trabalhos serem contraditórios, a discondroplasia da tibia parece estar, igualmente, associada a uma reduzida ocorrência de apoptose, o que sugere que as lesões contêm uma acumulação de células imaturas nas quais

não se verificou o desenvolvimento normal e completo – e sabe-se, hoje, que no processo de ossificação endocondral, à medida que a matriz mineraliza, os condrócitos hipertróficos vão atingindo o estágio de diferenciação final que culmina com a sua morte por apoptose (Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995 Ohyama et al, 1997; Gibson, 1998).

Embora a maioria dos trabalhos realizados sugira que a origem da discondroplasia está relacionada com a incapacidade dos condrócitos em atingirem o estágio terminal de hipertrofia completa, trabalhos recentes (Jefferies et al, 2000) referem que o fenótipo dos condrócitos na discondroplasia reflecte o envolvimento de mecanismos mais complexos do que os inicialmente supostos. A todos estes resultados não deve ser alheio o facto das lesões discondroplásicas serem causadas por variados factores, muito provavelmente por mecanismos de acção distintos, mas que resultam na ocorrência de lesões histológicas similares. Com efeito, a determinação dos marcadores referidos nem sempre foi feita utilizando os mesmos modelos experimentais e as mesmas técnicas, o que pode tornar pouco realista qualquer comparação entre eles e com as lesões discondroplásicas espontâneas. Deste modo, parece claro que: (i) a discondroplasia, ou, mais correctamente, o aparecimento de lesões discondroplásicas tem uma origem multifactorial; (ii) a patologia a que geralmente se dá o nome de discondroplasia, poderá corresponder, efectivamente, a vários tipos de patologia que, contudo, apresentam as mesmas características histológicas.

Pretende-se, com o presente trabalho, investigar, através do modelo experimental tirame, ditiocarbamato que induz o aparecimento de lesões discondroplásicas, eventuais alterações nos mecanismos homeostáticos ligados à acumulação de matriz extracelular. Para o efeito, no capítulo imediatamente a seguir a esta Introdução, o Capítulo 2, será feita uma revisão sobre o processo da ossificação endocondral. O Capítulo 3 apresentará o "Modelo Experimental" utilizado na indução da discondroplasia. No Capítulo 4, será feita a caracterização histológica das placas de crescimento, normais e discondroplásicas. No Capítulo 5, será feita a avaliação da expressão de vários marcadores que eventualmente estejam associados à origem e ao desenvolvimento das lesões discondroplásicas. Neste capítulo será feita, na introdução, uma revisão bibliográfica geral sobre os mecanismos homeostáticos na ossificação endocondral e na discondroplasia, e, na discussão dos resultados, faremos uma revisão bibliográfica para cada um dos marcadores, para um melhor enquadramento dos mesmos e se perceber da razão de ser da avaliação da sua expressão nesta patologia. Finalmente, no Capítulo 6 será feita uma discussão geral, na qual procuraremos integrar os resultados obtidos e avaliar o modelo experimental utilizado no estudo da discondroplasia.

## 2. CRESCIMENTO DOS OSSOS LONGOS





## 2. CRESCIMENTO DOS OSSOS LONGOS

A formação de osso é um conjunto de eventos, regulados no tempo e no espaço por uma série de factores, que envolve dois processos fundamentais: (i) a **ossificação**, ou produção de matriz óssea; (ii) e a **mineralização (calcificação)**, ou deposição mineral (Ornoy, 1995). Por outro lado, quer durante o desenvolvimento embrionário, quer durante a vida pos-natal, assiste-se a um processo contínuo de remodelação óssea - um processo dinâmico de formação e reabsorção de osso, que causa o seu crescimento, a reparação de fracturas, e a manutenção da própria configuração do esqueleto (Ornoy, 1995).

A produção da matriz óssea - a substância osteóide - é levada a cabo pelos osteoblastos. Os osteoblastos, que derivam da diferenciação de células primitivas do mesênquima, depositam osso de duas maneiras. Numa delas, a substância osteóide é secretada directamente sobre fibras de tecido conjuntivo laxo, processo conhecido por **ossificação intramembranosa** (McCarthy e Frassica, 1998). O espessamento do córtex é devido à deposição de osso do tipo intramembranoso que se verifica sob o perióstio, pelo que a ossificação intramembranosa é o mecanismo responsável pelo aumento de diâmetro dos ossos. No outro tipo de deposição óssea, a substância osteóide é depositada em moldes de cartilagem preexistente, processo designado por **ossificação endocondral** (McCarthy e Frassica, 1998). A maior parte do esqueleto forma-se por este processo e, por exemplo, o osso que se forma nos centros primários e secundários de ossificação é do tipo endocondral.

O crescimento longitudinal dos ossos longos é feito pela deposição contínua de osso, do tipo endocondral, numa zona denominada placa epifisária, ou placa de crescimento, a qual liga as regiões epifisária e metafisária do osso (Pines e Hurwitz, 1991; Orth e Cook, 1994; Figura 2.1).

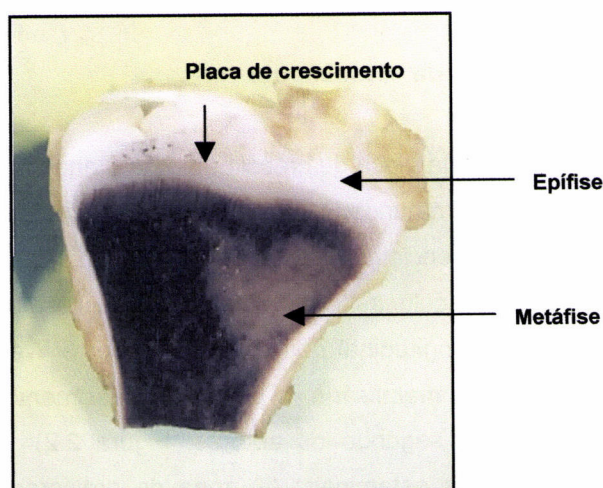


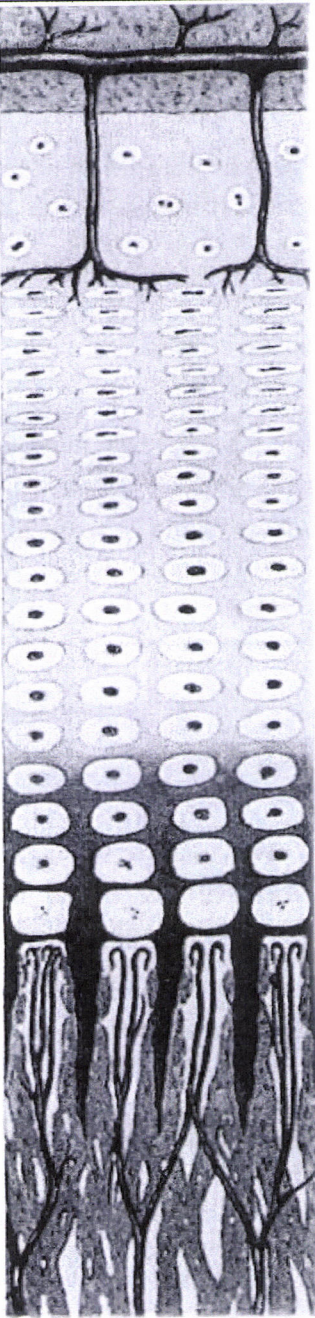
Figura 2.1 Placa de crescimento proximal de tibia de avestruz (Capela e Silva et al, 1999a)

A ossificação endocondral é um processo que envolve uma série de eventos que incluem: a evolução dos condrócitos da zona de repouso por uma série de fenótipos intermédios, a sua proliferação, pre-hipertrofia, diferenciação, hipertrofia, e morte por apoptose, a produção de matriz extracelular, a mineralização da matriz extracelular, a invasão vascular, a degradação/remoção da matriz extracelular, e, finalmente, a formação de osso primário (Pines e Hurwitz, 1991; Orth e Cook, 1994; Figura 2.2). A duração deste processo é variável, e, por exemplo, no caso de frangos de carne, os condrócitos podem mover-se do topo da placa de crescimento até à parte inferior em menos de 24 horas, enquanto em coelhos, este processo pode demorar cerca de 4 dias (Sissons, 1953; Thorp, 1988).

Durante o desenvolvimento do embrião, a maioria dos ossos do esqueleto apresenta um molde formado por cartilagem que é gradualmente substituída por osso. O processo inicia-se com a condensação de células do mesênquima que actuam como modelo para o desenvolvimento futuro. O osso endocondral forma-se após uma série de alterações programadas na cartilagem preexistente. Numa primeira fase, e após intensa proliferação e secreção dos componentes da matriz extracelular, os condrócitos hipertrofiam-se, continuando a secretar novos componentes da matriz. Esta, é então mineralizada pelas vesículas da matriz, originadas nas membranas citoplasmáticas, e, em seguida, os condrócitos morrem, por um processo apoptótico, o que deixa espaços vazios entre os septos de cartilagem mineralizada. Entretanto, estes espaços são invadidos por vasos sanguíneos e por tecido perivascular adjacente. Este tecido perivascular adjacente contém células do mesênquima que, entretanto, se diferenciam em osteoblastos, os quais, por sua vez, vão secretar a substância osteóide que mineraliza rapidamente, nos septos de cartilagem calcificada. Este complexo de osso formado de novo com uma parte central de cartilagem calcificada é denominado esponjosa primária. No estágio final da sua diferenciação, os condrócitos e a matriz cartilágnea, são substituídos por osteoblastos e matriz óssea, respectivamente (ver Cancedda et al, 1995).

## **2.1 Características da placa de crescimento**

A cito-arquitectura estrutural da placa de crescimento permanece inalterada desde as primeiras fases embrionárias até à maturidade do esqueleto. A população celular da placa de crescimento é composta essencialmente por condrócitos, dispostos em colunas paralelas ao eixo axial do osso. Estas colunas de células representam as unidades histogénicas e funcionais do crescimento longitudinal dos ossos (Kember e Walker, 1971). Caminhando do limite epifisário para o limite metafisário, a placa de crescimento apresenta, basicamente, 3 zonas (a terminologia varia segundo os autores; Figura 2.2): (i) zona de reserva, ou de repouso, que contém células estaminais; (ii) zona de proliferação, em que as células são achatadas; e (iii) zona de hipertrofia (que pode subdividir-se em zona de maturação/transição, zona de degeneração e zona de calcificação), em que os condrócitos estão hipertrofiados.

ZONAS/ESTRUTURAS/CÉLULAS		HISTOLOGIA	FUNÇÕES/EVENTOS	
Epífise óssea secundária				
Condrócitos	Zona de reserva		- Produção de matriz - Armazenamento	
	Zona de proliferação		- Produção de matriz - Proliferação celular (crescimento longitudinal)	
	Zona de Hipertrofia		Zona de maturação	- Estimulação da produção de matriz e atraso na diferenciação - Preparação da matriz para a mineralização
			Zona degenerativa	
Zona de mineralização			- Apoptose dos condrócitos - Mineralização da matriz - Estimulação da invasão vascular e reabsorção da matriz	
Osteoblastos, Osteoclastos e Capilares	Metáfise		Zonas de ossificação	- Invasão vascular e reabsorção dos septos transversais - Formação de osso
		Remodelação óssea: interna: remoção das colunas de cartilagem, substituição das fibras ósseas por osso lamelar externa: afunilamento		

**Figura 2.2** Zonas da placa de crescimento e eventos que se verificam na ossificação endocondral (Adaptado de Netter, in McCarthy e Frassica, 1998 e de Grumbach, 2000)

A placa de crescimento começa no início da zona de reserva e termina no último septo transversal intacto (Figura 2.2). Os condrócitos da placa de crescimento evoluem, assim, através de uma complexa série de eventos ao longo do seu ciclo de vida, os quais, provavelmente, representam estádios de diferenciação que envolvem fenómenos morfológicos e bioquímicos distintos (Figura 2.2). Os condrócitos das diferentes zonas da placa de crescimento diferem no seu estado de diferenciação, morfologia, secreção de componentes da matriz extracelular e actividades de várias enzimas (Ben-Bassat et al, 1999). Por exemplo, o colagénio de tipo II é sintetizado pelos condrócitos no estágio proliferativo, enquanto a actividade da fosfatase alcalina e as sínteses de colagénio de tipo X e de osteopontina estão restringidas às células hipertróficas (ver Loveridge et al, 1992).

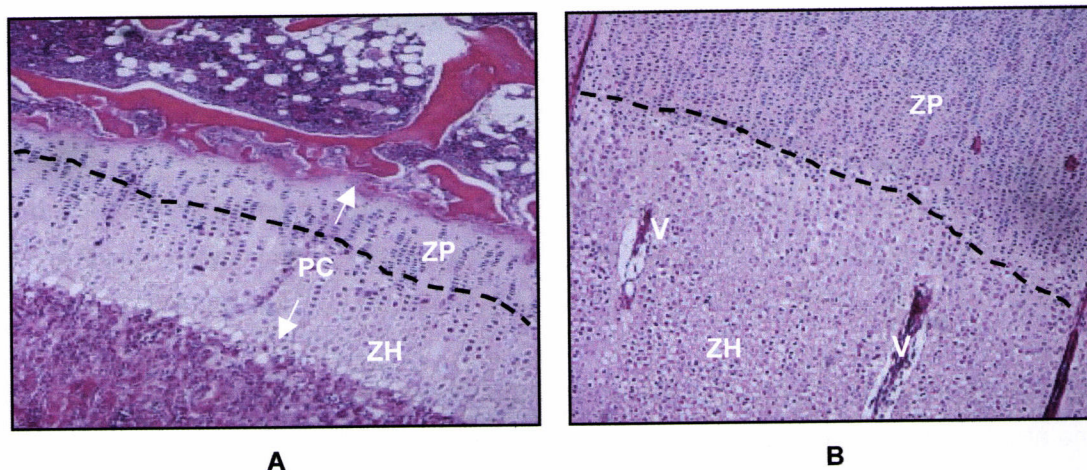
Os condrócitos das diferentes regiões mostram uma morfologia celular variada bem como diferentes actividades químicas, incluindo a secreção de vários componentes da matriz extracelular e actividades de várias enzimas (Loveridge et al, 1992). O crescimento longitudinal dos ossos ocorre, assim, como consequência da proliferação e da hipertrofia dos condrócitos da placa de crescimento, num processo que se inicia com a divisão das células estaminais no topo de cada coluna para produzir as células da zona de proliferação. Os condrócitos desta zona vão-se dividindo, até que, após um número finito de mitoses (Hunziker, 1988), e em resposta a um qualquer sinal, a proliferação cessa, iniciando-se a hipertrofia das células (Pines e Hurwitz, 1991).

As zonas da placa de crescimento, representam uma progressão ordenada de condrócitos de um estágio de proliferação, com uma elevada taxa mitótica, até um estágio de hipertrofia, com um acentuado incremento no tamanho das células e uma intensa actividade de secreção dos componentes da matriz extracelular. O estágio final corresponde a uma actividade de degeneração associada à remoção, através de células especializadas, transportadas pelos vasos sanguíneos que penetram a partir da metáfise. Embora estas zonas anatómicas da placa de crescimento sejam definidas por uma terminologia que implica zonas estruturais e funcionais discretas, na realidade, verifica-se uma transição gradual entre os componentes celulares que as constituem (Pines e Hurwitz, 1991). Cada condrócito, uma vez formado, permanece numa localização espacial definida ao longo do seu ciclo de vida celular e acompanha todas as suas funções fisiológicas no mesmo local (Pines e Hurwitz, 1991). Embora uma célula possa desenvolver várias das suas actividades em simultâneo, uma destas usualmente predomina durante uma fase particular da sua vida.

As placas de crescimento de aves (ver Kember et al, 1990; Barreto e Wilsman, 1994) e mamíferos (ver Howell e Dean, 1992; Kirkwood e Kember, 1993), são, basicamente, similares (Figura 2.3). As diferenças mais marcadas são: (i) nas placas de crescimento das aves aparecem longas colunas de células sem uma orientação bem definida, particularmente nas zonas de hipertrofia e de mineralização; um arranjo colunar é visível apenas na zona de



proliferação, mas nas zonas de hipertrofia e de calcificação as colunas de células são de difícil diferenciação. Pelo contrário, nas placas de crescimento de mamíferos o arranjo colunar é perfeitamente visível em todas as zonas; (ii) todas as zonas da placa de crescimento das aves são mais altas; é maior o número de células em cada uma delas: as placas de crescimento de frangos de estirpes de rápido crescimento, por exemplo, em indivíduos com 4-7 semanas, apresentam cerca de 200 células por coluna (Howlett, 1979), enquanto as de ratos, na fase de crescimento mais rápido, 6 semanas aproximadamente, apresentam cerca de 25 células (Kember, 1960); e (iii) os vasos sanguíneos são mais largos e penetram mais profundamente, nas placas de crescimento das aves, e em consequência, colunas de condrócitos estendem-se pela metáfise (Barreto e Wilsman, 1994).



**Figura 2.3** Placas crescimento (PC) de mamífero (A – rato; Capela e Silva et al, 1999b) e ave (B – galinha; Capela e Silva et al, 2002). As placas de crescimento das aves contêm colunas de células mais longas, orientadas aleatoriamente. Repare-se nas diferenças de tamanho entre as PC e de cada uma das zonas de proliferação (ZP) e de hipertrofia (ZH). Nas PC de aves encontram-se mais células em cada zona e os vasos sanguíneos (V) são mais evidentes e penetram mais profundamente na PC (H&E, X40).

A organização da estrutura histológica das placas de crescimento é crescente filogeneticamente (Leach e Lilburn, 1992), isto é:

Mamíferos > Aves > Répteis

Por outro lado, dentro das espécies, as estirpes de rápido crescimento, apresentam uma maior desorganização e a calcificação da matriz é irregular (Leach e Lilburn, 1992; Starck, 1996). No entanto, e pese embora estas diferenças estruturais existentes entre as placas de crescimento de aves e mamíferos, a cartilagem que as constitui é muito similar, aos níveis celular e molecular, o que sugere mecanismos fisiológicos de controlo semelhantes (Thorp et al, 1993). Assim, e de uma maneira geral, podemos dizer que as principais diferenças inter-específicas e intra-específicas nas placas de crescimento têm a ver com o número, o tamanho e a densidade de células em cada zona, ou com a substituição da zona hipertrófica por uma zona de

fibrocartilagem (Kirkwood et al, 1989; Kember et al, 1990; Pines e Hurwitz, 1991; Kirkwood e Kember, 1993; Barreto et al, 1994).

### **2.1.1 Zona de reserva**

A função da zona de reserva (ou de repouso) não é ainda bem clara, embora o elevado conteúdo em lípidos e vacúolos faça supor uma função de reserva destes materiais para necessidades futuras (Brighton, 1978; Orth e Cook, 1994). A zona de reserva caracteriza-se por uma distribuição esparsa de células isoladas, ou em pares, no seio de uma matriz abundante (Alberty, 1993). Ultra-estruturalmente, as células contêm grandes quantidades de retículo endoplasmático, situação característica duma síntese proteica activa, e possuem grandes quantidades de lípidos e glicogénio intracelular (Brighton, 1978, 1984; Iannotti, 1990). A zona de reserva não contribui para o crescimento (Brighton, 1978, 1984; Iannotti, 1990), e os condrócitos desta zona não proliferam, ou, se o fazem, é apenas esporadicamente (Kember, 1960). A tensão de oxigénio da zona de reserva é baixa (Brighton e Heppenstall, 1971), o que sugere que os vasos sanguíneos que a atravessam não alimentam a zona por si, embora mais recentemente os resultados de Shapiro et al (1997), em galinha, sugiram que os condrócitos da placa de crescimento, *in vivo*, não sejam deficitários em oxigénio.

A zona de reserva está directamente ligada ao centro secundário de ossificação, na epífise, ou, como acontece nalguns ossos de aves, sem centro secundário de ossificação (por exemplo, a epífise proximal do fémur), imediatamente abaixo da cartilagem articular. Os condrócitos nesta zona são, aproximadamente, do mesmo tamanho do que os condrócitos da zona de proliferação, mas não têm, contudo, uma organização real na matriz circundante (Brighton et al, 1973). As células proliferam esporadicamente e pensa-se servirem como uma fonte de células para a zona de proliferação (Kember, 1963 cit. por Orth e Cook, 1994). A vascularização desta zona é pobre. Aparentemente, as pequenas ramificações da artéria epifisária passam ao longo desta zona através dos canais de cartilagem (Brighton e Heppenstall, 1971). Esta zona contém a menor quantidade de cinzas e proteoglicanos, contudo, é a zona que possui a maior concentração de fibrilas de colagénio, compostas essencialmente por colagénio do tipo II (Orth e Cook, 1994; ver capítulo 2.3).

### **2.1.2 Zona de proliferação**

A zona de proliferação é responsável pelo chamado crescimento aposicional, ou seja, a criação de novas camadas de células. Morfologicamente, esta zona é caracterizada por colunas longitudinais de células achatadas (Brighton e Heppenstall, 1971). Contudo, em aves, e em particular nas estirpes de crescimento rápido das espécies domésticas, a organização colunar é menos evidente do que nas estirpes de crescimento lento (Leach e Lilburn, 1992). Lesser (1888, cit por Alberty, 1993) foi o primeiro a mostrar que a maior parte das mitoses ocorrem nas

células desta zona. Os condrócitos na zona de proliferação são, com poucas exceções, as únicas células na porção cartilaginosa da epífise que se dividem (Kember, 1960, 1971; Farquharson e Loveridge, 1990). A célula do topo de cada coluna é a célula progenitora (célula-mãe) das células que compõem cada coluna (Brighton, 1984).

As funções desta zona são a proliferação celular e a produção de matriz extracelular (Iannotti, 1990; Alberty, 1993). O citoplasma dos condrócitos desta zona, contém grandes quantidades de glicogénio (Brighton, 1978; Iannotti, 1990). Podem observar-se extensas áreas de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, o glicogénio é encontrado em largos campos dispersos na área de Golgi e no retículo endoplasmático, em observação por microscopia electrónica (Holtrop, 1972a). Existe pouca incorporação de enxofre radioactivo ( $^{35}\text{S}$ ), o que sugere que a degradação de proteoglicanos nesta zona é baixa (Brighton, 1978, 1984). A zona de proliferação é ainda caracterizada por elevadas tensões de oxigénio e metabolismo aeróbico.

É hoje aceite que a proliferação celular ocorre principalmente na zona de proliferação, e apenas muito ocasionalmente, na zona de reserva, não tendo ainda sido detectada, em circunstâncias algumas, qualquer actividade proliferativa na zona de hipertrofia (Kember, 1960, 1971; Kember e Walker, 1971; Walker e Kember, 1972a,b; Kember, 1978; Apte, 1988, 1990; Farquharson e Loveridge, 1990). A proliferação na placa de crescimento foi estudada, durante alguns anos, através da marcação das células com timidina tritiada e auto-radiografia de elevada resolução (Alberty, 1993). A timidina é incorporada no DNA sintetizado de novo, via caminho pirimidina (Amano et al, 1959), permitindo, assim, a detecção das células que estão no processo de síntese de DNA. O método usual de medição é o denominado Índice de Marcação (*Labeling Index*; Kember, 1971), ou seja, a percentagem de células marcadas num indivíduo sacrificado cerca de uma hora após a administração do marcador, isto é, antes de qualquer célula na fase-S se ter dividido. O índice de marcação está relacionado quer com a taxa de proliferação, quer com a duração da fase-S (Kember, 1971). Entretanto, foi desenvolvida uma técnica imunohistoquímica, mais rápida e não radioactiva, baseada no uso de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) na marcação das células. O BrdU, similar à timidina, é um nucleótido modificado, que se incorpora no DNA sintetizado de novo durante a fase-S do ciclo celular (Goz, 1977; Ricciardi et al, 1988). O BrdU pode depois ser localizado usando um anticorpo monoclonal específico (Gratzner, 1982). A marcação por BrdU tem sido usada em estudos de proliferação em osso, calcificado e descalcificado, e em cartilagem (Apte, 1988, 1990; Farquharson e Loveridge, 1990). Outro marcador de proliferação muito utilizado é o *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), o qual se expressa da parte final da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Hall et al, 1990).

O crescimento longitudinal da placa de crescimento é resultado do número de divisões celulares na zona de proliferação, da altura dos condrócitos da região mais inferior da zona de

hipertrofia e da produção de matriz (Kember, 1960, 1971, 1978). A produção celular, por sua vez, está dependente da taxa de divisão das células em proliferação e do número de células na zona de proliferação (Kember, 1971; Walker e Kember, 1972b). Existe, igualmente, uma variação diurna na taxa de proliferação (Kember e Walker, 1971; Stevenson et al, 1990). Outros autores (Seinsheimer e Sledge, 1981; Kirkwood e Kember, 1993), referem que existe uma correlação significativa entre a taxa de crescimento e altura da placa de crescimento, e taxa de divisão celular. Alguns estudos indicam que um incremento no volume ou na altura dos condrócitos pode ser o factor determinante da taxa de crescimento dos ossos longos (Hunziker e Schenk, 1989; Breur et al, 1991, 1997), uma vez que se observou, durante uma desaceleração do crescimento, um decréscimo simultâneo na altura e no volume das células e na taxa de proliferação (Hunziker e Schenk, 1989). Estudos com timidina tritiada ou BrdU, em ratos e murganhos, durante o crescimento, mostraram que, após um período inicial de crescimento activo, o índice de marcação decresce com o avanço da idade, o que significa uma redução na taxa de proliferação celular (Walker e Kember, 1972a; Farquharson e Loveridge, 1990). O tempo que um condrócito leva para passar do estágio de proliferação para o estágio de fenótipo de diferenciação terminal depende da espécie considerada e é de aproximadamente 21 horas em frangos de carne (Thorp, 1988), 20 dias no Homem e 2 dias no rato (Kember e Sissons, 1976).

O controlo da proliferação dos condrócitos da placa de crescimento é regulado por factores extrínsecos e factores intrínsecos, designadamente, por factores genéticos (Kember, 1971, 1978), endócrinos, nutricionais e mecânicos (Hunziker e Schenk, 1989; Loveridge e Noble, 1994). Embora os factores de crescimento locais e sistémicos desempenhem um papel importante (Kember, 1971; Brighton et al, 1992 cit por Albery, 1993), os seus efeitos exactos na proliferação celular estão, no entanto, ainda mal esclarecidos (ver capítulo 2.2).

A zona de proliferação é a que tem a mais elevada percentagem do volume total de matriz extracelular da placa de crescimento (Alini et al, 1992; Buckwalter et al, 1986). Os seus componentes essenciais são o colagénio de tipo II e o agrecano, proteoglicano composto por um conjunto de proteínas nas quais as cadeias de glicosaminoglicano se encontram ligadas covalentemente (Orth e Cook, 1994; ver capítulo 2.3).

### **2.1.3 Zona de hipertrofia**

Na zona de hipertrofia verifica-se o chamado crescimento intersticial, caracterizado pelo incremento no tamanho das células existentes, começando a diferenciação dos condrócitos imediatamente após terminar a proliferação (Breur et al, 1991). Na zona de hipertrofia as células achatadas da zona de proliferação tornam-se esféricas e aumentam bastante de tamanho (Brighton, 1978, 1984; Iannotti, 1990), devido, pelo menos numa primeira fase, e aparentemente, a um aumento de volume do núcleo e do citoplasma (Holtrup, 1972b;

Buckwalter et al, 1986). A zona começa onde os condrócitos começam a alterar a forma e termina na junção cartilagem-osso. A zona de hipertrofia subdivide-se, tradicionalmente, em três camadas: a zona de maturação, a zona de degeneração e a zona de calcificação provisional (Brighton 1978, 1984). No estágio terminal de hipertrofia, a altura e o volume médios das células aumentam cerca de 4-10 vezes, respectivamente, verificando-se igualmente um aumento, de cerca de 3 vezes, no volume médio de matriz por célula (Hunziker et al, 1987; Noonan et al, 1998; Vanky et al, 1998). Antes da alteração no tamanho ocorrem igualmente algumas alterações metabólicas (Orth e Cook, 1994). No interior da célula verificam-se alterações anatómicas, uma vez que, pelo menos aparentemente, o mesmo número de organelos ocupa agora um espaço muito maior (Poole et al, 1989), havendo evidências claras da hipertrofia dos organelos (Buckwalter et al, 1986; Hunziker et al, 1987). Por outro lado, o ambiente que circunda as células começa a ficar anaeróbico e com falta de nutrientes. Deste modo, as células iniciam a glicólise anaeróbica, utilizando as reservas de glicogénio como fonte energética (Brighton e Heppenstall, 1971). O incremento da expressão e da actividade da colagenase na zona de hipertrofia possibilita a expansão das células degradando a matriz pericelular e facilitando a penetração vascular pela quebra do colagénio na matriz extracelular (Blair et al, 1989; Dean et al, 1990). Em microscopia óptica, os condrócitos na região inferior da zona de hipertrofia aparecem vacuolizados, e perto da base da zona, a vacuolização aumenta, verificando-se a fragmentação nuclear (Brighton, 1978). Por observação em microscopia electrónica, esses condrócitos parecem degenerados, e a última célula de cada coluna parece não viável, apresentando uma acentuada fragmentação da membrana celular e do envelope nuclear, e a perda de componentes citoplasmáticos (Brighton et al, 1973). Existem evidências que os condrócitos, na parte inferior da zona de hipertrofia, evoluem para uma situação de apoptose (Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995; Zenmyo et al, 1996; Ohyama et al, 1997; Silvestrini et al, 1998), embora outros trabalhos mostrem, utilizando outras técnicas de fixação, que preservam a citologia da célula (Holtrop, 1972a,b; Hunziker et al, 1984; Buckwalter et al, 1986; Hunziker et al, 1987), que as células no estágio de hipertrofia não degeneram e, provavelmente, continuam metabolicamente activas (Hunziker et al, 1982, 1984, 1987; Cowel et al, 1987). Em qualquer dos casos, os vasos sanguíneos penetram ao longo destas células, conduzindo as células endoteliais e fagocitárias (condroclastos ou macrófagos) da região metafisária, após o que os osteoblastos depositam osso sobre a cartilagem calcificada, sendo esta matriz, eventualmente, reabsorvida e substituída por osso trabecular (Lewinson e Silbermann, 1992).

Vários estudos sobre a taxa de crescimento longitudinal do osso têm-se concentrado nas alterações do volume dos condrócitos hipertróficos. Nos mamíferos, existe uma relação linear entre a altura vertical dos condrócitos hipertróficos na direcção do crescimento, e a taxa de crescimento do osso (Farquharson e Jefferies, 2000). Esta variação, na altura das células, reflecte-se nas diferentes taxas de crescimento entre espécies, e também nas diferentes taxas de crescimento que ocorrem nas epífises do mesmo osso (Hunziker et al, 1987; Breur et al,

1991). Esta relação contudo, não se verifica nas aves e é a altura da placa de crescimento que está relacionada com a taxa de crescimento longitudinal do osso (Thorp, 1988). Por outro lado, vários estudos dão indicações que a variação no tamanho dos condrócitos hipertróficos nas diferentes espécies de aves é pequena e o factor determinante para a taxa de crescimento é o tamanho das células em proliferação na placa de crescimento (Kirkwood et al, 1989; Kember et al, 1990).

A função da zona de hipertrofia é preparar a matriz para a calcificação (Brighton, 1978, 1984; Iannotti, 1990). Participa igualmente na regulação do crescimento longitudinal pois foi observada a variação no tamanho dos condrócitos da parte inferior da zona, durante diferentes modos de crescimento (Hunziker e Schenk, 1989; Breur et al, 1991). O controlo da hipertrofia dos condrócitos da placa de crescimento, tal como acontece na fase de proliferação, é regulado por factores extrínsecos e factores intrínsecos (Cancedda et al, 1995; Croucher e Russel, 1999). No entanto, os seus efeitos exactos na hipertrofia celular não estão, ainda, totalmente esclarecidos (ver capítulo 2.2).

No que diz respeito à matriz extracelular, associado ao fenótipo hipertrófico, observa-se um incremento na actividade da fosfatase alcalina membranar, na síntese de colagénio de tipo X (Kielty et al, 1985), no decréscimo, e depois na ausência, da síntese de colagénio de tipo II, na secreção de osteonectina e osteopontina e na expressão do receptor da vitamina D (Farquharson e Jefferies, 2000; ver capítulo 2.3).

## **2.2 Diferenciação dos condrócitos**

Os eventos celulares e moleculares que regulam a progressão ordenada dos condrócitos na placa de crescimento, através dos diferentes estádios de proliferação, diferenciação/hipertrofia, e maturação, estão sob um preciso controlo espacial e temporal, que inclui inúmeros factores, extrínsecos e intrínsecos. Até muito recentemente pensava-se que o metabolismo da placa de crescimento era essencialmente controlado por hormonas sistémicas, em particular a hormona do crescimento (Leach e Twal, 1994; ver Hurwitz e Pines, 1992 e Williams et al, 1998). No entanto, sabe-se hoje, que factores de crescimento peptídicos, produzidos localmente, desempenham importantes papéis autócrinos e parácrinos, no normal funcionamento da placa de crescimento (Leach e Twal, 1994). Três classes principais destes factores de crescimento têm sido associadas com a proliferação, a diferenciação e a maturação dos condrócitos da placa de crescimento (Cancedda et al, 1995; Croucher e Russel, 1999): a família do *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$  e moléculas relacionadas, incluindo as *bone morphogenetic proteins*, BMP; Kabasawa et al, 1998; Schwartz et al, 1998; Bailón-Plaza et al, 1999; Reddi, 2000 a,b); a família do *fibroblast growth factor* (FGF; Ornitz, 2001; Liu et al, 2002; Rozenblatt-Rosen et al, 2002); e a família do *insuline-like growth factor* (IGF), incluindo a insulina (O'Keefe et al, 1994; Hill e Logan, 1992; Henson et al, 1997). Outros factores de

crescimento peptídicos, hormonas e moduladores solúveis, que participam na diferenciação e no metabolismo da cartilagem incluem o ácido retinóico, o ácido ascórbico, hormonas da tiróide, hormonas esteróides, metabolitos da vitamina D<sub>3</sub>, hormona do crescimento, hormona da paratiróide (PTH, *parathyroid hormone*), o *platelet-derived growth factor* (PDGF), a transferrina, a condromodulina (Chm), e o *retinoic acid-induced heparin-binding growth factor* (RIHB) (ver revisões em Price e Russel, 1992; Leach e Twal, 1994; Cancedda et al, 1995; Hickok et al, 1998; Hering, 1999; Orth, 1999; Cancedda et al, 2000; Shum e Nuckolls, 2002). Para além destes, existem ainda outros factores que parecem interferir nestes processos, designadamente o proto-oncogene *c-myc* (Farquharson et al, 1992; Loveridge et al, 1993; Cancedda et al, 1995), o *parathyroid hormone related peptide* (PTHrP; Vortkamp et al, 1996; Medill et al, 2001), o *Indian Hedgehog* (Ihh; Vortkamp et al, 1996) e a tubulina-β (Farquharson et al, 1999). Por outro lado, sabe-se que factores nutricionais (Loveridge e Noble, 1994; Nap e Hazewinkel, 1994) e factores mecânicos (Hunzinker e Schenk, 1989; Hering, 1999; Ohashi et al, 2002), também influenciam a normal diferenciação dos condrócitos. Existem igualmente evidências da importância, para a diferenciação dos condrócitos, de proteínas que medeiam as interacções célula-célula, designadamente da família das caderinas (Hickok et al, 1998; Woodward e Tuan, 1999), e de proteínas que medeiam as interacções célula-matriz extracelular, em particular as da família das integrinas (Hirsch et al, 1997; Svoboda, 1998; Hering, 1999; Loeser, 2000, 2002).

O destino dos condrócitos diferenciados não está ainda bem esclarecido. É aceite, contudo, que estes devem ser removidos para assegurar a homeostase da placa de crescimento (ver Blair et al, 2002). Considerou-se, durante muito tempo, que os condrócitos diferenciados morriam por necrose mas, sabe-se agora não ser assim (Farquharson e Jefferies, 2000). Segundo vários autores, os condrócitos diferenciados podem rediferenciar-se em células ósseas (Cancedda et al, 1995; Roach et al, 1995; Takechi e Itakura, 1995; Gerstenfeld e Shapiro, 1996; Roach e Erenpreisa, 1996; Roach, 1997), proliferarem, morrendo uma das células-filha enquanto a outra se rediferencia tornando-se um osteoblasto (Roach et al, 1995; Roach e Erenpreisa, 1996), ou morrerem por apoptose (Farnum e Wilsman, 1987; Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995; Takechi e Itakura, 1995; Roach, 1997). Contudo, parece que, em condições normais, o estágio final da diferenciação da maior parte dos condrócitos hipertróficos é a sua morte por apoptose (Gibson, 1998; Blair et al, 2002).

O termo “apoptose” foi referido pela primeira vez há cerca de 28 anos, para descrever uma forma de morte celular manifestamente diferente da necrose (ver Kerr et al, 1972). Ao contrário da necrose, uma forma passiva de morte celular, a apoptose é um processo no qual a célula participa activamente na sua própria morte (Verhaegen, 1998). A apoptose é um processo activo, com controlo endógeno da morte celular, envolvendo a expressão de um conjunto específico de genes, enquanto a necrose é um processo passivo, e envolve a lise celular causada por agentes externos (Kerr et al, 1972; Gerschenson e Rotello, 1992). A apoptose

caracteriza-se por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas típicas, que a diferenciam da necrose (Allen et al, 1997). Estas alterações típicas incluem: (i) a condensação cromatínica e a degradação internucleossómica de DNA, através da acção de várias endonucleases [Compton, 1992; Schwartzman e Cidlowski, 1993; Esta ruptura internucleossomal do DNA, que origina fragmentos com uma dimensão múltipla de 180-200bp, traduz-se num padrão electroforético típico em “escada” (do inglês, *ladder*), marca característica da apoptose, e que permite distingui-la da necrose (Compton, 1992)]; (ii) a destruição do citosqueleto; (iii) modificações da membrana citoplasmática, com projecções em forma de bolha (do inglês, *blebs*); e, (iv) exposição de fosfatidilserina (Sambade, 1999). Este processo culmina na fragmentação da célula nos chamados “corpos apoptóticos” com membranas, interna e externa, bem preservadas. Estes corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados pelas células do parênquima adjacentes ou por macrófagos. É nestes aspectos que a apoptose difere da necrose, processo no qual a célula fica rapidamente entumescida, perde a integridade da membrana, resultando na drenagem do conteúdo celular no seu ambiente, o que, geralmente, leva a uma resposta inflamatória, não observada na apoptose (Verhaegen, 1998), e a eventuais modificações tecidulares permanentes (Sambade, 1999). Por outro lado, e duma maneira geral, a apoptose afecta as células individualmente, numa região particular, enquanto a necrose afecta grupos de células (Kerr et al, 1972). A eliminação de uma célula por apoptose é um fenómeno rápido, e o período de trânsito desde o início da retracção da célula até à fagocitose dos corpos apoptóticos, pode ser inferior a 30 minutos (Verhaegen, 1998). Deste modo, um número significativo de células pode ser eliminado num período de tempo relativamente curto sem deixar sinais visuais, o que faz diminuir as hipóteses de detectar células apoptóticas numa amostra de tecido (Verhaegen, 1998).

Pese embora o potencial interesse na apoptose, como mecanismo responsável pela destruição dos condrócitos hipertróficos diferenciados, não têm sido publicados muitos trabalhos sobre o assunto (Cancedda et al, 1995; ver Gibson, 1998). Vários trabalhos (Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995; Zenmyo et al, 1996; Ohyama et al, 1997; Silvestrini et al, 1998), no entanto, referem que, à medida que a matriz mineraliza, os condrócitos hipertróficos atingem um estágio de diferenciação caracterizado pela sua morte apoptótica, com o objectivo de serem removidos e, assim, ser mantida a homeostase da placa de crescimento. Adicionalmente, em trabalhos sobre ultra-estrutura, foi observado que os condrócitos hipertróficos na cartilagem articular de ratos jovens, são desintegrados por apoptose (Lewinson e Silberman, 1992). Por outro lado, Aeschlimann et al (1993) observaram, em condrócitos perto da diferenciação terminal, a expressão da transglutaminase, uma enzima associada com a ocorrência de apoptose, e Gibson et al (1997), observaram, *in vitro*, que o início da diferenciação hipertrófica resultou, alguns dias mais tarde, na apoptose dos condrócitos, enquanto a inibição da diferenciação hipertrófica resultou na inibição da apoptose.



Vários trabalhos, contudo, sugerem que a fragmentação do DNA ocorre mais cedo na diferenciação, e é muito mais extensa (Aizawa et al, 1997; Hatori et al, 1995; Ohyama et al, 1997). Ohyama et al (1997), observaram, em placas de crescimento de galinha, imunomarcção TUNEL positiva (do inglês, *Tdt mediated dUTP-biotin nick end labeling*), em cerca de 44% dos condrócitos pos-mitóticos e em cerca de 15% dos condrócitos da zona de proliferação. Por seu lado, Aizawa et al (1997) observaram, em placas de crescimento de coelhos, células TUNEL-positivas na parte superior da zona de hipertrofia, e também nas zonas de reserva e de proliferação.

A apoptose foi sendo vista como um mecanismo passivo, contudo, são cada vez mais as evidências que sugerem que este processo de morte celular deve desempenhar um papel mais activo nos eventos envolvidos na ossificação endocondral. Com efeito, uma vez que a apoptose de um dado condrócito ocorre na interface da transição da cartilagem para o osso, no centro duma região onde uma variedade de rápidas alterações na estrutura do tecido e na actividade celular devem estar coordenadas, parece lógico pensar que a apoptose dos condrócitos deve desempenhar um papel activo e fulcral naqueles eventos (Gibson, 1998). Embora haja poucas evidências directas de comunicação entre os condrócitos hipertróficos e outras células associadas com a osteogénese, alguns trabalhos referem a acumulação de hormonas sistémicas, bem como de citocinas e factores de crescimento, na fase final da hipertrofia dos condrócitos e que a sua libertação, ou activação, pode ser iniciada pelo processo de apoptose dos condrócitos (Gibson, 1998). Adicionalmente, existem evidências da importância da apoptose no processo de mineralização. A diminuição da função mitocondrial observada nos condrócitos num estágio de hipertrofia mais avançado, sugere alterações apoptóticas que podem funcionar como sinal para o movimento do cálcio das reservas mitocondriais nos septos longitudinais (Amling et al, 1997). Por outro lado, com base na sua morfologia similar, e na proximidade da apoptose dos condrócitos à região de mineralização da matriz, foi sugerido que os corpos apoptóticos dos condrócitos possam ser uma fonte de vesículas da matriz na nucleação e na mineralização da cartilagem de crescimento (Anderson, 1995).

A invasão da cartilagem em crescimento por células vasculares é uma parte essencial no processo de ossificação endocondral. No entanto, não se sabe ainda se a apoptose dos condrócitos hipertróficos é o estímulo para o recrutamento dos vasos sanguíneos e das células especializadas na reabsorção da matriz, ou, se pelo contrário, é a invasão dos vasos sanguíneos o sinal para a morte dos condrócitos e para os passos subsequentes, transmitindo os sinais reguladores celulares e/ou humorais adequados (Gerber et al, 1999). Já em 1987 Floyd et al, sugeriam uma relação entre a vascularização da cartilagem e a apoptose dos condrócitos hipertróficos, identificada por condensação nuclear, e, mais recentemente, Bronckers et al (1996) mostraram que a invasão das lacunas, pelos vasos sanguíneos, apenas é possível após os condrócitos hipertróficos terminais entrarem em apoptose. A apoptose dos

condrócitos parece ser também importante no processo de reabsorção da cartilagem associada à ossificação endocondral. Várias proteínases, incluindo as metaloproteínases (MMPs), colagenases 1 (MMP-1 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e a estromalisina (MMP-3) (Brown et al, 1989), mostraram concentrar-se em elevadas concentrações nos condrócitos hipertróficos, ou na sua matriz adjacente, na interface vascular. A apoptose dos condrócitos, e a activação associada da cascata proteolítica das caspases (família de proteases responsáveis pelas alterações degradativas próprias do processo apoptótico), que foram detectadas em paralelo com a expressão das MMPs (Lund et al, 1996), pode ser um dos mecanismos para a activação das MMPs (Gibson, 1998), enzimas fundamentais na degradação local, rápida, e quase completa, do complexo de proteínas que constituem a matriz extracelular (Gibson, 1998). Adicionalmente, Vu et al (1998), observaram um atraso na ocorrência da apoptose dos condrócitos hipertróficos, em ratos deficientes em gelatinase B (MMP-9), e Bronckers et al (2000) sugerem que a apoptose dos condrócitos funciona como um sinal para a sua remoção pelos osteoclastos.

### **2.3 Matriz extracelular da placa de crescimento**

A constituição da matriz extracelular está intimamente relacionada com as funções inerentes a cada tecido, as quais estão, em última análise, dependentes da diferenciação das células nelas existentes (Cidadão e Rodrigo, 1999). São estas células que sintetizam, depositam e degradam, de um modo bem controlado, os vários componentes da matriz extracelular (Cidadão e Rodrigo, 1999). Cada nível de diferenciação das células é caracterizado por um padrão de desenvolvimento de expressão génica específico, que assegura a deposição de novos componentes da matriz e a síntese de factores que regulam este processo (Ducy e Karsenty, 1998). No entanto, se as células influenciam a organização dos componentes da matriz que sintetizam, é também verdade que a matriz extracelular influencia o comportamento das células (Cidadão e Rodrigo, 1999; Scully et al, 2001). A existência desta relação biunívoca células-matriz é uma clara demonstração de que o âmbito das funções desempenhadas pela matriz extracelular se estende muito para além de um papel estrutural, envolvendo a regulação de fenómenos biológicos tão fundamentais como adesão, migração, proliferação, diferenciação e apoptose (Shi et al, 1998; Cidadão e Rodrigo, 1999; Velleman, 2000). No que diz respeito à placa de crescimento, vários estudos sugerem que a matriz extracelular é capaz de regular a diferenciação dos condrócitos (Solursh et al, 1984; Sommarin et al, 1989; Nathan e Sporn, 1991), e, Farquharson et al (1996), sugerem que o decréscimo da concentração dos reticulados de piridinolina é uma adaptação essencial (através do incremento da actividade da colagenase e da renovação do colagénio) para que ocorra a invasão vascular da matriz e a reabsorção pelos condroclastos e osteoclastos.

Os principais constituintes da matriz da cartilagem são o colagénio de tipo II e proteoglicanos, podendo encontrar-se, ainda, colagénios de outros tipos e outras proteínas não colagénicas

(Poole et al, 1989; Mackie e Murphy, 1998; Hardingham, 1999; Heinegard et al, 1999; von der Mark, 1999). A matriz confere integridade estrutural à placa de crescimento e cada zona contém uma mistura única dos vários tipos de componentes em diferentes concentrações (Farquharson et al, 1996; Noonan et al, 1998).

Os colagénios são os principais constituintes de todas as matrizes extracelulares (Ottani et al, 2001; Exposito et al, 2002). Os colagénios são classificados com base na sua função ou tamanho (van der Rest e Garrone, 1991). De momento, estão descritos 19 diferentes tipos de colagénios, colagénio de tipo I a colagénio de tipo XIX (van der Rest e Garrone, 1991; von der Mark, 1999; Velleman, 2000), distintos tanto na constituição das cadeias  $\alpha$  que os constituem, como na sua capacidade de polimerização, na sua localização e nas suas funções específicas (Brown e Timpl, 1995; Cidadão e Rodrigo, 1999). Estes colagénios têm uma distribuição tecidual específica, uma distribuição temporal e espacial bem definidas, e propriedades funcionais únicas (Farquharson et al, 1996; Velleman, 2000). Os colagénios são, habitualmente, secretados sob a forma de precursores, os procolagénios, sendo estes posteriormente clivados extracelularmente, por intermédio das colagenases, para dar origem às moléculas de colagénio propriamente ditas, os tropocolagénios (Cidadão e Rodrigo, 1999). Existem trabalhos que mostram que estão associados com a cartilagem epifisária cinco tipos de colagénio, geneticamente distintos: os colagénios dos tipos II, VI, IX, X e XI (Pines e Hurwitz, 1991; ver Poole et al, 1989). A proteína estrutural predominante, cerca de 90% do colagénio total na matriz da placa de crescimento (Kuettnner et al, 1991), é o colagénio de tipo II (Farquharson e Jefferies, 2000). É bem sabido, desde há muito, que o colagénio de tipo II ocorre exclusivamente na cartilagem (Mayne e von der Mark, 1983; Linsenmayer, 1991). A distribuição do mRNA do colagénio de tipo II sugere que esta molécula é sintetizada primeiro pelas células da zona de proliferação e pelas células hipertróficas jovens (Pines e Hurwitz, 1991). Relativamente pouco ou nenhum colagénio de tipo II é sintetizado pelos condrócitos hipertróficos maduros, particularmente pelos que estão presentes na cartilagem em calcificação (Sandberg e Vuorio, 1987). O colagénio de tipo II, com uma estrutura em rede fibrilar (Poole et al, 1998), interage com os colagénios de tipo IX, X e XI (Mendler et al, 1989; Chen et al, 1992), para formar as fibrilas hipertróficas, distribuídas ao longo da cartilagem. Por outro lado, o propéptido-C do colagénio de tipo II, igualmente conhecido por condrocalcina, foi encontrado em estreita relação com o colagénio de tipo II nos locais de calcificação e parece acelerar a mineralização (Poole et al, 1989; Leach e Lilburn, 1992). Durante a maturação dos condrócitos, a expressão do colagénio de tipo II decresce, e os condrócitos hipertróficos iniciam a síntese de colagénio de tipo X (Linsenmayer et al, 1998; Farquharson e Jefferies, 2000). O colagénio de tipo X é sintetizado fundamentalmente pelos condrócitos hipertróficos e, por esta razão, está associado aos processos de mineralização, estabilização ou remodelação da matriz e invasão vascular (Kwan et al, 1986, 1989; Chan e Jacenko, 1998). Este é um colagénio de cadeia curta, não fibrilar, que se associa com as fibrilas do colagénio de tipo II, cuja função exacta não é ainda conhecida (Farquharson e Jefferies, 2000), embora se pense que desempenhe papéis

reguladores (Reichenberger et al, 1991) e estruturais (Jacenko et al, 1993) na mineralização. Outros tipos de colagénio, como os de tipo VI, IX e XI foram igualmente assinalados na matriz extracelular da placa de crescimento (Leach e Lilburn, 1992; Henson et al, 1996). O colagénio de tipo VI é um constituinte menor da matriz extracelular, tem uma localização pericelular (Henson et al, 1996), e desempenha funções de suporte e nas interações células-matriz (Aumailley et al, 1989; Bonaldo et al, 1990). As suas síntese e expressão, estão associadas às primeiras fases da diferenciação dos condrócitos *in vitro* (Quarto et al, 1993). Em contraste com os colagénios de tipo II e de tipo X, que têm localizações específicas, o colagénio de tipo IX, por exemplo, está distribuído ao longo da matriz da placa de crescimento (Muller-Glausser et al, 1986), e a sua função é ainda mal conhecida. Quanto ao colagénio de tipo XI, embora seja minoritário na cartilagem, pensa-se que desempenhe um importante papel na regulação do diâmetro das fibrilas e na manutenção da integridade e coesão do tecido (Mendler et al, 1989; Vaughan-Thomas et al, 2001). A síntese dos diferentes tipos de colagénio pelos condrócitos é regulada por factores de crescimento (Redini et al, 1988; Freyria et al, 1999; ver, von der Mark, 1999) e hormonas, nomeadamente a PTH (Pines et al, 1990; Long e Linsenmayer, 1998).

Conjuntamente com os vários tipos de colagénio existem na matriz da placa de crescimento vários proteoglicanos, bem como algumas proteínas não colagénicas (Leboy et al, 1988; Heinegard e Oldberg, 1989; Pacifici et al, 1990; Mackie e Murphy, 1998; Hardingham, 1999; Heinegard et al, 1999; Takagi et al, 2000; Mansson et al, 2001). Os proteoglicanos são macromoléculas compostas por um núcleo central de proteínas, a que estão ligados, covalentemente, vários polissacáridos complexos, os glicosaminoglicanos, polímeros resultantes da repetição de um dissacárido formado por uma N-acetil hexosamina e um ácido urónico, segundo padrões que permitem subdividi-los em várias populações distintas, designadamente: sulfatos de condroitina, sulfatos de queratano, sulfatos de heparano, sulfatos de dermatano, heparina e ácido hialurónico (Pines e Hurwitz, 1991; Cidadão e Rodrigo, 1999), este último, o único não sulfatado e que não se liga covalentemente (Carrino et al, 1999). Ao componente proteico, que, em conjunto com os glicosaminoglicanos, constitui os proteoglicanos, podem associar-se ainda oligossacáridos em número e estrutura variáveis (Cidadão e Rodrigo, 1999). Os proteoglicanos podem, assim, diferir quanto às características da sua porção proteica e/ou ao tipo, número e particularidades dos glicosaminoglicanos e oligossacáridos que possuem (Cidadão e Rodrigo, 1999). Embora numa primeira fase fosse habitual classificar os proteoglicanos com base no tipo de glicosaminoglicano presente, hoje essa classificação baseia-se no tipo de porção proteica que contêm e nas funções que desempenham (Cidadão e Rodrigo, 1999). Os proteoglicanos estão envolvidos numa rede de fibrilas colagénicas, constituídas essencialmente por colagénio de tipo II e pequenas quantidades de colagénio de tipo IX e de tipo X. O colagénio de tipo X está ligado covalentemente ao colagénio de tipo II e alguns trabalhos sugerem que funciona como ponte entre o colagénio e as moléculas de proteoglicanos (van der Rest e Mayne, 1988; Smith e Brandt, 1992). A maturação dos condrócitos que ocorre ao longo da placa de crescimento, é

acompanhada por alterações nos níveis de síntese de proteoglicanos, na proporção dos agregados de proteoglicanos e no tamanho dos monómeros destes (Campo e Romano, 1986). Por exemplo, os condrócitos hipertróficos produzem menos proteoglicanos do que as células das zonas de repouso ou de proliferação (Pawlowski et al, 1987; Makower et al, 1988). A par do colagénio de tipo II, o outro constituinte maioritário na cartilagem é o agregcano, proteoglicano de sulfato de condroitina, cuja porção proteica tem a capacidade de formar agregados com moléculas de ácido hialurónico, e fornecer uma base firme para a matriz elástica e a manter a integridade estrutural durante alterações mecânicas e a regular a concentração catiónica na matriz (Kuettner, 1992; Takagi et al, 2000; Blair et al, 2002). Muitas das propriedades funcionais da matriz da cartilagem são atribuídas à interacção do colagénio de tipo II com o agregcano (Velleman, 2000). Existem trabalhos que indicam que antes, ou em ligação com o início da mineralização da cartilagem da placa de crescimento, ocorrem um decréscimo no tamanho e/ou nos níveis de proteoglicanos e alterações na sua composição. Contudo, outros trabalhos demonstraram que a concentração de proteoglicanos da cartilagem permanece constante antes e após a mineralização (ver Takagi et al, 2000). A quantidade e a estrutura dos proteoglicanos sintetizados pelos condrócitos, são afectados por hormonas e por factores de crescimento (Pines e Hurwitz, 1991; Scully et al, 2001). Diferentes factores de crescimento causam a síntese de proteoglicanos de diferentes tamanhos (Makower et al, 1988). O IGF-I estimula a síntese de proteoglicanos em condrócitos isolados das zonas de repouso e de proliferação, mas não da zona de hipertrofia, enquanto o EGF estimula a síntese de proteoglicanos em todas as zonas da placa de crescimento (Pines e Hurwitz, 1991). O IGF-I (Kemp et al, 1988) e o TGF- $\beta$  (Redini et al, 1988) aumentam a síntese de glicosaminoglicanos dos condrócitos. Por outro lado, a sua degradação é mediada por espécies reactivas de oxigénio através, provavelmente, da conversão das proMMPs nas suas formas activas (Tiku et al, 1999).

## **2.4 Mineralização da cartilagem**

A mineralização da matriz da cartilagem é um fenómeno progressivo associado com a hipertrofia e a maturação dos condrócitos (Leach e Lilburn, 1992). Quer o início, quer a progressão da mineralização da cartilagem parecem ser, pelo menos em parte, controlados pelos próprios condrócitos hipertróficos (Hunziker et al, 1984; Cowell et al, 1987; Iannotti, 1990), estando restringidos à matriz extracelular que os circunda (Ali, 1992), em particular na parte inferior da zona de hipertrofia, aproximadamente a cerca de 100  $\mu$ m da extremidade dos vasos sanguíneos mais avançados (Howlett, 1979). Na cartilagem da placa de crescimento da galinha doméstica, a mineralização é aparentemente controlada pelos condrócitos que se encontram junto aos vasos sanguíneos metafisários, uma vez que estes apresentam um metabolismo oxidativo mais elevado do que as outras células hipertrofiadas (Boyde e Shapiro, 1987). Este mecanismo permite que as células perivasculares transfiram iões de cálcio e de fosfato do sangue para a matriz (Orth e Cook, 1994). Todos os condrócitos se preparam para

este evento armazenando cálcio nas mitocôndrias no início da zona, disponibilizando o cálcio na outra extremidade da zona (Brighton e Hunt, 1978). Os condrócitos aumentam também a sua produção de fosfatase alcalina, enzima importante para a libertação de fósforo na matriz. Seja qual for o mecanismo, parece evidente a necessidade da existência de alguns agentes nucleadores para se iniciar a mineralização, e para que, assim, possa progredir o crescimento dos cristais por acreação espontânea de sais de cálcio em qualquer destes núcleos (Pines e Hurwitz, 1991). Os dois componentes da matriz, que parecem desempenhar o papel de iniciadores da mineralização, são os monómeros de proteoglicanos (Poole et al, 1989) e as vesículas da matriz (Anderson, 1989).

Os condrócitos hipertróficos produzem, quase exclusivamente, colagénio de tipo X e diminuem a sua produção de colagénio dos tipos II e IX (Kielty et al, 1985). O colagénio de tipo X parece ter um importante papel na mineralização ao estabelecer reticulados covalentes com o colagénio de tipo II (Chen et al, 1992). Os resultados de alguns trabalhos sugerem que a interacção entre os colagénios destes dois tipos activa o influxo de  $Ca^{2+}$  nas vesículas da matriz (Kirsch e Wuthier, 1994; Kirsch et al, 2000). No entanto, o facto de ratos *nulls*-colagénio X não apresentarem anomalias evidentes no desenvolvimento dos ossos longos (Rosati et al, 1994), sugere que este tipo de colagénio deve ter um papel mais de suporte, e não estar directamente envolvido na mineralização da cartilagem. Por outro lado, os cristais de hidroxiapatite não apresentam uma orientação espacial consistente relativamente às fibras de colagénio (Pines e Hurwitz, 1991). Outros trabalhos (Poole et al, 1984, 1989), sugerem que a condrocalcina (C-propéptido do colagénio tipo II), sintetizada em primeiro lugar pelas células da zona de proliferação e pelos condrócitos hipertróficos formados recentemente, pode actuar como centro de nucleação para os cristais de cálcio-fósforo.

Muitas outras proteínas da matriz estão envolvidas na mineralização, designadamente, colagénio de tipo I, proteoglicanos, osteonectina e osteocalcina (Poole et al, 1989; Ali, 1992; Sommer et al, 1996; Boskey et al, 2000). No que diz respeito aos proteoglicanos, alterações no seu grau de sulfatação (Farquharson et al, 1994), bem como a perda de densidade dos monómeros na estrutura de ácido hialurónico (Buckwalter, 1983), são eventos envolvidos na mineralização da cartilagem. Estes passos são, provavelmente, necessários, uma vez que o agregano inibe a mineralização *in vitro*, e o seu grande tamanho pode impedir o crescimento de cristais. Refira-se que o crescimento dos cristais é promovido pela disponibilidade em  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ , e pela presença de colagénio, e é retardado pelos inibidores naturais da mineralização, designadamente, proteoglicanos, e muitas proteínas não colagénicas que se ligam ao cálcio, como a osteocalcina, a osteonectina, algumas fosfoproteínas e as  $\alpha$ -2HS-glicoproteínas (Anderson, 1989). Pensa-se que os proteoglicanos menores encontrados nos lugares de mineralização, regulam, mas não iniciam, o processo de mineralização (Boskey, 1992). Verifica-se igualmente uma alteração na biossíntese de sulfato de condroitina levando a um incremento na proporção de condroitina 6-sulfato relativamente à condroitina 4-sulfato,

desconhecendo-se ainda a razão para esta adaptação (Orth e Cook, 1994). De referir, ainda, que a condrocalcina tem uma grande afinidade para a hidroxiapatite e, estudos em culturas de células, sugerem que está igualmente envolvida na nucleação e/ou no crescimento de cristais (Hinek et al, 1987).

Quanto às vesículas da matriz extracelular, são pequenas estruturas vesiculares, que têm origem nas membranas dos condrócitos da zona de hipertrofia (Anderson, 1989). Kirsch et al (1997) referem que os condrócitos hipertróficos conseguem modular qualitativamente a sua produção de vesículas da matriz. Estas vesículas foram descritas pela primeira vez por Bonucci (1967, cit. por Pines e Hurwitz, 1991) e por Anderson (1969, cit. por Pines e Hurwitz, 1991), e são ricas em minerais, fosfatase alcalina, e proteínas de ligação ao cálcio podendo ser encontradas perto, ou nos lugares de mineralização (Wuthier, 1982). Alguns autores sugerem que estas vesículas são os lugares de nucleação para a mineralização da cartilagem (Anderson, 1989, 1995; Boskey, 1981, 1992; Boskey et al, 1997). A formação dos primeiros cristais ocorre nas vesículas da matriz, e alguns autores referem a presença de cristais em formação nas membranas de delimitação das vesículas (ver Poole, 1989). Desde que estejam presentes cristais de apatite na matriz, e que haja quantidade suficiente de cálcio e de fosfato, o crescimento dos cristais progride e a matriz fica preenchida com minerais. No entanto, os resultados de outros trabalhos, sugerem que a função das vesículas da matriz estaria apenas limitada ao suporte do crescimento dos cristais, uma vez que, por um lado, não foi detectada uma fase mineral nas vesículas da matriz (Landis e Glimcher, 1982), e, por outro, estas não foram encontradas nos locais de nucleação (Glimcher, 1989; Poole et al, 1989). Adicionalmente, outros autores referiram que a concentração de vesículas da matriz diminuiu na parte inferior da zona hipertrófica em mineralização (Reinholt et al, 1982; Buckwalter et al, 1986), ao contrário do que seria de esperar se estivessem directamente envolvidas como centros de nucleação, pelo que a mineralização nesta zona não deve estar centrada nas vesículas da matriz (Thyberg, 1974).

A importância potencial das vesículas da matriz não pode, contudo, ser subestimada, particularmente pelo facto de ser nelas que se encontra a fosfatase alcalina, enzima chave associada com, e responsável pelo processo de mineralização (Roach, 1999). Com efeito, a fosfatase alcalina desde sempre foi associada com a mineralização da matriz (Robinson, 1923 cit. por Farquharson e Jefferies, 2000), e uma inibição da actividade desta enzima conduz a falhas no processo de mineralização. O seu papel exacto neste processo não está ainda totalmente esclarecido, mas sabe-se que é capaz de libertar fosfato inorgânico a partir de fosfato orgânico e pirofosfato (Poole et al, 1989; Anderson, 1995). Este fosfato combina-se com o cálcio para produzir, por nucleação e crescimento dos cristais, a hidroxiapatite mineral, numa primeira fase em quantidades significativas na parte inferior da zona de hipertrofia (Poole et al, 1989). A fosfatase alcalina está presente nas membranas plasmáticas e nas vesículas da matriz derivadas de pequenas extensões vesiculares da membrana plasmática, principalmente



na cartilagem em maturação e hipertrófica das placas de crescimento (Anderson, 1989; Ali, 1992; Henson et al, 1995).

Vários factores afectam a mineralização. Os eventos que envolvem a mineralização estão sob controlo hormonal (Pines e Hurwitz, 1991). O 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e o 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> são necessários para a máxima síntese do propéptido-C do colagénio de tipo II (Hinek e Poole, 1988). Por outro lado, o 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é necessário para a máxima expressão da actividade da fosfatase alcalina (Hale et al, 1986; Schwartz et al, 1988), enquanto inibe a fosfolipase A<sub>2</sub> condrocitária, a qual actua nos fosfolípidos da membrana (Schwartz et al, 1988). Foram encontrados receptores para o 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nos condrócitos hipertróficos de coelho (Iwamoto et al, 1989). A hormona da paratiróide inibe a actividade da fosfatase alcalina das vesículas da matriz (Chin et al, 1986). Uma vez que ocorra a nucleação de cristais, a calcificação pode prosseguir resultando no crescimento dos cristais. A taxa deste processo é regulada pelas concentrações de Ca<sup>2+</sup> e HPO<sup>2-</sup><sub>4</sub> e pode ser inibida por várias proteínas da matriz como os proteoglicanos (Dziewaitkowski e Majznerski, 1985), osteocalcina (Romberg et al, 1986), fosfoproteínas e osteonectina (Menanteau et al, 1982). Por outro lado, um dos processos associados à mineralização é a apoptose (Akisaka e Gay, 1985). Existem fortes evidências que sugerem que o *c-myc* pode, igualmente, estar envolvido no processo de mineralização. Sabe-se que o *c-myc* é um forte indutor da apoptose (Evan et al, 1992; Shi et al, 1992) e, deste modo, a diminuição dos seus níveis pode levar a uma falha na formação das vesículas da matriz e, por consequência, da mineralização. Por outro lado, Toury et al (1999) sugerem que a participação do *c-myc* neste processo, passa pela sua interacção com as fibrilhas de colagénio II.

## **2.5 Vascularização na ossificação endocondral**

Durante a formação da placa de crescimento dos ossos longos, existe uma estreita interacção dinâmica, e mutuamente exclusiva, entre as estruturas vasculares em desenvolvimento e a cartilagem, que é um dos tecidos menos vascularizados do organismo (Gerber e Ferrara, 2000). A invasão vascular da cartilagem está associada com a apoptose dos condrócitos hipertróficos, com a mineralização da matriz extracelular, com a sua degradação e com a formação de osso e, por conseguinte, a inibição da angiogénese na placa de crescimento atrasa a morte dos condrócitos, resultando num incremento no número de células e, eventualmente, na sua acumulação (Gerber e Ferrara, 2000). Embora a invasão da cartilagem pelos vasos sanguíneos metafisários seja necessária, não se sabe ainda se é a apoptose dos condrócitos hipertróficos o estímulo para o recrutamento dos vasos sanguíneos, e das células especializadas para a degradação da matriz extracelular, ou se, pelo contrário, é a invasão dos vasos sanguíneos, o sinal para a morte dos condrócitos, e para os passos subsequentes, transmitindo os sinais reguladores celulares e/ou humorais adequados (Gibson et al, 1995, 1997; Gerber et al, 1999).



Trabalhos relativos à análise de secções seriadas sugerem que a morte dos condrócitos ocorre em etapas morfológicas discretas caracterizadas por uma rápida condensação celular, seguida pela penetração das células endoteliais nas lacunas (Farnum e Wilsman 1989). Com efeito, e como foi referido anteriormente, os condrócitos da camada terminal da zona de hipertrofia, localizados na junção condro-óssea, têm uma predisposição para se transformarem em células apoptóticas, após o que os vasos sanguíneos metafisários invadem a cartilagem a partir desta região. A invasão das células endoteliais induz a formação de canais vasculares na camada terminal dos condrócitos apoptóticos, e os novos vasos sanguíneos permitem o acesso das células altamente especializadas envolvidas na regulação da formação do osso. As células osteoblásticas substituem os condrócitos apoptóticos, dão origem à matriz óssea, e passam a ser os mediadores celulares fundamentais no processo de ossificação endocondral. Os outros tipos celulares que participam activamente neste processo, através da reabsorção da matriz extracelular, são os condroclastos e os osteoclastos (ver Suda et al, 1999).

Várias observações indicam que os condrócitos são capazes de sintetizar, quer promotores, quer inibidores da angiogénese, dependendo do estado de diferenciação. A cartilagem em repouso e em proliferação apresenta fortes efeitos anti-angiogénicos (Moses et al, 1990, 1992; Pepper et al, 1991; Hiraki et al, 1997; Cheung et al, 2001). Pelo contrário, os condrócitos hipertróficos expressam uma série de factores promotores da vascularização, designadamente, FGF (*fibroblast growth factor*, Baron et al, 1994), PDGF (*platelet-derived growth factor*, Horner et al, 1996), IGF-I (*insulin growth factor*, Joyce et al, 1991; Ren et al, 1997), EGF (*epidermal growth factor*, Tajima et al, 1994; Ren et al, 1997), membros da família do TGF (*transforming growth factor*, Carrington et al, 1988; Ren et al, 1997; Horner et al, 1998), transferrina (Carlevaro et al, 1997), ESAF (*endothelial cell stimulating angiogenic factor*, McFarland et al, 1990; Brown e McFarland, 1992), VEGF (*vascular endothelial growth factor*, Gerber et al, 1999; Horner et al, 1999; Carlevaro et al, 2000; Ichigatani et al, 2001) e a MMP-9/gelatinase B (Vu et al 1998). No entanto, de modo a manifestarem esta actividade angiogénica, os condrócitos hipertróficos necessitam da presença duma matriz extracelular adequada (Kwan et al, 1991; Descalzi-Cancedda et al, 1995; Alini et al, 1996; Farquharson et al, 1996; Carlevaro et al, 1997; Velleman, 2000).

## **2.6 Reabsorção da cartilagem**

A degradação da matriz extracelular é uma das etapas necessárias para que se complete o processo de ossificação endocondral. Esta tarefa é levada a cabo por células altamente especializadas que, para o efeito, produzem um microambiente ácido adequado e várias enzimas proteolíticas (ver Murphy e Reynolds, 2002).

Antes da sua morte por apoptose, os condrócitos hipertróficos depositam o VEGF na sua matriz extracelular, o qual promove a invasão dos vasos sanguíneos na cartilagem (Gerber et al,

1999). Os vasos sanguíneos transportam as células responsáveis pela remoção da cartilagem mineralizada e pela formação de tecido ósseo. No entanto, essas células não estão ainda bem definidas (Leach e Lilburn, 1992). Silvestrini et al (1979), referem-se a estas células como sendo células indiferenciadas com propriedades macrofagocitárias. Adicionalmente, alguns trabalhos referem que os condrócitos hipertróficos exibem actividade colagenolítica, estando, por isso, igualmente envolvidos na degradação da cartilagem da matriz (Dean et al, 1985; 1989; Sakiyama et al, 1994; Fuller e Chambers, 1995; Gack et al, 1995).

A reabsorção da cartilagem ocorre no limite da transição epífise/metáfise (Nordhal et al, 1998). Neste local, os septos transversais de cartilagem não mineralizada, e parte dos septos longitudinais mineralizados, são reabsorvidos. Foi sugerido que diferentes tipos de células são responsáveis pela quebra da cartilagem mineralizada e não mineralizada (Schenk et al, 1967; Hunziker et al, 1984). Segundo Lee et al (1995), a reabsorção dos septos transversais não mineralizados, o que irá permitir a abertura das lacunas dos condrócitos para a invasão vascular, a partir da metáfise, é feita por umas células especializadas, ricas em catepsina-B, que denominaram de septoclastos. Por seu lado, os septos longitudinais, usualmente calcificados, são, na maior parte das vezes, reabsorvidos por condroclastos/osteoclastos multinucleados (Lewinson e Silbermann, 1992; Nordhal et al, 1998; Shibata e Yamashita, 2001), embora possam estar igualmente envolvidas na reabsorção da cartilagem calcificada, algumas células mononucleadas (Anderson e Parker, 1966; Schenk et al, 1967; Domon e Wakita, 1991; Domon et al, 1994, 1997). Alguns autores (Aceitero et al, 1988; Sire et al, 1990; Huisseume e Sire, 1992), sugerem que os osteoclastos também podem estar envolvidos na reabsorção da cartilagem não calcificada. Uma vez que os condroclastos e os osteoclastos servem os mesmos propósitos, ou seja, a degradação de matrizes, as quais apresentam componentes muito similares, é de esperar que tenham similaridades estruturais e funcionais (Nordhal et al, 1998). Contudo, existem algumas diferenças na composição das matrizes do osso e da cartilagem, o que pode obrigar a diferentes mecanismos de degradação, os quais não estão, ainda, totalmente esclarecidos (Nordhal et al, 1998).

A reabsorção da matriz extracelular, que pode ocorrer intra e extracelularmente (Dingle, 1973), processa-se através duma complexa cascata de eventos proteolíticos na qual intervêm diferentes proteases dum modo concertado. As endopeptidases são enzimas-chave na degradação da matriz extracelular, e, evidências *in vitro*, sugerem que os membros de 4 famílias principais (com metal, serina, cisteína ou aspartato, no sítio activo), podem clivar os componentes individuais da matriz extracelular (ver Clark e Murphy, 1999). Enquanto as glicoproteínas, e as proteínas nucleares dos proteoglicanos, são susceptíveis à maior parte das proteínases, a degradação dos colagénios nativos depende de enzimas colagenolíticas, designadamente, colagensases e outras metaloproteínases da matriz (MMPs) e as catepsinas (Clark e Murphy, 1999).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) representam uma importante família de endopeptidases zinco-dependentes, capazes de degradar os vários componentes essenciais da matriz extracelular, pelo que estão associadas a uma série de condições normais (Edwards et al, 1996; McIntush e Smith, 1998; Shi et al, 1998; Salamonsen, 1999; Vu e Werb, 2000; Chang e Werb, 2001; McCawley e Matrisian, 2001) e patológicas (Kahari e Saarialho-Kere, 1999; Lukes et al, 1999; Wojtowicz-Praga, 1999; Duffy et al, 2000; Chang e Werb, 2001; Parks e Shapiro, 2001; Yong et al, 2001; Lijnen, 2002; Rosenberg, 2002; Vihinen e Kahari, 2002; Beaudoux et al, 2002; Murphy et al, 2002), que envolvem a degradação e a remodelação da matriz extracelular (ver Murphy e Reynolds, 2002). Até ao momento são conhecidas nos vertebrados, pelo menos, 25 MMPs distintas (Woessner, 2002; Whittaker e Ayscough, 2003), as quais, baseadas na sua estrutura e na especificidade dos seus substratos, são classificadas em 5 grupos: colagenases, estromalinas, gelatinases, tipo membranares (MT-MMPs), e outras metaloproteinases, incluindo a matrilisina (Shapiro, 1998; Nagase e Woessner, 1999; Vihinen e Kahari, 2002; Tabela 2.1). Todos os membros da família das MMPs são secretados como proenzimas inactivos, contêm  $Zn^{2+}$  no sítio catalítico, e requerem  $Ca^{2+}$  para a sua total actividade (Reynolds, 1996). A actividade metaloproteásica das MMPs está estreitamente regulada, tanto a nível intracelular como a nível extracelular. A sua produção é regulada por variados factores parácrinos e autócrinos (Rath et al, 1997; Bord et al, 1998; Dreier et al, 2001), sendo induzida por citoquinas, factores de crescimento, hormonas, promotores tumorais, stress físico, transformação oncogénica e por interacções célula-matriz e célula-célula (Reynolds, 1996; Westermarck e Kahari, 1999). A interleucina-1 (Flannery et al, 1999), o ácido retinóico (Nie et al, 1998), o bFGF (Allen et al, 2003), o PDGF (Sasaki et al, 2000a), a  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  (Tetlow e Woolley, 1999) e o  $TNF\alpha$  (Allen et al, 2003), por exemplo, são agentes estimuladores da síntese celular de MMPs, enquanto a heparina (Sasaki et al, 2000b), o  $TGF-\beta$  (Wick et al, 1999; Wang et al, 2002a), metais (Yu et al, 1997; Souza et al, 2000, 2001) e corticóides (Wang et al, 2002b), inibem a expressão das MMPs (ver Kerrigan et al, 2000 e Murphy e Reynolds, 2002). Deve ser referido que embora possam existir os mesmos promotores, os diferentes tipos celulares que exprimem as MMPs podem ter respostas diferentes e, por vezes, contrárias a estes diferentes estímulos (Beaudoux et al, 2003). A activação extracelular das pro-MMPs constitui um segundo nível de controlo. O activador fisiológico principal das MMPs é a plasmina (Murphy et al, 1999; Beaudoux et al, 2003). Uma vez fixada no seu receptor celular, a *urokinase-type plasminogen activator* (uPA), permite a activação do plasminogénio em plasmina à superfície da célula e deste modo uma activação rápida das pro-MMPs (Kirchheimer e Remold, 1989). A uPa é expressa por vários tipos celulares implicados na remodelação tecidual e a sua inibição *in vitro*, reduz significativamente a degradação da matriz (Estreicher et al, 1989). O inibidor do activador do plasminogénio, o PAI-1, tem um efeito inibidor sobre a uPA e constitui, por isso, o contrapeso da cascata de activação das MMPs pela plasmina e, portanto, da actividade metaloproteásica matricial (Beaudoux et al, 2003). Os níveis seguintes de activação das MMPs constituem um ciclo de retrocontrolo, no decurso do qual a activação duma MMP conduz à activação duma outra que,

por sua vez, leva à activação duma terceira, etc (Beaudeau et al, 2003; ver Figura 2.4). Deste modo, a plasmina activa as pro-MMP-1, pro-MMP-3 e a pro-MMP-9 nas suas formas activas respectivas, em seguida a MMP-3 activa a pro-MMP-1 na MMP-1, a qual também é capaz de activar a pro-MMP-9 (Beaudeau et al, 2003). As MT-MMP são igualmente activadoras das MMPs, em particular da MMP-2 (Hernandez-Barrantes et al, 2002), e, por outro lado, as gelatinases MMP-2 e MMP-9, podem ser activadas no seio da própria matriz extracelular através duma produção importante de radicais livres de oxigénio produzidos pelos macrófagos activados, aumentando assim a actividade metaloproteolítica local (Ohara et al, 1993). A activação coordenada de um certo número de proteínases em estado latente pode explicar a degradação local, rápida e quase completa, do complexo de proteínas que constituem a matriz extracelular (Gibson, 1998). Convém aqui referir que, para além da sua função de remodelação da matriz extracelular, as MMPs podem igualmente participar em muitos outros processos biológicos (ver: Vu e Werb, 2000; McCawley e Matrisian, 2001; Ortega et al, 2003; Visse e Nagase, 2003), designadamente, regulação da função imune (Opdenakker et al, 2001a,b), migração celular, proliferação celular, angiogénese (Vu et al, 1998; Zhou et al, 2000; Nguyen et al, 2001; Pepper, 2001; Jackson, 2001; Sounni et al, 2003) e apoptose (Shi et al, 1998; Vu et al, 1998; Karsdal et al, 2002).

A actividade proteolítica das MMPs é especificamente inibida pelos chamados TIMPs (do inglês, *tissue inhibitors of metalloproteinases*), de cuja família são conhecidos 4 membros: TIMP-1, -2, -3 e -4 (Matrisian, 1992; Gomez et al, 1997; Clark e Murphy, 1999; Brew et al, 2000; Baker et al, 2002; Nagase e Brew, 2002; Woessner, 2002; Whittaker e Ayscough, 2003). A capacidade de inibição é variável (ver Tabela 2.2) e, enquanto as formas activas das MMPs podem ser inibidas por qualquer dos TIMPs (Bord et al, 1999; Hayakawa, 2002), as pro-MMP-2 e -9, apenas são inibidas pelos TIMPs-1 e -2 (Hayakawa, 2002). O TIMP-1 é mais efectivo do que o TIMP-2 na inibição da MMP-1 (Howard et al, 1991; Ward et al, 1991) e da MMP-3 (Nguyen et al, 1994). Contudo, o TIMP-2 é mais efectivo do que o TIMP-1 na inibição da MMP-9, e foram evidenciados resultados contraditórios entre estes dois TIMPs relativamente à sua acção sobre a MMP-2 (Ward et al, 1991; Nguyen et al, 1994). Por outro lado, não existem diferenças significativas entre o TIMP-1 e o TIMP-3 na inibição da actividade das MMPs -1, -2, -3 e -9 (Apte et al, 1995) e, estes mesmos TIMPs, são cerca de 5 vezes mais efectivos do que o TIMP-2 na inibição da MMP-13 (Knauper et al, 1996). Curiosamente, a MT1-MMP é inibida pelos TIMPs-2 e -3, mas não parece ser afectada pelo TIMP-1 (Kinoshita et al, 1996; Will et al, 1996). A actividade das MMPs pode também ser controlada por inibidores não específicos, designadamente o inibidor alfa1-proteinase e a alfa2-macroglobulina (Westermarck e Kahari, 1999). Deste modo, desequilíbrios no balanço entre as actividades das MMPs e dos TIMPs, traduzem-se em situações patológicas às quais está associada a destruição tecidual (Gomez et al, 1997; Bord et al, 1997; 1999; Kahari et al, 1999; Huang et al, 2002; Murphy e Reynolds, 2002; Watanabe et al, 2002).

Tabela 2.1 Metaloproteinases da matriz (MMPs) (Adaptado de Herold, 2002; Beaudeau et al, 2003; PDB, 2003)

Sub-grupo	Denominação	Nome	Alguns substratos	Expressão (tipos celulares)
Colagenases	Colagenase-1	MMP-1	Colagénios I, II, III, VIII, X, fibronectina, vitronectina, laminina, agrecano	Fibroblastos, queratinócitos, condrócitos, células epiteliais e endoteliais, osteoblastos, macrófagos e hapatócitos
	(intersticial)		proMMP-1, proMMP-2, proMMP-9, $\alpha_2$ -macroglobulina	
	Colagenase-2	MMP-8	Colagénios I, II, III, agrecano, $\alpha_2$ -macroglobulina	Fibroblastos, condrócitos, células endoteliais
	(neutrófila)			
Colagenase-3		MMP-13	Colagénios I, II, III, IV, VI, IX, X, XIV, fibronectina, agrecano, proMMP-9, $\alpha_2$ -macroglobulina	Fibroblastos e tecido ósseo em desenvolvimento
Gelatinases	Colagenase-4	MMP-18	Colagénio I	Membranas humanas fetais <sup>1</sup>
	Gelatinase A	MMP-2	Colagénios I, II, III, IV, V, VII, X, XI, laminina, elastina, fibronectina, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-9, MMP-13, $\alpha_2$ -macroglobulina	Linfócitos T, fibroblastos, macrófagos e plaquetas
	Gelatinase B	MMP-9	Colagénios IV, V, VII, X, XIV, laminina, elastina, agrecano, fibronectina, $\alpha_2$ -macroglobulina	Linfócitos T, macrófagos, queratinócitos, osteoclastos, células endoteliais, megacariócitos, trofoblastos, neutrófilos e eosinófilos
Estromalinas	Estromalinas-1	MMP-3	Colagénios III, IV, IX, elastina, fibronectina, laminina, $\alpha_2$ -macroglobulina, proMMP-1, proMMP-3, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9, proMMP-13	Fibroblastos, células epiteliais, endoteliais, musculares lisas vasculares, macrófagos, condrócitos, queratinócitos
	Estromalinas-2	MMP-10	Colagénios III, IV, V, elastina, fibronectina, proMMP-1, proMMP-7, proMMP-8, proMMP-9	Fibroblastos, queratinócitos, células epiteliais e linfócitos T
	Estromalinas-3	MMP-11	Colagénio IV, fibronectina, laminina, gelatina, $\alpha_2$ -macroglobulina	Fibroblastos, células epiteliais e células do mesênquima
	Não tem		Colagénio IV, gelatina, laminina, fibronectina, agrecano	Fibroblastos <sup>2</sup>
MMPs membranares	MT-MMP-1	MMP-14	Colagénios I, II, III, fibronectina, vitronectina, laminina, proMMP-2, proMMP-13, $\alpha_2$ -macroglobulina	Fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e osteoclastos
	MT-MMP-2	MMP-15	Fibronectina, laminina, agrecano, proMMP-2	Fibroblastos e macrófagos
	MT-MMP-3	MMP-16	Colagénio III, fibronectina, laminina, vitronectina, $\alpha_2$ -macroglobulina, proMMP-2	Cérebro, placenta e células musculares lisas vasculares
	MT-MMP-4	MMP-17	Gelatina, proMMP-2	Cérebro, tecidos reprodutivos e leucócitos
Matrilisinas	MT-MMP-5	MMP-24	Fibronectina, gelatina, proteoglicanos, proMMP-2	Cérebro
	MT-MMP-6	MMP-25	Colagénios IV, gelatina, fibronectina, proteoglicanos, proMMP-2	Neutrófilos
	Matrilisina-1	MMP-7	Colagénios IV, X, III, laminina, proMMP-1, proMMP-2, proMMP-7, proMMP-9, $\alpha_2$ -macroglobulina	Macrófagos, células mesangiais e células epiteliais
	Matrilisina-2	MMP-26	Colagénios IV, gelatina, fibronectina, proMMP-9, $\alpha_2$ -macroglobulina	Tecidos reprodutivos <sup>3</sup>
Não classificada	Metaloelastase	MMP-12	Colagénio IV, elastina, fibronectina, vitronectina, laminina, agrecano, osteonectina, proMMP-2, $\alpha_2$ -macroglobulina	Macrófagos
	Outras	MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28 (ver PDB, 2003)		

<sup>1</sup> Fortunato e Menon, 2002; <sup>2</sup> Yang e Kurkinen, 1999; <sup>3</sup> Tunungtila et al, 2003



Tabela 2.2 Nomenclatura e características dos TIMPs (Adaptado de Kerrigan et al, 2000 e Baker et al, 2002)

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Inibição de MMPs	Todas excepto a MMP-14	Todas	MMP-1, -2, -3, -9, -13 e (TNF)- converting enzyme	MMP-1, -2, -3, -7, -9
Maior eficiência na actividade inibidora em comparação com outras MMPs MMPs fracamente inibidas	MMP-1  MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP MMP-19	MMPs-2 e -9  Nenhuma	?	MMPs-2 e -7  Nenhuma
Homologia na sequência de aminoácidos com outros TIMPs	42% com TIMP-2	-	27% com TIMP-1	51% com TIMPs-2 e -3
Localização	Solúvel na matriz	Solúvel/superfície celular	Na limite da matriz extracelular	Solúvel/superfície celular
Expressão	Indutível	Constitutiva	Indutível	?
Principais tecidos	Ossos, ovário	Placenta	Rim, cérebro	Coração
Formação de complexos	pro-MMP-9	pro-MMP-2, MT1-MMP	pro-MMP-2, MT1-MMP, matriz	?

Para além da sua acção inibidora das MMPs, os TIMPs desempenham, ainda, outras funções biológicas (ver Gomez et al, 1997; Baker et al, 2002; Hayakawa, 2002), como por exemplo, funcionam como factores de crescimento de vários tipos celulares (Hayakawa et al, 1994), ou, pelo contrário, podem ter um efeito apoptótico como acontece com os TIMP-3 e TIMP-4 (George et al, 2000; Manello e Gazzanelli, 2001).

Embora as MMPs secretadas tenham diferentes padrões de expressão, parece, no entanto, haver uma considerável redundância e sobreposição no que diz respeito às suas funções. Com efeito, murganhos deficientes em MMP-2 (Itoh et al, 1997), MMP-3 (Mudgett et al, 1998), MMP-7 (Wilson et al, 1997), MMP-9 (Vu et al, 1998), MMP-10 (Masson et al, 1998) ou MMP-12 (Hautamaki et al, 1997), todos eles são viáveis. Destes, apenas os animais deficientes em MMP-9 mostraram anomalias no desenvolvimento, envolvendo a placa de crescimento e o processo de ossificação endocondral (Vu et al, 1998; Engsig et al, 2000). No entanto, a expressão de várias MMPs nos vários tipos celulares envolvidos no desenvolvimento do esqueleto, ainda que fonte de alguma controvérsia (Uusitalo et al, 2000), sugere a sua importância nos processos de ossificação. As MMPs são produzidas por uma variedade de células, designadamente, fibroblastos, condrócitos, macrófagos, osteoclastos, osteoblastos e células endoteliais (Delaisse et al, 1993; Gack et al, 1995; Delany e Canalis, 1998; Hayakawa, 2002; Herold, 2002; Murphy e Reynolds, 2002; Beaudeau et al, 2003). A expressão de algumas MMPs, e dos seus inibidores, foi estudada em placas de crescimento normais (Brown et al, 1989; Blavier e Delaissé, 1995; Lee et al, 1999) e nos condrócitos hipertróficos nos processos de recuperação de fracturas (Uusitalo et al, 2000). Os pre-osteoclastos (Blavier e Delaisse, 1995) e os condroclastos/osteoclastos (Vu et al, 1998; Everts et al, 1999; Fauchoux et al 2001), expressam a MMP-9, e, Holliday et al (1997), observaram imunohistoquimicamente que a colagenase intersticial (MMP-1) é produzida em níveis elevados pelas células do estroma e pelos osteoblastos. Delaisse et al (1993) evidenciaram por imunohistoquímica, a presença da (pro)colagenase, em osteoclastos e no compartimento extracelular sub-osteoclástico de reabsorção, de cobaias, ratos e coelhos. Estes autores sugerem que a colagenase osteoclástica é secretada no compartimento de reabsorção onde, muito provavelmente, coopera com as catepsinas na degradação do colagénio. Os resultados de Edwards et al (1996), em humanos, confirmam o papel das metaloproteinases e dos seus inibidores, em particular a colagenase (MMP-1), as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), a estromalisina (MMP-3) e o TIMP-1, nos processos de remodelação da cartilagem e da formação da cavidade medular. Gack et al (1995) determinaram imunohistoquimicamente a expressão da MMP-1 durante o desenvolvimento embrionário em ratos, e observaram marcação positiva nos condrócitos hipertróficos e nas células osteoblásticas localizadas ao longo das trabéculas ósseas, não tendo obtido resultados positivos nos osteoclastos. Estes autores concluíram que a expressão específica da MMP-1 e a sua capacidade exclusiva para digerir colagénios dos tipos I, II, III, e X, os principais constituintes do osso, da cartilagem, e tendões, sugere um importante papel e uma função específica desta enzima no desenvolvimento e remodelação do



osso. Bord et al (1997) observaram a MMP-1 em locais de invasão vascular, nos osteoblastos activos e nos osteoclastos nos locais de reabsorção. Quanto aos condrócitos, os níveis de expressão da MMP-1 e da MMP-3, ao longo das zonas de proliferação e de hipertrofia, foram variáveis, e a MMP-3 mostrou imunomarcacção positiva nas células e na matriz extracelular. Estes autores observaram ainda imunomarcacção positiva da gelatinase B (MMP-9) nos locais de reabsorção, nos osteoclastos e nas células mononucleares. Por outro lado, a gelatinase A (MMP-2) evidenciou uma expressão ténue, e apenas na fibrocartilagem adjacente às áreas de ossificação endocondral. Blavier e Delaisse (1995) e Nagai e Aoki (2002), revelaram a expressão da MMP-13 nos condrócitos hipertóficos de ratos controlo e, estes últimos autores, nas regiões em que o processo de ossificação endocondral foi perturbado pela acção do FGF-2 a expressão da MMP-13 diminuiu significativamente. Estes resultados e os de outros autores (Johansson et al, 1997; Hayami et al, 2000; Wu et al, 2001, 2002), sugerem que a acção da MMP-13 é necessária para a diferenciação dos condrócitos e para a reabsorção da matriz durante o desenvolvimento do esqueleto. De referir, que Johansson et al (1997) não observaram a expressão da MMP-13 nos osteoclastos, enquanto Sasano et al (1998) observaram imunomarcacção positiva para esta metaloproteinase nas células da linha osteoblástica. D'Angelo et al (2001) mostraram que as MMP-2, -9, e -13 estão associadas com as vesículas da matriz isoladas da placa de crescimento. Por outro lado, Sasano et al (1998) observaram a expressão da MMP-8 nas células progenitoras dos osteoblastos, nos osteoblastos diferenciados, nos osteócitos, e nos condrócitos da placa de crescimento. Filanti et al (2000) observaram, *in vitro*, expressão das MMP-2, -9, e -14 (ou MT1-MMP) nos osteoblastos que cobrem as trabéculas ósseas, sob a placa de crescimento, e na superfície endosteal do osso cortical. Murganhos deficientes em MT1-MMP, mostram acentuadas falhas no processo de ossificação endocondral, traduzidas em graves anomalias esqueléticas (Holmbeck et al, 1999; Zhou et al 2000), e na invasão vascular da placa de crescimento (Zhou et al, 2000).

As catepsinas são proteinases lisossomais que, no seu sítio activo, podem apresentar cisteína [catepsinas B, H, K, L e S (Clark e Murphy, 1999; Soderstrom et al, 1999); a catepsina K, foi previamente designada por catepsina O ou O2; Clark e Murphy, 1999], aspartato (catepsinas D e E; Yoshimine et al, 1995; Clark e Murphy, 1999) ou serina (catepsina G; Clark e Murphy, 1999; Konttinen et al, 1999). A actividade das catepsinas é igualmente controlada pelos seus inibidores específicos (ver Clark e Murphy, 1999). As catepsinas exercem a sua máxima actividade a um baixo pH, situação típica nos lisossomas (Kirschke et al, 1998 cit por Uusitalo et al, 2000) e nas lacunas de reabsorção dos osteoclastos (Vaananen, 1993; Yamaza et al, 1998), enquanto as MMPs tem a sua actividade óptima a um pH neutro (Kahari e Saarialho-Kere, 1999). Alguns dados apontam para que durante a reabsorção óssea as catepsinas iniciam a proteólise, seguida da acção neutralizante das MMPs uma vez que o pH acidificante das lacunas de reabsorção tenha sido incrementado suficientemente (Everts et al, 1998). Por outro lado, no processo de ossificação endocondral, foi proposto que a completa degradação

do colagénio de tipo X, necessita da acção conjunta da MMP-13 dos condrócitos e da catepsina B dos osteoclastos (Sires et al, 1995). As fontes celulares das catepsinas durante o processo de ossificação endocondral normal, são, igualmente, fonte de alguma controvérsia (Uusitalo et al, 2000). A sua expressão, e a dos seus inibidores, foi referida na placa de crescimento (Ohsawa et al, 1993; Soderstrom et al, 1999; Nakase et al, 2000), e sabe-se que os osteoclastos expressam as catepsinas B, D, G, L e K (Goto et al, 1994; Tezuka et al, 1994). Enquanto as catepsinas B, D e L são produzidas numa variedade de outros tecidos, dados recentes indicam que a catepsina K é expressa predominantemente nos osteoclastos, e por isso, é sugerido ter uma participação activa na reabsorção osteoclástica da matriz extracelular (Rantakokko e Vuorio, 1996; Yamaza et al, 1998; Gray et al, 2002). Em osteoclastos de rato, a catepsina D foi imunolocalizada em grânulos ou vacúolos, mas a marcação nas lacunas de erosão foi negligível, em contraste com os padrões de marcação das catepsinas B e L (Goto et al, 1993; 1994).

Outra enzima que participa activamente na degradação da matriz extracelular é a fosfatase ácida, referida como ácido fosfatase tartrate resistente (TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*; EC 3.1.2.1), ácido fosfatase púrpura ou ácido fosfatase de tipo 5 (Henthorn et al, 1999). A TRAP expressa-se em níveis elevados nos osteoclastos multinucleados maduros e activos, nas superfícies de reabsorção (Minkin, 1982), podendo igualmente expressar-se, em níveis elevados, nos macrófagos mononucleados (Witten, 1997; Henthorn et al, 1999). Segundo Roach e Shearer (1989), a remoção de maior parte da cartilagem é efectuada por fagócitos monucleados com actividade fosfatase ácida. Estudos ultra-estruturais demonstraram que a TRAP é encontrada na superfície óssea em contacto com o bordo da zona rugosa dos osteoclastos e, nestes, localiza-se nas estruturas lisossómicas (Reinholt et al, 1990). Estas observações são consistentes com o conceito que a TRAP é exportada dos osteoclastos para as áreas de reabsorção activa (Henthorn et al, 1999). Contudo, o mecanismo através do qual a TRAP promove a reabsorção, é ainda desconhecido (Fleckenstein e Dexter, 1997; Henthorn et al, 1999).

O tecido ósseo está continuamente em remodelação através das actividades combinadas de dois tipos de células, os osteoblastos e os osteoclastos. Os osteoblastos, que derivam de células do mesênquima, depositam a matriz óssea, enquanto os osteoclastos, que derivam de células precursoras hematopoiéticas, reabsorvem a matriz. Deste modo, quer durante o crescimento ósseo, quer no estado adulto, para que se mantenha uma massa óssea constante, é necessário que a deposição osteoblástica de matriz e a reabsorção osteoclástica, estejam devidamente coordenadas. A reabsorção cartiláginea/óssea está dependente de uma série de processos que, em condições normais, se traduzem num número adequado de condroclastos/osteoclastos, diferenciados e activos (Gay e Weber, 2000). Os condroclastos/osteoclastos multinucleados, desenvolvem-se a partir da fusão de células precursoras da linhagem monócito-macrófago (Suda et al, 1996; Domon et al, 1998; Vignery,

2000). A diferenciação das células progenitoras dos osteoclastos é regulada por uma variedade de factores que incluem, o *macrophage colony –stimulating factor* (M-CSF), o *receptor activator NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) e a *osteoprotegerin* (OPG), os quais são expressos pelos osteoblastos e pelas células do estroma (Suda et al, 1995, 1997, 1999; Heymann et al, 1998; Lacey et al, 1998; Yasuda et al, 1998; Roodman, 1999; Udagawa et al, 2000; Shiotani et al, 2002). Muitos destes factores reguladores actuam em primeiro lugar nos osteoblastos, estimulando a maturação dos osteoclastos indirectamente (Mackie, 2003). Estudos *in vitro* levaram a supor que estes factores induziam a expressão de um factor associado à membrana dos osteoblastos, que, por sua vez, estimularia a diferenciação das células progenitoras dos osteoclastos (Chambers et al, 1993; Suda et al, 1995). A regulação da reabsorção osteoclástica pode, assim, ser feita através de, pelos menos, dois mecanismos: (i) ou aumentando, ou diminuindo, o número de osteoclastos, através da estimulação, ou da inibição, da proliferação e/ou diferenciação, das células progenitoras dos osteoclastos, (ii) ou pela modulação da actividade de osteoclastos maduros já existentes (van't Hof et al, 1997). As células precursoras dos osteoclastos são atraídas para as regiões das matrizes mineralizadas, identificadas por um mecanismo ainda desconhecido, de modo a efectivarem a reabsorção e, assim, manterem os níveis fisiológicos de cálcio no plasma e, no caso da ossificação endocondral, assegurarem o normal desenvolvimento do processo (Gay e Weber, 2000). Outros alvos para a reabsorção incluem as osteonas mais velhas, locais de inflamação e áreas de necrose (Gay e Weber, 2000).

A vida útil dos osteoclastos pode ser subdividida em várias fases distintas (Roodman, 1999; Gay e Weber, 2000): (1) migração das células precursoras de origem hematopoiética para as superfícies ósseas, (2) desenvolvimento dos pre-osteoclastos, (3) fusão dos pre-osteoclastos mononucleados em osteoclastos multinucleados (ver Vignery, 2000), (4) desenvolvimento de um estado de polarização, através da adesão ao osso, e do estabelecimento de um aparelho de reabsorção acidificante, (5) estabelecimento de ciclos através de fases de activação e de inactivação e, (6) descolamento e inactivação final que termina com a sua morte por apoptose (ver: Greenfield et al, 1999; Lorget et al, 2000). A regulação dos osteoclastos ocorre em todos os estádios da sua vida útil (Gay e Weber, 2000). Quando iniciam a actividade de reabsorção, os osteoclastos tornam-se polarizados e são criados três domínios membranares distintos: um bordo rugoso, o domínio que ancora a célula de reabsorção activa à matriz, chamado zona tampão (do inglês *sealing zone*), e um domínio secretor funcional (Vaananen et al, 2000). Simultaneamente, o citosqueleto sofre uma profunda reorganização, processo durante o qual os microfilamentos de actina (actina-F) formam um anel de ligação na zona tampão (Vaananen et al, 2000), o qual vai delimitar toda a membrana do bordo rugoso (Holliday et al, 2002). Ultra-estruturalmente, a zona tampão caracteriza-se por uma distribuição homogénea dos microfilamentos e a ausência de organelos na área adjacente à membrana plasmática (Nordahl et al, 1998). A membrana do bordo rugoso encontra-se no interior da zona tampão e possui inúmeras bombas de H<sup>+</sup>/ATPase, as quais estão envolvidas na dissolução da fracção

inorgânica mineral, através da acidificação da matriz (Blair et al, 1989; Vaananen et al 1990; Lee et al, 1996), e na exposição da fracção orgânica da matriz à acção das proteases, numa área situada entre o bordo rugoso e a superfície da matriz, denominada lacuna de reabsorção, ou lacuna de Howship (Vaananen et al, 2000). Com efeito, é nestes compartimentos extracelulares que os cristais de hidroxiapatite são dissolvidos pelo ácido clorídrico e que a mistura de proteases, em particular a MMP-9 e a catepsina K (Everts et al, 1992; Lee et al, 1999; Uusitalo et al, 2000; Faucheux et al, 2001), degradam a matriz orgânica. No entanto, tem sido registada nos osteoclastos (e pre-osteoclastos), a expressão de muitas outras catepsinas (Soderstrom et al, 1999; Uusitalo et al, 2000) e outras metaloproteínases envolvidas na degradação da matriz no processo de ossificação endocondral, designadamente, MMP-1, MMP-10 e MT1-MMP, bem como dos seus inibidores (Blavier e Delaisse, 1995; Bord et al, 1998, 1999; ver Hayakawa, 2002). Ultra-estruturalmente, o bordo rugoso é composto por numerosas invaginações da membrana plasmática, o que permite aumentar a superfície onde se verificam as actividades de exocitose e de endocitose (Nordahl et al, 1998). Os produtos de degradação dos vários componentes da matriz são endocitados, transportados ao longo da célula, após o que são exocitados no domínio secretor funcional (Vaanaen et al, 2000; ver Blair, 1998). Esta via trans-citótica permite aos osteoclastos removerem grandes quantidades de produtos de degradação da matriz, sem perderem a sua ligação ao osso/cartilagem mineralizada (Vaananen et al, 2000). Vários trabalhos (Shibata et al, 1997; Wang et al, 1997; Bronckers et al, 2000) evidenciaram a capacidade fagocitária dos condroclastos/osteoclastos.

Em secções histológicas, os osteoclastos podem ser identificados como células multinucleadas de grande tamanho, situadas na superfície do tecido alvo da reabsorção; contudo, quer os osteoclastos, quer os seus precursores mononucleados, nem sempre são facilmente distinguíveis nas populações celulares hematopoiéticas presentes na cavidade medular (Athanasou, 1996). Com efeito, estudos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado alguma dificuldade em distinguir os osteoclastos de outras células, particularmente dos macrófagos e das células gigantes multinucleadas, denominadas macrófagos poliarions (Sakiyama et al, 2001), produto da fusão de macrófagos (Sutton e Weiss, 1966; ver Athanasou, 1996; Tabela 2.3).

Deste modo, a avaliação da biologia dos osteoclastos, e de outras células de reabsorção, apenas pode ser feita adequadamente, desde que os critérios para a sua distinção estejam perfeitamente definidos. Esses critérios podem ser morfológicos, enzimáticos (TRAP: Minkin, 1982; Andersson et al, 1989; Lewinson e Kogan, 1995; Szuwart et al, 2002; catepsinas: Yoshimine et al, 1995; Soderstrom et al, 1999; Nakase et al, 2000; Uusitalo et al, 2000; Kiviranta et al, 2001; MMP-9: Lee et al, 1999; Uusitalo et al, 2000; Faucheux et al, 2001; ver Roodman, 1996), imunohistoquímicos/imunológicos (Athanasou et al, 1991; Kukita e Kukita, 1996; Kukita et al, 1998) e funcionais (ver Roodman, 1996; Athanasou, 1996; Tabela 2.4).

**Tabela 2.3** Diferenças entre osteoclastos e macrófagos policarions (Adaptado de Roodman, 1996)

	Osteoclastos	Macrófagos
Formação de lacunas de reabsorção	+	-
Presença de um bordo rugoso	+	-
Expressão do receptor para a vitronectina	+	±
Expressão de receptores para a calcitonina	+	-
Contração e imobilização em resposta à calcitonina	+	-
Expressão da TRAP <i>in vivo</i>	+	-
Reacção do anticorpo 121F	+	-
Expressão de receptores para Fc	-	+
Expressão de esterase não específica	-	+

A presença da característica fenotípica é assinalada com + e a ausência com -. Uma expressão pouco acentuada é assinalada com ±

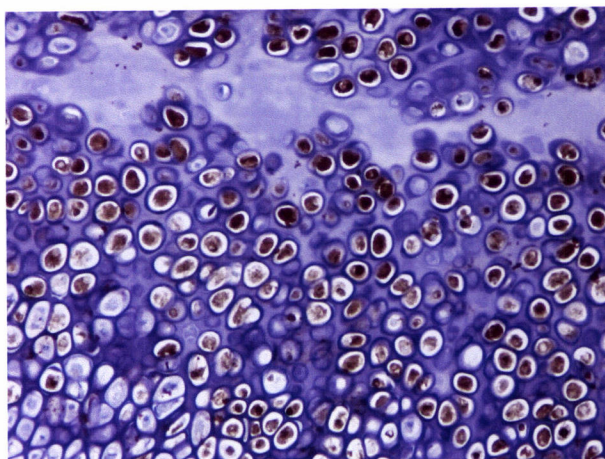
**Tabela 2.4** Critérios para definição dos osteoclastos e seus precursores

Marcadores	Osteoclastos/Células precursoras
Morfológicos	Multinucleação (mo) <sup>1</sup>
	Localização nos locais de reabsorção (mo)
	Bordo rugoso (me) <sup>2</sup>
	Zona tampão (me)
Enzimáticos	Expressão da TRAP
	Expressão da TRTP
	Expressão da anidrase carbónica tipo-II
Imunohistoquímicos/imunológicos	Expressão para CD13, CD15, CD45, CD54, CD68 e CD51 (receptor para a vitronectina)
	Ausência de expressão para CD11/18, CD14, HLA-DR, Fc e receptor para C <sub>3b</sub>
Funcionais <sup>3</sup>	Capacidade para formar lacunas de reabsorção
	Resposta à calcitonina
	Receptor para a calcitonina

<sup>1</sup> mo = microscopia óptica; <sup>2</sup> me = microscopia electrónica; <sup>3</sup> específicos dos osteoclastos



### 3. MODELO EXPERIMENTAL







### 3. MODELO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Introdução

Para além do aparecimento espontâneo, que, segundo alguns autores, tem uma forte base genética, vários factores, designadamente, nutricionais, micotoxinas e alguns ditiocarbamatos, afectam a incidência e a gravidade das lesões discondroplásicas (Leach e Gay, 1987; Orth e Cook, 1994). A sua utilização como agentes indutores da discondroplasia experimental, e o conhecimento do seu modo de acção, podem ajudar a compreender melhor esta patologia e a estabelecer os seus mecanismos de indução. O modelo experimental mais aplicado tem sido a utilização de dietas desequilibradas na sua relação Ca/P, contendo 7.5 g/Kg de Ca e 7.6 g/Kg de P, enquanto a dieta normal tem 12 g/Kg e 6 g/Kg, respectivamente (Rennie et al, 1993; Farquharson et al, 1995; Tselepis et al, 1996; Jefferies et al, 2000). Neste modelo, e uma vez que estas dietas induzem igualmente situações de raquitismo, esta patologia pode potenciar o desenvolvimento da discondroplasia, embora sejam patologias distintas, com diferentes etiologias (Rennie et al, 1993; Parkinson et al, 1996). Thorp et al (1991) e Parkinson et al (1996), sugerem mesmo, uma possível sobreposição entre elas. Outros modelos muito utilizados incluem a administração, através da sua incorporação na dieta, de ditiocarbamatos (Edwards, 1987; Wu et al, 1990; Rosselot et al, 1994; Pines et al, 1998; Ben-Bassat et al, 1999), micotoxinas da espécie *Fusarium* (Haynes e Walser, 1986; Wu et al, 1991, 1993; Chu et al, 1995) e os aminoácidos homocisteína e cisteína (Orth et al, 1991, 1992; Bai et al, 1994; Bai e Cook, 1994). A quantidade de modelos de indução, e tão diversos, faz supor que a discondroplasia tem uma origem multifactorial, pois não é crível que o modo de acção dos diferentes agentes indutores da patologia seja exactamente o mesmo.

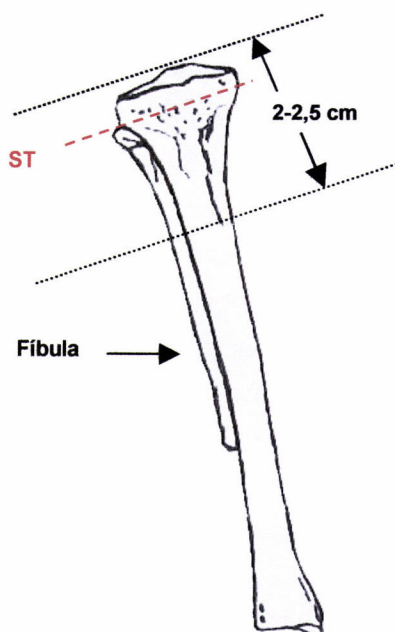
No que diz respeito aos ditiocarbamatos, têm sido utilizados, na indução da discondroplasia, o disulfiram [bis(diethylthiocarbamyl)disulfide ( $C_{10}H_{20}N_2S_4$ ); Edwards, 1987]) e o tirame [tetramethylthiuram disulfide ( $C_6H_{12}N_2S_4$ ); Edwards, 1987; Wu et al, 1990; Rosselot et al, 1994; Pines et al, 1998; Ben-Bassat et al, 1999]. Capela e Silva (1999, *dados não publicados*), observou igualmente a indução de discondroplasia, em frangos de carne, utilizando zirame [ $(C_6H_{12}N_2S_4Zn)$ ; zinc dimethyldithiocarbamate], ditiocarbamato semelhante, na sua composição, ao tirame. Quanto ao zirame, é de referir que Enomoto et al (1989) observaram, em ratos, após administração crónica, para além de outros efeitos no desenvolvimento do esqueleto, lesões que em alguns aspectos se podem considerar similares a lesões discondroplásicas. No entanto, nós próprios (ver Rafael et al, 2000), também em ratos, não detectamos o mesmo tipo de efeitos após administração de tirame.

### 3.2 Obtenção das placas de crescimento e respectivas secções histológicas

De acordo com o que foi referido na Introdução, cada sub-capítulo deste trabalho está organizado de modo a que constitua, no futuro, proposta de publicação em revistas da especialidade, incluindo, cada um deles, os respectivos materiais e métodos usados. No entanto, uma vez que há uma série de procedimentos comuns a todos eles, designadamente, o método de obtenção das placas de crescimento com lesões discondroplásicas, bem como das respectivas secções histológicas, e as técnicas de imunomarcagem, para evitar repetições, apresentamos, neste capítulo, a metodologia geral utilizada, fazendo referência a outra metodologia e a aspectos particulares, sempre que necessário.

Para a realização do presente trabalho, efectuaram-se vários ensaios, em que frangos de carne (*broilers*) da estirpe Cobb foram criados no sistema solo desde o dia do nascimento até aos 21 dias de idade, cumprindo as normas de bem estar animal. Foram sempre estabelecidos dois grupos, um grupo controlo e um grupo experimental, com 20 animais por grupo. Para obtenção de animais com lesões discondroplásicas, foi incorporado na dieta do grupo experimental, o ditiocarbamato Tirame (CAS n.º 137-26-8, SIGMA, n.º T5638), na concentração de 35 mg/Kg (Wu et al, 1994), durante os 21 dias (idade ao sacrifício, por deslocamento cervical) dos ensaios. As características da dieta foram as seguintes: Energia: 13.31MJ.ME/Kg; PB: 23,4%PB; Ca: 1,16%; P disponível: 0,45% (Ca/P = 2,58); Mg: 3527,05 mg/kg; Cu: 23,1 mg/Kg; Fe: 366,8 mg/Kg; Zn: 118,65 mg/Kg. A dieta e a água foram distribuídas em sistema *ad libitum*.

Em todos os ensaios, após o sacrifício, foi determinado o sexo dos animais e retiradas as duas tíbias. A epífise proximal da tíbia esquerda foi seccionada longitudinalmente, e a epífise proximal da tíbia direita foi seccionada transversalmente, junto à epífise fibular (Fig 3.1).



Para a obtenção dos fragmentos fez-se a extracção das epífises proximais, e parte da metáfise, de ambas as tíbias 2-2.5 cm, aproximadamente, abaixo do limite da cartilagem articular:

- A epífise esquerda foi seccionada sagitalmente.
- A epífise direita foi seccionada transversalmente (ST), tangencialmente à epífise proximal da fibula.

Figura 3.1 Esquema da tíbia e da fibula onde são indicados os critérios para obtenção dos cortes

Os fragmentos obtidos foram imediatamente fixados em formaldeído neutro a 10%, tamponado, durante 24 horas, após o que se procedeu à sua desmineralização de acordo com os procedimentos referidos na Tabela 3.1. A seguir à desmineralização os fragmentos foram processados num sistema automático, após o que foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo rotativo em secções com 5 µm de espessura, para posterior utilização nos diferentes estudos a efectuar. Para observação da estrutura geral, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro de 75 x 25 mm, e corados com Hematoxilina e Eosina os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina e com Tricrómicos de Azan (Bio-Óptica, ref<sup>ª</sup> 001802), de Masson (Bio-Óptica, ref<sup>ª</sup> 010802) e de Picro-Mallory (Bio-Óptica, ref<sup>ª</sup> 021822); para os diferentes estudos imunohistoquímicos, os cortes foram estendidos em lâminas de vidro de 75 x 25 mm, tratadas com polilisina (SIGMA, Poly-Prep TM P0425), e incubados, através do método LAB-SA, com anti-corpos comerciais (ver Tabela 3.2).

**Tabela 3.1** Processamento dos fragmentos

Secção	Fixação	Desmineralização	Inclusão	Espessura do corte
Longitudinal	Formaldeído 10% tamponado (24 horas)	EDTA <sup>1</sup> a 5%, pH 7.4 7-10 dias	Parafina <sup>2</sup>	5 µm
Transversal				

<sup>1</sup> SIGMA (E1644, CAS nº 6381-92-6); <sup>2</sup> Merck (Cat #19562-1)

### 3.3 Imunohistoquímica

As marcações imunohistoquímicas, foram realizadas através do método “*labeled-(strept)avidin-biotin*” (LAB-SA). Para a avaliação da proliferação celular foi usado um marcador específico de proliferação, o *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), utilizando o *PCNA-Staining Kit*, Zymed, USA, ref<sup>ª</sup> 93-1143. As imunomarcações dos outros anticorpos foram realizadas utilizando o *UltraVision Detection System Kit*, NeoMarkers, USA, ref<sup>ª</sup> TP-015-HD.

O processamento foi feito de acordo com as indicações dos fabricantes que, em termos gerais, são como se seguem:

#### **Método LAB-AS (*UltraVision Detection System*)**

1. Desparafinizar (3x em xileno: 5 minutos, 5 minutos, 3 minutos), hidratar (álcool 100%, 3 minutos; álcool 100%, 3 minutos; álcool 95%, 3 minutos; álcool 80%, 3 minutos), lavar em água da torneira e depois em água destilada.
2. Incubar as secções em solução de peróxido de hidrogénio a 3%, durante 10 a 15 minutos, à temperatura ambiente (1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% para 9 partes de metanol absoluto).

3. Lavar 2x (2 a 3 minutos cada) em banho de solução salina fosfatada tamponada (PBS, 10mM fosfato de sódio, 0,15 cloreto de sódio, pH 7.5) e remover o excesso em volta do corte. A partir desta fase todos os procedimentos foram realizados em câmara húmida.
4. Incubar as secções com o pre-tratamento adequado quando necessário (ver Tabela 3.2).  
Recuperação do antigénio através de HIER (Heat Induced Epitope Retrieval): Aquecer a solução de citrato ou EDTA até 95-98° C e colocar as lâminas nesta solução, na temperatura referida, durante 10-20 minutos. Deixar arrefecer a solução, à temperatura ambiente, durante, pelo menos, 20 minutos.  
Digestão enzimática: adicionar a enzima recomendada (pepsina, tripsina, protease, etc) numa quantidade suficiente para cobrir toda a secção e incubar e acordo com as recomendações para os diferentes anticorpos. Lavar com esguicho de PBS, evitando o tecido.
5. Lavar 4x em PBS. No total, pelo menos 5 minutos.
6. Incubar as secções com a solução de bloqueio, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.
7. Remover o excesso de solução de bloqueio sem lavar.
8. Incubar as secções com o anti-corpo primário, na diluição adequada e durante o tempo e temperatura recomendados (ver Tabela 3.2). O volume do anti-corpo primário deve ser suficiente para cobrir toda a secção.
9. Lavar 4x, a primeira com esguicho, em redor da secção, e as outras três, em banho de PBS durante 3 minutos cada.
10. Limpar o excesso de PBS e incubar as secções com soro normal do animal do secundário a 1:10, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
11. Lavar 4x, a primeira com esguicho, em redor da secção, e as outras três, em banho de PBS durante 3 minutos cada.
12. Limpar o excesso de PBS e incubar as secções com streptavidina peroxidase, durante 10 minutos, à temperatura ambiente.
13. Lavar 4x, a primeira com esguicho, em redor da secção, e as outras três, em banho de PBS durante 3 minutos cada. Limpar o excesso de PBS
14. Incubar as secções com a solução reveladora [DAB-PBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], durante 5-10 minutos, à temperatura ambiente. Lavar com PBS, com esguicho, e depois em banho de PBS durante 3 minutos.
15. Contrastar em banho de Hematoxilina, durante 1 a 4 minutos, à temperatura ambiente. Lavar em banho de PBS durante 3 minutos e, de seguida, em banho água durante 3 minutos.
16. Cobrir as secções com meio de montagem, colocar a lamela e deixar secar durante a noite.

Para a interpretação dos resultados, foi realizado um controlo negativo, substituindo o anti-corpo primário por PBS.

Tabela 3.2 Referências dos anti-corpos primários utilizados no presente trabalho

Anticorpo primário	Clone	Marca	Referência	Origem	Diluição	Pré-Tratamento	Tempo	Incubação	Temperatura
Actina (músculo liso)	1A4	Neomarkers	MS-113	Mouse	1/200	Não	Overnight		4°C
Bcl-2	8C8	Neomarkers	MS-597	Mouse	1/200	Citrato <sup>1</sup>	Overnight		4°C
Caderina (pan)	Rabbit Pab <sup>2</sup>	Neomarkers	RB-1524	Rabbit	1/50	Citrato	Overnight		4°C
c-myc	9E10.3	Neomarkers	MS-139	Mouse	1/50	Citrato	Overnight		4°C
Caspase-3	3CSP03	Neomarkers	MS-1123	Mouse	1/50	Citrato	Overnight		4°C
Laminina-1	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-082	Rabbit	1/50	Protease	Overnight		4°C
MMP-1	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1536	Rabbit	1/50	Citrato	Overnight		4°C
MMP-2	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-567	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-3	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-810	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-7	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1530	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-9	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1539	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-10	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-822	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-11	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1035	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-13	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-825	Rabbit	1/50	Citrato	Overnight		4°C
MMP-14	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1544	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-15	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1546	Rabbit	1/50	Não	Overnight		4°C
MMP-16	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1547	Rabbit	1/50	Citrato	Overnight		4°C
PCNA	PC10	Zymed	93-1143	Mouse	1/200	Citrato	Overnight		4°C
S-100	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-044	Rabbit	1/100	Não	Overnight		4°C
TIMP-1	102D1	Neomarkers	MS-608	Mouse	1/100	Citrato	Overnight		4°C
TIMP-2	3A4	Neomarkers	MS-1485	Mouse	1/50	Citrato	Overnight		4°C
TIMP-3	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1541	Rabbit	1/50	Citrato	Overnight		4°C
TIMP-4	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1542	Rabbit	1/50	Citrato	Overnight		4°C
Tubulina β	Z023	Zymed	18-0093	Mouse	1/100	Não	Overnight		4°C
Ubiquitina	Rabbit Pab	Neomarkers	RB-1428	Rabbit	1/50	Citrato	Overnight		4°C
VEGF	VG1	Neomarkers	MS-1467	Mouse	1/50	EDTA <sup>3</sup>	Overnight		4°C
von Willebrand Factor	Rabbit PAB	Neomarkers	RB-281	Rabbit	1/50	Pepsina	Overnight		4°C

<sup>1</sup> HIER utilizando tampão Citrato pH 6.0; <sup>2</sup> Rabbit Pab = Policlonal; <sup>3</sup> HIER utilizando tampão EDTA pH 8.0

### **3.4 Análise de imagem**

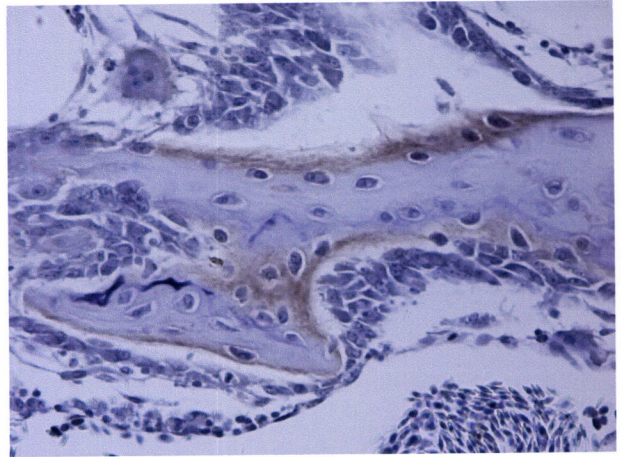
As preparações definitivas foram observadas em microscópio Nikon Eclipse 600, sendo as imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100, e, sempre que necessário, tratadas com o programa Adobe PhotoDeluxe 3.

Para a avaliação da intensidade de imunomarcacão o número de células imunopositivas foi semiquantitativamente estimado de acordo com a seguinte escala: negativo (0%) = -; imunomarcacão ocasional/focal (1-5%) = ±; imunomarcacão fraca (6-25%) = +; imunomarcacão moderada (26-50%) = + +; imunomarcacão intensa (>50%) = + + +. Para o efeito, a avaliação foi realizada, com a ampliacão de 100X, em secções correspondendo a 4-5 animais/grupo e 1 secção/animal. Dado que os condrócitos hipertróficos exibem uma intensa actividade metabólica, e dado que a discondroplasia da tibia envolve a incapacidade dos condrócitos em atingirem o estágio terminal de hipertrofia completa, a causa, ou causas, da patologia deve estar associada a este facto. Deste modo, foi calculado o número de condrócitos hipertróficos imunopositivos. Para o efeito, realizaram-se contagens nas imagens digitais, obtidas com a ampliacão de 100X, correspondentes a 5 campos, contendo o maior número de células (pelo menos 300 células), por cada secção, tendo-se observado igualmente 4-5 animais/grupo e 1 secção/animal. O n.º médio de células positivas foi dividido pelo n.º total de células (soma das células positivas e negativas no campo) para calcular os respectivos *ratios*. A contagem das células foi feita através do programa SigmaScan Pro versão 5 (SPSS, 2002): primeiro contou-se o maior número possível de células na imagem, positivas e negativas, e, em seguida, contaram-se as células positivas, não apagando o registo do total de células, de modo a que a contagem das células positivas fosse feita sobre as células contadas, evitando, assim, possíveis erros de células não assinaladas.

### **3.5 Tratamento dos dados**

Para os casos em que foi feita análise histomorfométrica e em que foi necessário determinar o efeito de factores, os valores obtidos (média ± desvio padrão) foram analisados através de análise de variância, utilizando-se um teste-Newman-Kuls, para determinar a significância estatística das diferenças entre médias, sempre que foram encontrados efeitos significativos ( $P < 0,05$ ). Foi usado o programa NCSS97 (NCSS, 2002).

#### 4. HISTOLOGIA DA PLACA DE CRESCIMENTO







## 4. HISTOLOGIA DA PLACA DE CRESCIMENTO

### 4.1 Introdução

A discondroplasia consiste numa anomalia das placas de crescimento epifisárias dos ossos longos, caracterizada pelo aparecimento de uma massa cartilaginosa branca avascular, opaca/translúcida, que se estende até à metáfise, numa zona em que, normalmente, existe osso trabecular (Leach e Gay, 1987; Leach e Lilburn, 1992; Cook et al, 1994; Orth e Cook, 1994). Pode ocorrer em diferentes locais e em diferentes ossos (Thorp et al, 1993; Julian, 1998), embora o tibiotarso proximal seja o local de maior incidência. A discondroplasia traduz uma interrupção no decurso normal da formação endocondral do osso, ou seja, a cartilagem não calcifica e não é substituída por osso endocondral - deste modo, os processos de proliferação dos condrócitos (que é normal) e de degradação da cartilagem (que não se verifica) não estão em equilíbrio, resultando numa acumulação de cartilagem (Leach e Gay, 1987; Leach e Lilburn, 1992; Cook et al, 1994; Orth e Cook, 1994).

A discondroplasia foi descrita pela primeira vez por Leach e Nesheim (1965) como uma anomalia da cartilagem que ocorre espontaneamente nas estirpes avícolas de rápido crescimento, embora existam trabalhos que contrariam a existência duma correlação da incidência e da gravidade das lesões com a taxa de crescimento (Andrews et al, 1975; Buffington et al, 1975; Cook et al, 1984; Waldroup et al, 1993). Um aspecto particular da discondroplasia é que ocorre durante os estágios muito precoces do crescimento, anteriormente ao aparecimento de outras alterações mais visíveis da morfologia estrutural do osso (Lilburn, 1994), sendo, por isso, facilmente identificável nos animais jovens de frangos de carne, e nas estirpes comerciais de perus e patos (Wise e Nott, 1975; Lilburn et al, 1989; Cherel et al, 1991; Leach e Lilburn, 1992; Kelly et al, 1993), mas não nas estirpes de crescimento lento, designadamente poedeiras Leghorn (Reiland et al, 1978; Leach e Lilburn, 1992). No entanto, alguns autores (Veltmann et al, 1985; Veltmann e Linton, 1986), e nós próprios (Capela e Silva e Bento, 2002, *dados não publicados*), através do modelo experimental-tirame, conseguiram induzir o desenvolvimento de lesões discondroplásicas em estirpes de crescimento lento. Os animais afectados com discondroplasia grave tendem a permanecer estáticos, sem se moverem e numa posição de decúbito ventral, pelo que atingem menores pesos corporais. Quando se movem, fazem-no de modo desajeitado devido a deformações nos ossos longos com pronunciado encurvamento lateral destes, podendo ainda notar-se um alargamento das articulações (Riddell, 1975a; Capps, 1998). Deve ser referido que alguns animais com lesões menos graves não apresentam sinais exteriores e comportamentais típicos da discondroplasia. As lesões discondroplásicas podem ser observadas por radiografia, sendo perfeitamente visíveis as áreas radiolúcentes que lhes correspondem, não se notando a linha de densidade normal abaixo da cartilagem epifisária (Riddell, 1976; Bartels et al, 1989).

Pode ser uma situação transitória mas de consequências graves, produzindo fracturas e deformações ósseas irreversíveis (Vaiano et al, 1994). No entanto, Praul et al (2000) referem que, se as condições que impedem a normal hipertrofia dos condrócitos desaparecerem, as lesões são gradualmente reabsorvidas, e o crescimento ósseo endocondral continua normalmente até à maturidade sexual (Praul et al, 2000).

Existem fortes evidências duma base genética para a discondroplasia (ver Sørensen, 1992). Com efeito, em frangos de carne, os problemas dos membros locomotores parecem estar sob a influência de genes maiores (Somes, 1969; Sheridan et al 1974, cit por Emmerson et al, 1991) e são altamente herdáveis (Burton et al, 1981; Mercer e Hill, 1984), pelo que a discondroplasia apresenta uma elevada resposta à selecção (Riddell, 1976; Sheridan et al, 1978; Burton et al, 1981). Por outro lado, foi observado que diferentes estirpes apresentam diferenças na expressão da anomalia (Haye e Simmons, 1978; Lilburn et al, 1989; Veltmann e Jensen, 1981; Nelson et al, 1992; Kestin et al, 1999). Segundo Siller (1970), existem evidências da associação à discondroplasia de um gene maior ligado ao sexo, o que parece justificar os resultados de vários autores (Leach e Nesheim, 1965; Sheridan, 1974; Sheridan et al, 1976; Edwards, 1984; Cherel et al, 1991; Zhang et al, 1999), que encontraram diferenças na incidência de lesões entre machos e fêmeas. Vários trabalhos permitem concluir que, tal como acontece com os mamíferos (Reiland et al, 1978), existe uma correlação positiva muito acentuada entre a taxa de crescimento e a incidência das lesões em todas as espécies afectadas (Andrews et al, 1975; Buffington et al, 1975; Wise e Nott, 1975; Leach e Lilburn, 1992; Waldroup et al, 1993). No entanto, e embora uma redução na taxa de crescimento se traduza num decréscimo da incidência de lesões (Riddell, 1975b,d; Riddell et al, 1983), os dados disponíveis não são conclusivos quanto à existência dessa correlação (ver Hester, 1994). Adicionalmente, e relacionado com as elevadas taxas de crescimento, os elevados pesos corporais atingidos pelas modernas estirpes comerciais, dada a baixa capacidade de sustentação (músculos e ossos dos membros locomotores) destas, parecem potenciar os efeitos da causa, ou das causas, da discondroplasia (Nestor et al, 1985; Lilburn, 1994; Julian, 1998). Contudo, também no que diz respeito a este aspecto, os resultados são contraditórios e, enquanto alguns autores (Riddell, 1975b; Sheridan et al, 1976; Burton et al, 1981) encontraram uma correlação genética negativa, outros (Poulos et al, 1978; Kiiskinen e Andersson, 1982), encontraram uma correlação genética positiva, entre o peso corporal e a incidência e a gravidade das lesões discondroplásicas.

Embora seja uma patologia espontânea, a incidência e a gravidade das lesões discondroplásicas, podem, no entanto, ser afectadas por vários factores, designadamente: (i) desequilíbrios na relação Ca:P na dieta (Edwards e Veltman, 1983; Edwards, 1984; Hulan et al, 1985; Williams et al, 2000; Hocking et al, 2002); (ii) níveis elevados de cloreto, na dieta, fazem aumentar a incidência de lesões discondroplásicas (Leach e Nesheim, 1972; Veltmann e Jensen, 1981); (iii) dietas excedentárias em aminoácidos sulfurados (em homocisteína, cisteína

e cistina, mas não em metionina), induzem o aparecimento da discondroplasia (Bai e Cook, 1994; Bai et al, 1994; Orth et al, 1991,1994); (iv) dietas deficientes em cobre induzem lesões histologicamente similares à discondroplasia (Carlton e Henderson, 1964; Lilburn e Leach, 1980; Rosselot et al, 1994); (v) dietas excedentárias em histidina induzem o aparecimento de discondroplasia (Andrews et al, 1989); (vi) o tipo de lípidos da dieta pode influenciar a gravidade das lesões discondroplásicas [óleo de soja hidrogenado, o qual contém ácidos gordos *trans*, faz aumentar a gravidade e a incidência das lesões quando substitui o óleo de soja nas dietas de frangos de carne (Watkins et al, 1991)]; (vii) a administração de alguns ditiocarbamatos, designadamente, disulfiram (Edwards, 1985, 1987; Andrews et al, 1989) e tirame (Edwards, 1987; Vargas et al, 1983; Ben-Bassat et al, 1999), induz o aparecimento de lesões discondroplásicas; (viii) vários autores observaram um aumento na incidência de discondroplasia em animais alimentados com dietas contaminadas com micotoxinas da espécie *Fusarium* (Haynes e Walser, 1986; Wu et al, 1991; 1993; Chu et al, 1995; 1996); (xix) alterações no balanço metabólico ácido-base, através da manipulação de vários electrólitos na dieta, resultaram num incremento da incidência de discondroplasia (Leach e Nesheim, 1972; Sauver et al, 1977; Sauver e Mongin, 1978; Veltmann e Jensen, 1981; Halley et al, 1987). O conhecimento destes factores, e do seu modo de acção, e a sua utilização como agentes indutores da discondroplasia, podem ajudar a compreender melhor esta patologia e a estabelecer os seus mecanismos de indução.

Os dados relativos ao grau de incidência de lesões são extremamente variáveis, o que tem a ver com a idade dos animais em que é feita a avaliação, e com o facto de estarmos a falar numa situação espontânea ou induzida. Os valores indicados na bibliografia dizem sempre respeito à epífise proximal da tibia, local de maior prevalência da patologia. O grau de incidência de lesões espontâneas é, geralmente, de 1-2% (Capps, 1998), pode atingir cerca de 40% (Burton et al, 1981; Wong-Valle et al, 1993; Capps, 1998), tendo chegado mesmo aos 59%, em animais com 42 dias de idade (Yalçin et al, 1996). Numa linha de *broilers* seleccionada para elevada incidência de discondroplasia, Wong-Valle et al (1993) observaram valores da ordem dos 62%, e Ling et al (2000) cerca dos 70%. Relativamente à indução experimental, o grau de incidência está dependente do agente indutor e da dose utilizada. Wu et al (1993), utilizando a micotoxina de *Fusarium*, obtiveram, em *broilers* com 3 semanas de idade, valores da ordem dos 90% (administrando 37 ppm da micotoxina) e de 100% (para 75 ppm). Os mesmos autores, e nas mesmas condições, mas através do modelo-tirame, obtiveram incidências da ordem dos 90% (37 ppm) e 95% (75 ppm). Com o mesmo modelo experimental, Wu et al (1990) obtiveram, em animais com 3 semanas, 89% (35 mg de tiram/Kg de dieta) e 100% (75 mg de tirame). Por seu lado, Knopov et al (1995) obtiveram, em animais com 4 semanas, 90% de incidência utilizando 25mg/Kg de tirame e 91% administrando uma dieta deficiente em cobre. Edwards (1989), por seu lado, e através da administração de disulfiram na dieta, na dose de 30 mg/Kg, atingiu valores da ordem dos 77%. Orth et al (1992), utilizando os modelos cisteína (nível máximo do aminoácido 2%) e homocisteína (0.6%)

obtiveram uma incidência, em animais com 3 semanas, de 88% e 89%, respectivamente. Rennie et al (1993), através do modelo Ca/P chegaram a atingir valores da ordem dos 50 a 70%, em animais com 3 semanas de idade.

A massa de cartilagem que se acumula na discondroplasia é, na maior parte dos casos, facilmente observável aquando da realização da necrópsia efectuando um corte sagital nas epífises. Lesões de menor dimensão, geralmente, estão restringidas a pequenas ilhas de cartilagem na zona posterior medial da epífise. As lesões de maior gravidade, podem, no entanto, ocupar toda a metáfise, e à sua volta não existe osso cortical ou este é muito fino (Capps, 1998). Por outro lado, podem ser encontradas fracturas abaixo da zona ocupada pela cartilagem. A lesão é bilateral afectando os ossos dos dois membros (Riddell et al, 1971; Riddell, 1975a). De acordo com Riddell (1975a), em cerca de 10% dos animais afectados podem também ser encontradas lesões discondroplásicas no tarsometatarso proximal, mas não nas placas de crescimento dos outros ossos longos. Outros autores, no entanto, referem a existência de lesões nas placas de crescimento de todos os ossos longos (Capps, 1998; Julian, 1998). As lesões podem aparecer antes dos animais atingirem os 7 dias de idade, mas, normalmente, o início da acumulação de matriz extracelular na discondroplasia espontânea ocorre a partir das 3-4 semanas (Wise e Jennings, 1972; Parkinson et al, 1992; Ling et al, 1995; Capps, 1998). Nas placas de crescimento que apresentam lesões discondroplásicas, a zona de proliferação aparece normal mas um pouco mais espessada e, na zona de hipertrofia, onde os condrócitos começam a ficar arredondados, as lacunas alargam, ocorre um incremento na matriz extracelular, e não chegam a atingir completamente a hipertrofia (Hargest et al, 1985; Leach e Gay, 1987; Leach e Lilburn, 1992; Thorp et al, 1993). A ausência da hipertrofia total dos condrócitos está associada a uma falha na calcificação da matriz e a uma falha na invasão vascular (Orth e Cook, 1994; Nie et al, 1995). Sem se verificarem estes processos, não há remoção da cartilagem e a cartilagem pre-hipertrofica persiste. No centro desta cartilagem hipertrofica muitas das lacunas estão vazias e outras têm condrócitos com aspecto enrugado, núcleos picnóticos e citoplasma eosinófilo. Os condrócitos são necróticos, em resultado de uma possível depleção energética devida à fraca penetração vascular. Na zona distal da metáfise, a cartilagem, a invasão vascular e a organização das trabéculas ósseas têm um aspecto desordenado (Leach e Lilburn, 1992). Podem ainda ser encontradas pequenas rupturas microscópicas na cartilagem em resultado de forças de tensão (Riddell et al, 1983).

Pretende-se com o presente capítulo, avaliar a incidência e a gravidade de lesões discondroplásicas e caracterizá-las macroscópica e microscopicamente.

## 4.2 Materiais e Métodos

Para a realização deste capítulo, para além da tibia, foram igualmente removidos o tarsometatarso, o fémur e o úmero. Todas as epífises, proximais e distais, esquerdas e direitas, foram seccionadas longitudinalmente, para observação macroscópica da presença de lesões discondroplásicas. A gravidade das lesões foi determinada de acordo com o seguinte critério: epífise normal = 1; lesão pequena (< 3 mm de penetração da lesão na metáfise) = 2; lesão moderada (3-6 mm) = 3; lesão grave (> 6 mm) = 4 (Roberson et al, 1993). Um valor de 2 ou superior foi considerado positivo para calcular a percentagem de incidência de lesões.

Para observação microscópica das placas de crescimento, as epífises proximais das tibias foram processadas de acordo com o referido na Tabela 3.1. Dos blocos obtidos foram feitos cortes com 5 µm de espessura, e após montagem em lâminas de 75 x 25 mm, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina e com Tricrómicos de Azan (Bio-Óptica, ref<sup>ª</sup> 001802), de Masson (Bio-Óptica, ref<sup>ª</sup> 010802) e de Picro-Mallory (Bio-Óptica, ref<sup>ª</sup> 021822), para observação da estrutura geral. Foram observadas lâminas correspondentes a 10 animais de cada grupo, 1 lâmina/animal.

## 4.3 Resultados

Os primeiros sinais clínicos começaram a ser evidentes a partir dos 4-5 dias, embora em apenas 12% dos animais. Estes indivíduos foram identificados com base em evidentes dificuldades de locomoção, com paragens constantes e consequente imobilização, resultados confirmados por análise histológica. No dia do sacrifício as diferenças verificadas entre os pesos corporais entre os animais dos dois grupos foram significativas ( $p < 0.05$ ), não se verificando, contudo, dentro de cada grupo, diferenças significativas entre machos e fêmeas (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1** Peso corporal (g) aos 21 dias (média ± desvio padrão)

Sexo	n <sup>1</sup>	Controlo	Experimental
Machos	10	692,1 ± 34,9 <sup>a</sup>	410,6 ± 26,6 <sup>b</sup>
Fêmeas	10	665,8 ± 27,4 <sup>a</sup>	407,2 ± 15,3 <sup>b</sup>
Total	20	682,5 ± 34,3 <sup>a</sup>	409,6 ± 23,5 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> 10 animais/grupo; valores, na mesma linha, com índice diferente diferem significativamente para  $p < 0.05$

Os resultados relativos ao grau de incidência das lesões, encontram-se na Tabela 4.2, considerando o total dos dois sexos e dos dois membros, uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para  $p > 0.05$ .

**Tabela 4.2** Número de placas de crescimento com lesões discondroplásicas aos 21 dias

Placa de crescimento	n (epífises)	Grupo		
		Controlo	Experimental	
			nº de epífises com lesões	%
Fémur distal	40	0	26	65
Fémur proximal	40	0	34	85
Tarsometatarso distal	40	0	Nd	-
Tarsometatarso proximal	40	0	11	27.5
Tibiotarso distal	40	0	21	52.5
Tibiotarso proximal	40	0	34	85
Úmero distal	40	0	2	5
Úmero proximal	40	0	12	30

Nd-Não determinado

No grupo controlo não foram observadas lesões, enquanto que no grupo experimental estas atingiram valores da ordem dos 85% nas placas de crescimento proximais da tibia e do fémur. A placa de crescimento com menor grau de incidência foi a do úmero distal (5%). Dentro de cada osso, as placas de crescimento proximais foram mais afectadas do que as distais.

Os resultados relativos à gravidade das lesões, encontram-se na Tabela 4.3, considerando o total dos dois sexos e dos dois membros, uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para  $p > 0.05$ .

**Tabela 4.3** Gravidade das lesões discondroplásicas aos 21 dias \*

Placa de crescimento	n (epífises)	Grupo	
		Controlo	Experimental
Fémur distal	40	1	1,78 <sup>b</sup>
Fémur proximal	40	1	2,40 <sup>a</sup>
Tarsometatarso distal	40	1	Nd
Tarsometatarso proximal	40	1	1,33 <sup>c</sup>
Tibia distal	40	1	1,60 <sup>b</sup>
Tibia proximal	40	1	2,45 <sup>a</sup>
Úmero distal	40	1	1,05 <sup>c</sup>
Úmero proximal	40	1	1,40 <sup>c</sup>

\* epífise normal = 1; lesão pequena (< 3 mm de penetração da lesão na metáfise) = 2; lesão moderada (3-6 mm) = 3; lesão grave (> 6 mm) = 4 (Roberson et al, 1993). Nd-Não determinado; valores com índice diferente diferem significativamente para  $p < 0.05$

Quanto à gravidade das lesões, as placas de crescimento proximais da tibia e do fémur apresentaram os valores mais elevados, 2.45 e 2.40, respectivamente. As lesões menos graves verificaram-se no úmero distal (1.05). Também relativamente a este aspecto, e dentro de cada osso, as placas de crescimento proximais apresentam lesões mais graves do que as distais. Quanto à morfologia, as secções sagitais e transversais das epífises proximais das tíbias dos animais do grupo controlo mostram um aspecto normal, sem qualquer tipo de lesão discondróplásica, e uma perfeita vascularização de toda a epífise (Figuras 4.1 e 4.2). As placas de crescimento normais são constituídas por células em proliferação mais ou menos achatadas, uma banda estreita de condrócitos de transição arredondados e uma larga zona de condrócitos arredondados e hipertrofiados (Figura 4.1). Pelo contrário, nas placas de crescimento que apresentam lesões discondróplásicas, a zona de proliferação aparece normal mas um pouco mais espessada sendo possível observar uma acumulação de condrócitos de transição, e no centro da acumulação, alguns dos condrócitos são fortemente eosinofílicos e alguns núcleos são picnóticos (Figura 4.1). Na zona de hipertrofia, onde os condrócitos começam a ficar arredondados, as lacunas alargam, ocorre uma acumulação de matriz, e estes não chegam a atingir a hipertrofia completa (Figura 4.1). Nas epífises dos animais do grupo experimental, são facilmente observáveis, maiores ou menores, lesões discondróplásicas, e de vários tipos, sendo a vascularização praticamente inexistente (Figuras 4.2 e 4.3).

#### 4.4 Discussão

Em nenhum outro sector da produção animal, a utilização do conhecimento científico teve um impacto tão acentuado no progresso da eficiência económica, como na avicultura (Hartmann, 1989, 1992). Este impacto traduziu-se, em particular na última metade deste século, nos impressionantes incrementos verificados nas taxas de crescimento. No sector da carne da indústria avícola, as alterações no crescimento e no desenvolvimento da carcassa das estirpes comerciais foram muito acentuadas (Nestor et al, 1988; Havenstein et al, 1994; Lilburn, 1994). Para os criadores de frangos de carne e de perus, o objectivo da selecção foi, durante muitos anos, o peso corporal à idade de abate e a conformação da carcaça, em particular os músculos do peito (Havenstein et al, 1988). Dados recolhidos da literatura mostram que nos últimos 20 anos, o peso corporal dos *broilers* comerciais aos 56 dias de idade praticamente duplicou de 1600 gr para 3000 gr (Deaton e Reece, 1970, cit. por Lilburn, 1994; Acar et al, 1993). Durante o mesmo período de tempo, o crescimento do músculo *Pectoralis major* sofreu um incremento a um ritmo superior ao do peso corporal (Lilburn, 1994). Halvorson e Jacobson (1970), referem que nos *broilers* comerciais o peso total do músculo *Pectoralis major* era de 57,3 g às 9 semanas, o que representa aproximadamente metade do peso do mesmo músculo às 4 semanas em 1993, ou seja, 101,5 g (Acar et al, 1993). Trabalhos relativos a perus mostram alterações similares, embora num período de tempo ligeiramente superior (Lilburn, 1994). O peso comercial às 16 semanas de idade aumentou de 6 kg em 1963 (Sullivan e Al-Ubaidi, 1963), para 12 Kg em 1992 (Turner e Lilburn, 1992). No que diz respeito ao músculo peitoral,

Lilburn e Nestor (1991) referem que o *Pectoralis major* pesava 2 kg (21,4% do peso vivo) às 16 semanas numa linha comercial de machos, enquanto que nos anos 60, numa linha representando o animal comercial padrão, pesava apenas 0,85 Kg. Uma ênfase secundária foi dada à eficiência alimentar e à ausência de problemas nos membros locomotores e outros defeitos (Havenstein et al, 1988). Estes objectivos foram estabelecidos partindo do pressuposto que a selecção para a taxa de crescimento iria resultar num incremento proporcional de todas as partes do corpo, o que se provou não ser exactamente assim (Havenstain et al, 1988; Lilburn e Nestor, 1991; Nestor et al, 1987; Nestor et al, 1988; Turner e Lilburn, 1992). Com efeito, estas alterações parecem ter contribuído para o aumento de problemas no esqueleto, em particular nos membros locomotores (Havenstain et al, 1988; Leach e Lilburn, 1992; Sullivan, 1994), e para uma diminuição da adaptabilidade do esqueleto (Pitsillides et al, 1999). De acordo com vários autores (Nestor et al, 1985; Lilburn, 1994; Crespo et al, 2000), parece existir uma incompatibilidade biológica nas estirpes comerciais de elevado peso corporal e de baixa capacidade de sustentação (músculos e ossos das pernas), e estes desequilíbrios esqueléticos-biomecânicos, provavelmente, potenciam o efeito de várias causas dos problemas verificados nos membros locomotores. Thorp (1992) sugere mesmo, que perturbações mecânicas e decorrentes da pressão dos elevados pesos corporais podem estar envolvidas no início da discondroplasia, e Praul et al (2000) sugerem que a estimulação mecânica em combinação com o genótipo e uma variedade de factores da dieta provocam a disrupção da complexa cadeia de eventos envolvidos na diferenciação dos condrócitos. A análise da investigação efectuada, acerca das interacções dieta-discondroplasia, permite concluir que existe uma correlação positiva muito acentuada entre a taxa de crescimento e a incidência da lesão em todas as espécies afectadas (Andrews et al, 1975; Buffington et al, 1975; Cook et al, 1984; Leach e Lilburn, 1992; Waldroup et al, 1993; Wise e Nott, 1975). Adicionalmente, a ausência de discondroplasia em estirpes de crescimento lento parece corroborar esta correlação. Wise (1970) refere que, para iguais pesos corporais, os *broilers* apresentam um sistema esquelético num estado de maturação inferior, quantitativa e qualitativamente, relativamente às poedeiras, que, como se sabe, têm menores taxas de crescimento. Contudo, quando se comparam animais afectados com animais não afectados, relativamente a um tratamento particular, a relação entre a taxa de crescimento e a incidência, ou a gravidade da discondroplasia, é menos clara (Leach e Nesheim, 1965; Riddell, 1975b). Em ensaios em que foram avaliados os efeitos na incidência da discondroplasia (Lilburn et al, 1989), ou quando se tentou estabelecer a correlação individual entre o crescimento da tibia e a incidência da discondroplasia (Riddell, 1975b), as diferenças verificadas no desenvolvimento do esqueleto, sob o ponto de vista macroscópico, não foram evidentes. Assim, parece que não é uma taxa de crescimento absoluta do animal o factor determinante, mas sim a capacidade do animal em atingir a sua taxa de crescimento óptima potencial (Leach e Lilburn, 1992). Deste modo, qualquer tratamento que altere esta relação certamente alterará a incidência da discondroplasia, o que apenas será conseguido com regimes de restrição alimentar (Edwards e Sorensen, 1987; Wise e Nott, 1975). Convém, no entanto, referir que Leterrier et al (1998) não



observaram alterações significativas em várias características da tíbia de *broilers*, reduzindo a taxa de crescimento através da utilização duma dieta de baixa teor energético. No presente trabalho, em nenhum dos ensaios realizados os animais do grupo controlo apresentaram quaisquer sinais de discondroplasia, o que aliás foi comprovado no momento das necrópsias. Por outro lado, dadas as evidentes dificuldades de locomoção, os animais ingeriram menores quantidades de alimento, o que explica os pesos corporais inferiores dos animais do grupo experimental.

Quanto a uma eventual predisposição sexual na incidência da discondroplasia, ainda que existam evidências da associação da doença com um gene maior ligado ao sexo (Siller, 1970), as diferenças encontradas por vários autores (Leach e Nesheim, 1965; Sheridan, 1974; Sheridan et al, 1976; Edwards, 1984; Cherel et al, 1991; Zhang et al, 1999), na incidência e na gravidade das lesões entre machos e fêmeas, podem estar relacionadas com questões hormonais (Rath et al, 1996) ou com o dimorfismo sexual relativo ao peso corporal. Com efeito, o facto das fêmeas serem menos pesadas do que os machos, pode fazer diminuir o grau de incidência da discondroplasia e a gravidade das lesões. Cherel et al (1991) referem que, para a mesma idade, as fêmeas de perus têm uma menor incidência de discondroplasia do que os machos. O dimorfismo sexual relativamente ao peso corporal é observado em muitas espécies de aves, incluindo as domésticas, sendo os machos, na maioria dos casos, mais pesados do que as fêmeas (Amadon, 1959 cit. por Mitchell e Burke, 1995; Lilburn e Nestor, 1991; Baeza et al, 1998, 1999; Mignon-Grasteau et al, 1998; Shalev e Pasternak, 1998), excepto no caso da codorniz (*Coturnix coturnix japonica*), em que se verifica o contrário (Sefton e Siegel, 1974; Oguz et al, 1996). Por outro lado, a selecção artificial para o aumento de peso vivo fez aumentar estas diferenças entre sexos, o que sugere a existência de influências genéticas no dimorfismo sexual relativamente a este carácter (Mignon-Grasteau et al, 1998). No caso da galinha, os machos são mais pesados do que as fêmeas cerca de 15 a 20% (Singh et al, 1989 e Van der Horst, 1994 cit. por Mignon-Grasteau et al, 1998). Actualmente, na avicultura industrial, a criação de frangos de carne não é feita com separação de sexos, pelo que os bandos de *broilers* incluem, assim, dois tipos diferentes de aves, com padrões de crescimento e requisitos de nutrição distintos (Cobb News, 12 cit. por Selecciones Avícolas, 1998; Shalev e Pasternak, 1998). Vários estudos têm sido publicados que mostram melhores taxas de crescimento e de eficiência alimentar para os machos (Edwards et al, 1973; Leeson e Summers, 1980; Havenstein et al, 1994), com um padrão de crescimento mais rápido e melhor índice de conversão, pelo que as fêmeas produzem uma carcaça com menor peso vivo (Cobb News, 12 cit. por Selecciones Avícolas, 1998). No entanto, segundo os resultados de Rose et al (1996), as diferenças entre machos e fêmeas, no que diz respeito ao peso corporal, apenas se começam a fazer sentir a partir dos 26 dias de idade. Nós próprios (ver Rodrigues et al, 2001) observámos, em trabalho preliminar, que aos 21 dias ainda não existem diferenças significativas entre machos e fêmeas. O facto de no presente trabalho, aos 21 dias, as diferenças entre os pesos corporais de machos e fêmeas não serem ainda significativas pode

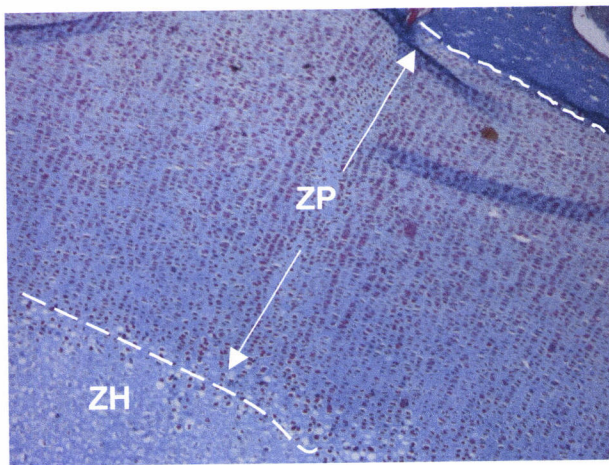
explicar, pelo menos em parte, não terem sido encontradas diferenças na incidência entre os dois sexos.

Em *broilers* existem relativamente poucos trabalhos que quantifiquem aspectos físicos do crescimento do esqueleto ou que comparem o crescimento relativo de diferentes ossos longos (Lilburn, 1994). Por outro lado, existem igualmente poucos trabalhos sobre as alterações sofridas pelo fêmur, ao contrário do que acontece com a tíbia (Lilburn, 1994). No entanto, existem alguns trabalhos que indicam que a taxa de mineralização, e outros aspectos do desenvolvimento do fêmur, é menor do que na tíbia, o que sugere que, sob este ponto de vista, o fêmur deve ser importante nas anomalias verificadas no desenvolvimento do ossos longos (Lilburn, 1994). Alguns trabalhos (Church e Johnson, 1964; Itoh e Hatano, 1964; Dilworth e Day, 1965, *cits.* por Lilburn, 1994; Castanet et al, 1996; Applegate e Lilburn, 2002) confirmaram características de mineralização e de crescimento independentes de cada osso longo e, em particular, o atraso no desenvolvimento do fêmur quando comparado com a tíbia. A tíbia é o osso que apresenta a maior taxa de crescimento em comprimento na sua placa de crescimento proximal (Church e Johnson, 1964; Kirkwood et al, 1989; Barreto e Wilsman, 1994). Em *broilers* o comprimento da tíbia duplica na primeira semana e aumenta aproximadamente 2 mm/dia até às seis semanas de idade (Thorp, 1988). Deste modo, as primeiras semanas de idade são críticas para o desenvolvimento do esqueleto, com um aumento acentuado na massa, na mineralização e no comprimento dos ossos (Parkinson et al, 1992, 1996). Segundo Lilburn (1994), os 7 primeiros dias são críticos para o desenvolvimento de todo o esqueleto, o que está de acordo com os resultados de Wise (1970) e de Parkinson et al (1992, 1996). As placas de crescimento têm um crescimento diferenciado, crescendo as proximais mais rapidamente do que as distais (Riddell, 1975c; Thorp, 1988; Kirkwood et al, 1989; Barreto e Wilsman, 1994). A placa de crescimento que cresce mais rapidamente é a tíbia proximal, enquanto as equivalentes do tarsometatarso e do úmero têm taxas de crescimento inferiores cerca de 4 e 33%, respectivamente (Riddell, 1975c). Embora menores taxas de crescimento façam diminuir a incidência de discondroplasia, Riddell (1975c) não encontrou correlação entre estes dois parâmetros. Por outro lado, vários autores (Bond et al, 1991; Rose et al, 1996; Rath et al, 1999; Yalcin et al 2001), encontraram diferenças no crescimento e nas características da tíbia entre machos e fêmeas. Mas, enquanto Yalcin et al (2001) referem que essas diferenças começam a ser significativas a partir dos 16 dias, os resultados de Rose et al (1996), por seu lado, dão indicações que essas diferenças apenas se começam a notar a partir dos 26 dias. Com efeito, o facto das placas de crescimento que atingiram a mais elevada incidência de lesões, e de maior gravidade, terem sido a tíbia e o fêmur proximais, e a placa de crescimento com menor grau de incidência e com lesões menos graves ter sido a do úmero distal, por um lado, e o facto das placas de crescimento proximais, de crescimento mais rápido, terem sido mais afectadas do que as distais, por outro, sugerem que a taxa de crescimento, neste caso dos ossos, pode estar associada com o desenvolvimento da discondroplasia. Deste modo, e sendo possível estabelecer uma relação causa-efeito, entre a taxa de crescimento dos ossos e o

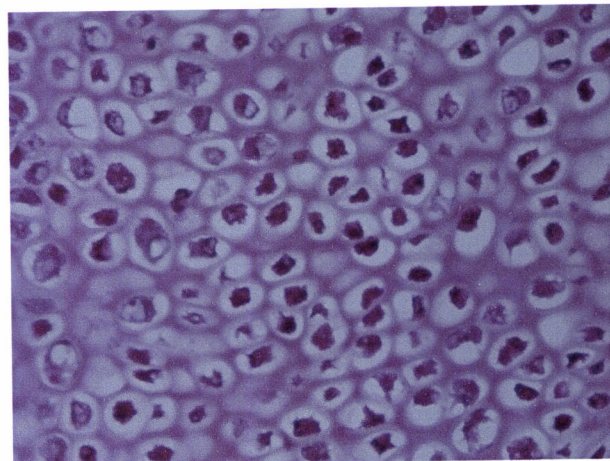
aparecimento de lesões discondroplásicas, tal associação pode ter a ver com o facto dos tecidos envolvidos não estarem ainda maduros, e necessitarem de mais tempo do que aquele que o crescimento acelerado permite; com um incremento de produtos do catabolismo (ácido láctico, dióxido de carbono), derivados do crescimento rápido; com uma maior susceptibilidade das células jovens às condições de *stress* criadas por esse rápido crescimento; ou com uma necessidade acrescida das células especializadas (condrócitos em proliferação e hipertróficos) em nutrientes, factores de crescimento e oxigénio (Julian, 1998). Por exemplo, Leterrier e Nys (1992), concluíram que um aumento da taxa de crescimento em *broilers*, está associado com uma menor densidade óssea e com uma maior porosidade do córtex da tíbia, o que se traduz na diminuição das suas propriedades mecânicas. Quanto aos dados do fémur, com uma taxa de incidência de discondroplasia igual à da tíbia e com lesões de gravidade similar, eles poderão ser considerados surpreendentes, ou não, se levarmos em linha de conta que, segundo Lilburn (1994), nas estirpes comerciais modernas, o fémur poderá ser o osso fulcral no que diz respeito às questões relacionadas com os desequilíbrios esqueléticos-biomecânicos, decorrentes dos elevados pesos corporais por elas atingidos.

Quanto à análise microscópica, os resultados obtidos não diferem dos resultados obtidos por outros autores, quer nos casos de discondroplasia espontânea, quer nos casos de indução por outros agentes, tendo as placas de crescimento discondroplásicas apresentado as características histológicas típicas da patologia, e anteriormente referidas. Nalguns casos, é natural que a verdadeira causa da discondroplasia potencie o desenvolvimento de outras patologias, de diferentes etiologias, mas traduzidas por características histológicas similares. A variedade de factores que fazem aumentar a incidência e a gravidade das lesões discondroplásicas, provavelmente através de diferentes mecanismos de acção (ver Discussão Final), faz supor que a discondroplasia tem uma origem multifactorial. Por outro lado, o facto de serem obtidos resultados tão contraditórios entre os vários autores que se têm dedicado ao estudo da discondroplasia, utilizando diferentes modelos, reforça a ideia dessa origem multifactorial e de mecanismos de acção diferenciados. Adicionalmente, o facto de no presente trabalho, os primeiros animais afectados terem surgido aos 4-5 dias, resultados idênticos aos obtidos por Vargas et al (1983), igualmente com o modelo-tirame, por um lado, e o facto de Ling et al (1995), apenas terem observado lesões macroscopicamente visíveis e alterações ultra-estruturais dos condrócitos aos 21 dias de idade, em animais de linhas seleccionadas para elevada incidência de discondroplasia (69%), enquanto aos 2, 7 e 14 dias para além de não serem visíveis lesões, a ultra-estrutura das placas de crescimento dos animais desta linha e duma linha de baixa incidência de discondroplasia (0,21%) serem similares, por outro, também sugerem podermos estar em presença de patologias com diferentes mecanismos de acção. Convém referir que relativamente a outros modelos, não encontramos informação disponível acerca desta questão. O facto dos primeiros sinais clínicos surgirem tão precocemente no modelo utilizado, sugere que as lesões induzidas pelo tirame poderão não ser do mesmo tipo das lesões espontâneas ou das lesões induzidas por outros agentes.

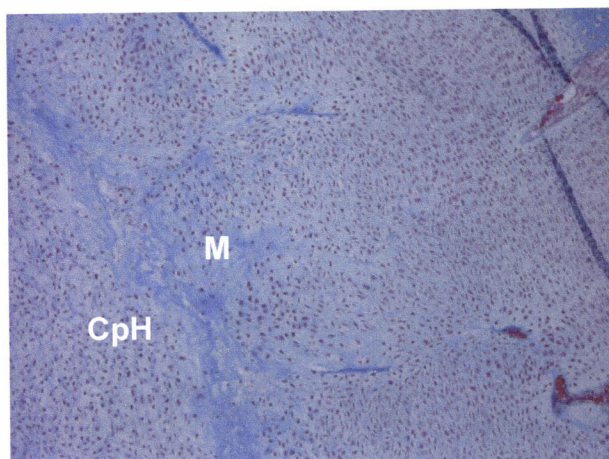
Quanto aos prováveis mecanismos de acção dos diferentes modelos existentes e a avaliação destes, serão apresentados na Discussão Final.



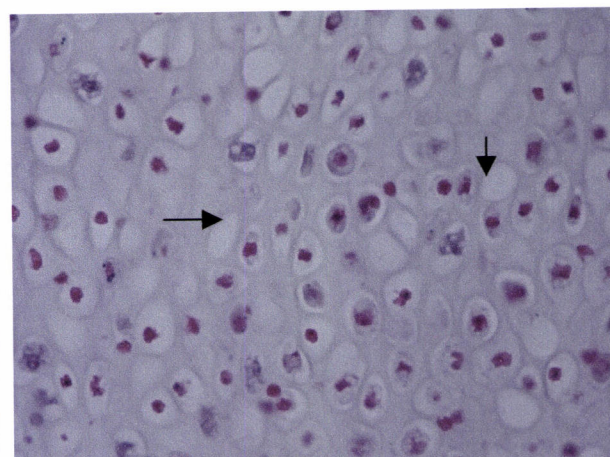
A (Tricrômico de Azan, X40)



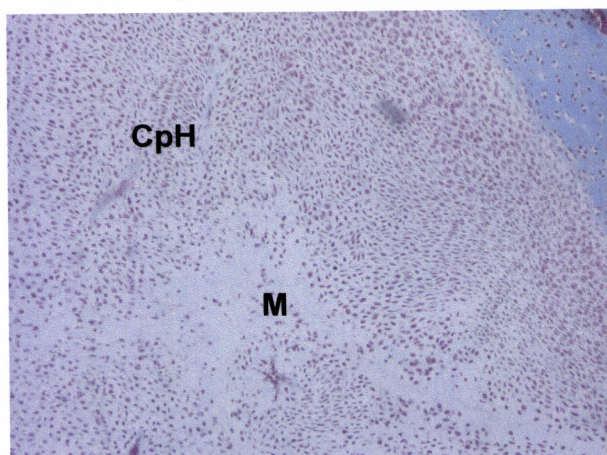
D (H&E, X200)



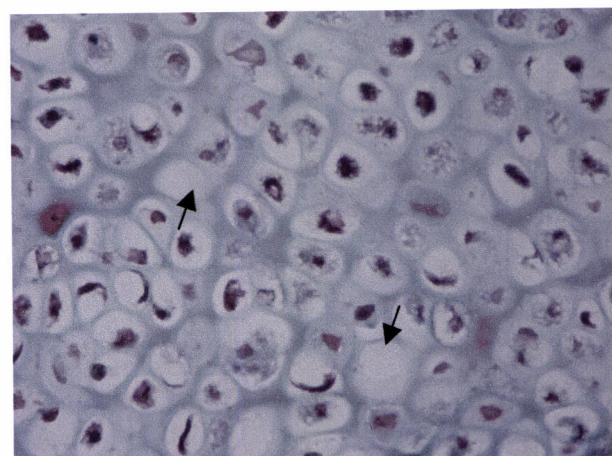
B (Tricrômico de Azan, X200)



E (H&E, X200)



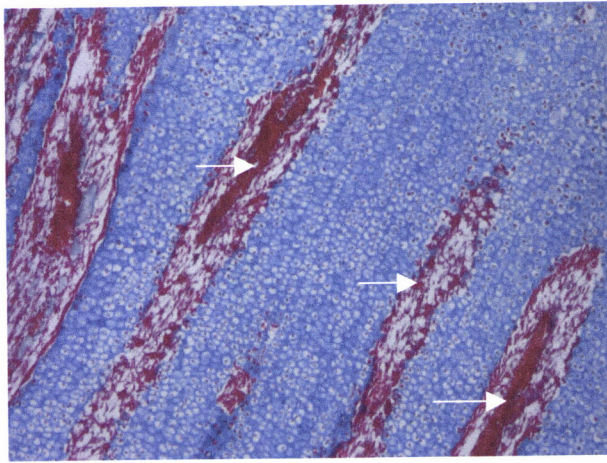
C (Tricrômico de Masson, X40)



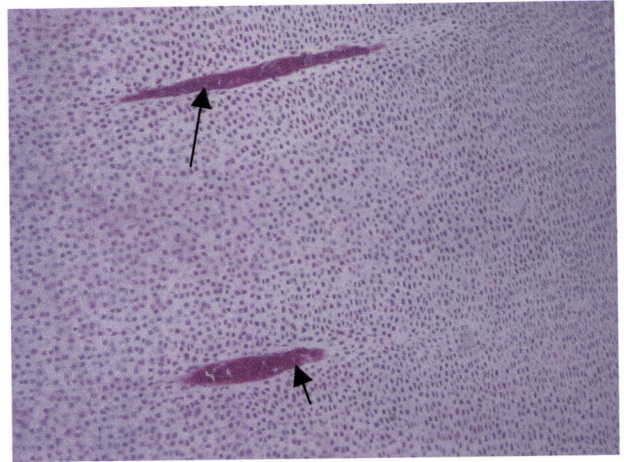
F (Tricrômico de Masson, X200)

**Figura 4.1 Estrutura geral e condrócitos da placa de crescimento.** A análise microscópica, permite observar que as placas de crescimento dos animais do grupo controle (A e D) mostram um aspecto normal, ao contrário das placas de crescimento dos animais do grupo experimental (B, C, E e F). Na imagem A, podemos observar toda a zona de proliferação (ZP) e a zona de pré-hipertrofia, e o início da zona de hipertrofia (ZH), o mesmo não sendo possível nas imagens B e C, em que é visível a acumulação de condrócitos pré-hipertroficados (CpH) e bastante matriz (M). Na imagem D é possível observar que os condrócitos apresentam um aspecto normal, ao contrário do que acontece nas imagens E e F, nas quais os condrócitos são necróticos, com aspecto enrugado, núcleos picnóticos e citoplasma eosinófilo. Nestas imagens é ainda possível observar inúmeras lacunas vazias (setas).

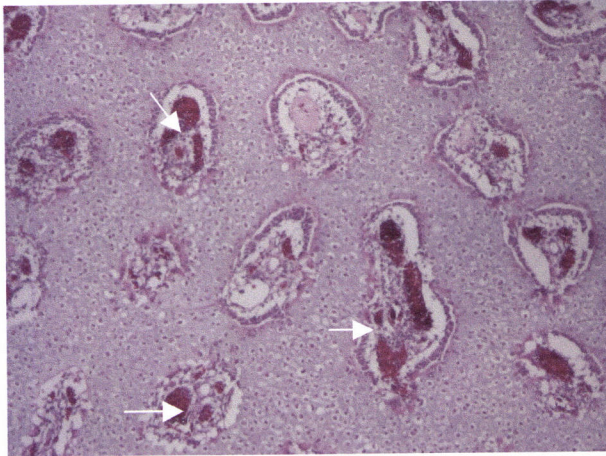




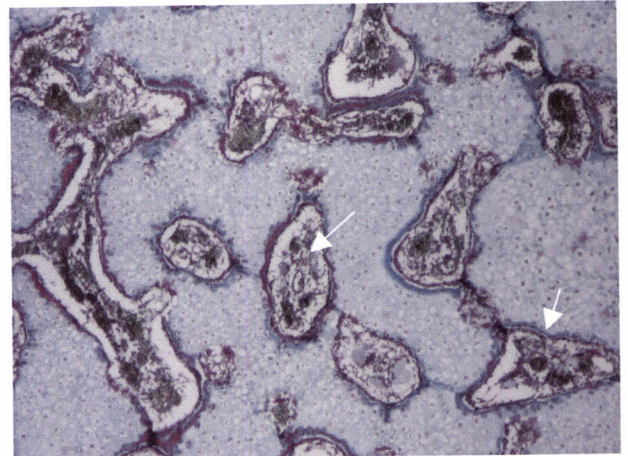
A (Tricrómico de Azan, X40)



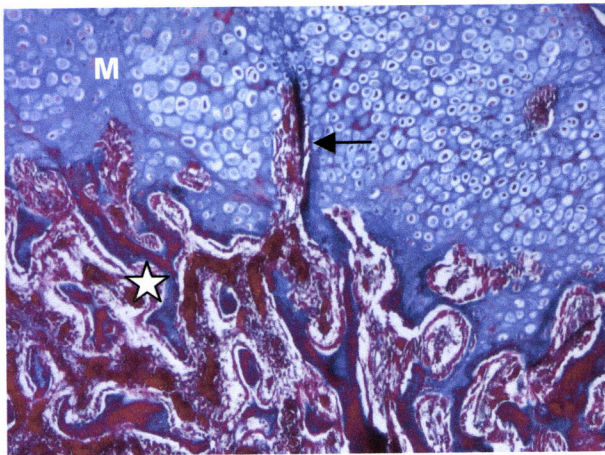
D (H&E, X40)



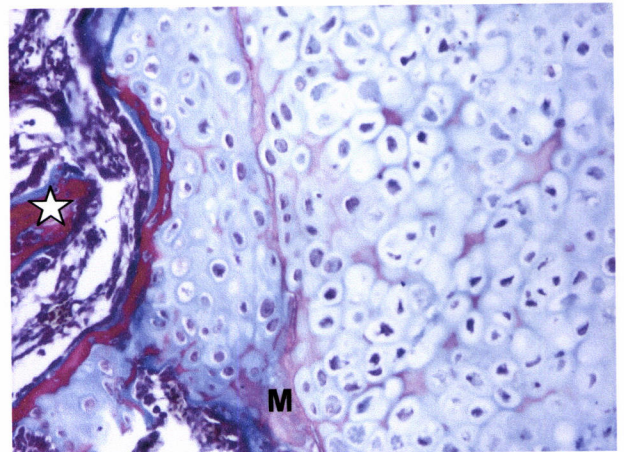
B (H&E, X40)



E (Tricrómico de Picro Mallory, X40)



C (Tricrómico de Azan, X40)

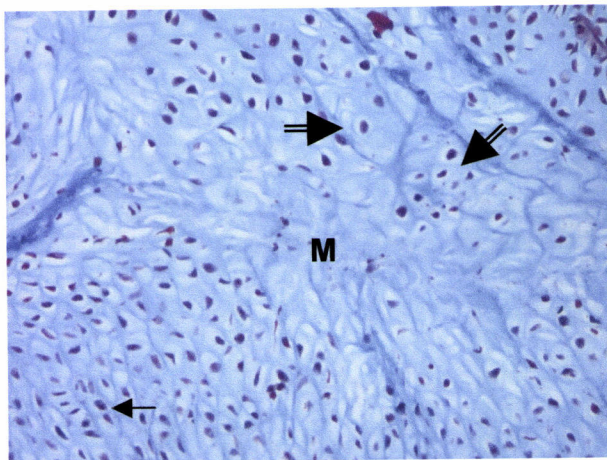


F (Tricrómico de Picro Mallory, X100)

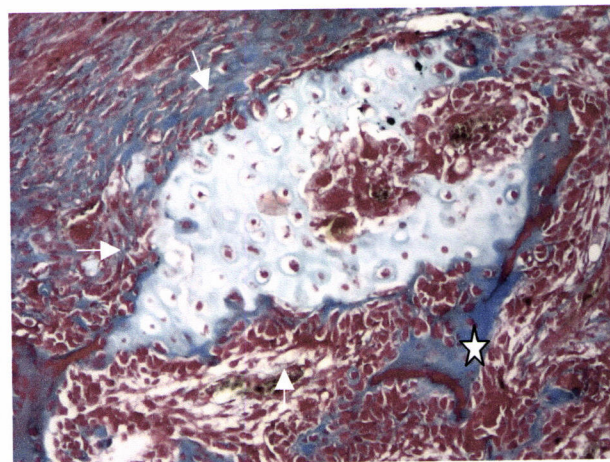
**Figura 4.2** Vascularização da placa de crescimento. As secções A (sagital) e B (transversal) de epífises proximais das tíbias dos animais do grupo controlo mostram um aspecto normal, sem qualquer tipo de lesão discondroplásica, e uma perfeita vascularização, estando os vasos (setas) bem definidos, penetrando ordenadamente a partir da metáfise. Pelo contrário, nas epífises dos animais do grupo experimental (C, D, E e F), a vascularização é praticamente inexistente (D, setas) e desordenada [setas nas imagens C (secção sagital) e E (secção transversal)]. Nas imagens C e F é possível observar que os vasos não conseguem penetrar a matriz (M) e a organização das trabéculas ósseas tem igualmente um aspecto desordenado (estrela).



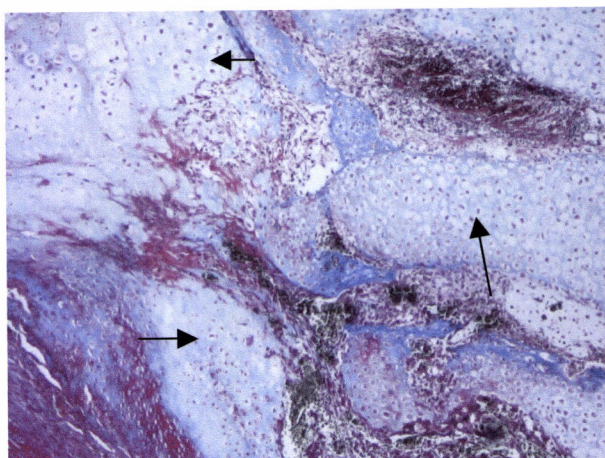




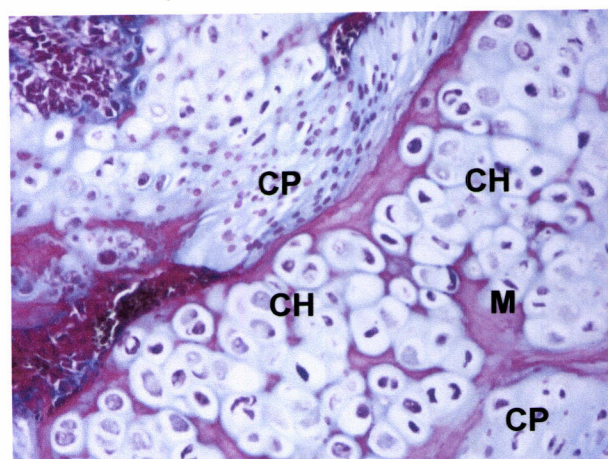
A (Tricrômico de Azan, X100)



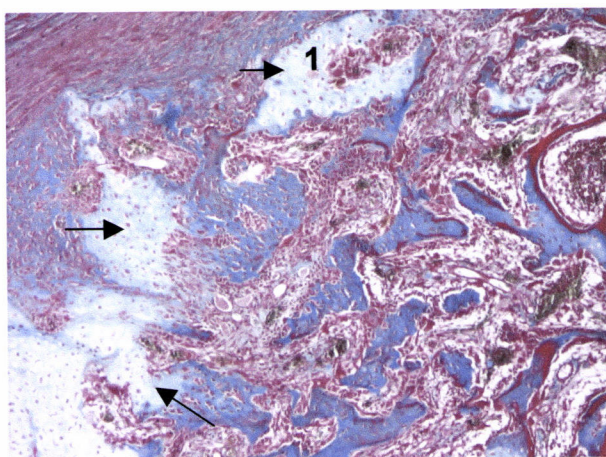
D (Tricrômico de Masson, X100)



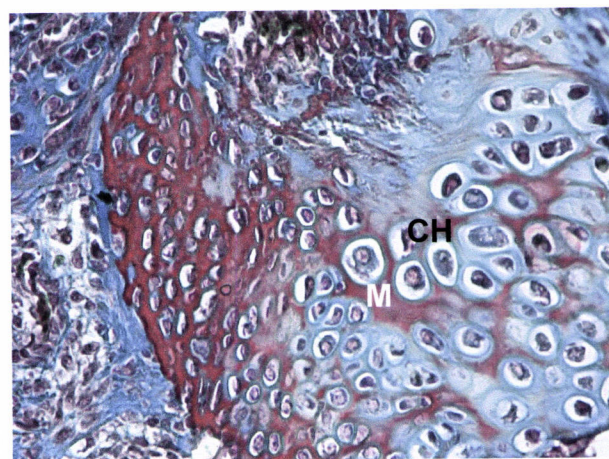
B (Tricrômico de Masson, X40)



E (Tricrômico de Masson, X100)



C (Tricrômico de Masson, X40)

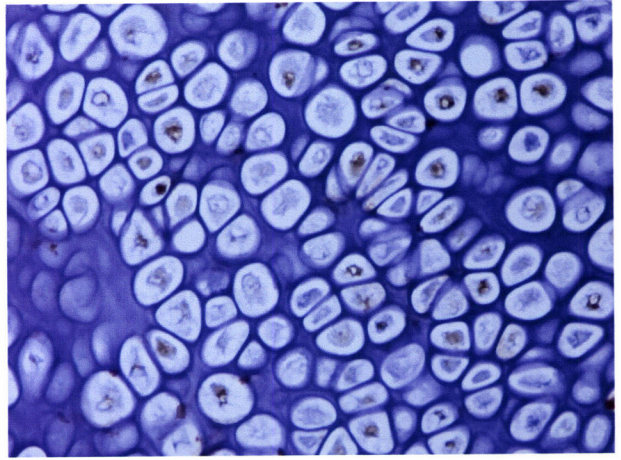


F (Tricrômico de Picro Mallory, X200)

**Figura 4.3 Lesões discondroplásicas.** Secções de placas de crescimento discondroplásicas onde é evidente a acumulação de matriz (M) por toda a epífise. Em A, podemos observar a matriz envolvida por condrócitos proliferativos (seta simples) e condrócitos pré-hipertróficos (dupla seta). Em B e em C, podemos observar focos de cartilagem (setas), desordenados e de distribuição aleatória. Em D, podemos observar a lesão 1, da imagem C, com uma maior ampliação, envolvida por tecido conjuntivo (setas) e uma trabécula óssea (estrela). Nas imagens E e F, é possível observar condrócitos em vários estádios de desenvolvimento, o que é evidenciado pela forma e pelo tamanho das células (proliferativos, CP; hipertróficos, CH) e abundante matriz (M).



## 5. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS NA DISCONDROPLASIA





## 5. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS NA DISCONDROPLASIA

### 5.1 Introdução

A homeostase dos tecidos animais normais baseia-se num delicado balanço entre vários processos. Quaisquer alterações nos mecanismos moleculares que os regulam, resultam num crescimento anormal em condições benignas ou malignas (Bonkhoff et al, 1999). No caso da ossificação endocondral, o equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação dos condrócitos, por um lado, e a produção dos componentes da matriz extracelular, e sua posterior degradação, por outro, são essenciais para o normal crescimento dos ossos longos (Blair et al, 2002).

Vários trabalhos referem que no processo de ossificação endocondral, à medida que a matriz calcifica os condrócitos hipertróficos vão atingindo o seu estágio de diferenciação final que, culmina com a sua morte por apoptose (Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995; Ohyama et al, 1997; Gibson, 1998), após o que se inicia a fase de degradação da matriz extracelular. Antes da sua morte, os condrócitos depositam o VEGF na sua matriz extracelular, o qual vai promover a invasão da cartilagem pelos vasos sanguíneos metafisários (Gerber et al, 1999). Estes, por sua vez, transportam as células responsáveis pela remoção da cartilagem mineralizada e pela formação do tecido ósseo. No entanto, embora a invasão da cartilagem pelos vasos sanguíneos metafisários seja necessária, não se sabe ainda se é a apoptose dos condrócitos hipertróficos o estímulo para o recrutamento dos vasos sanguíneos, e das células especializadas para a degradação da matriz extracelular, ou se, pelo contrário, é a invasão dos vasos sanguíneos, o sinal para a morte dos condrócitos, e para os passos subsequentes, transmitindo os sinais reguladores celulares e/ou humorais adequados (Gibson et al, 1995, 1997; Gerber et al, 1999).

Podemos, portanto, dizer que no processo de ossificação endocondral, a síntese da cartilagem da placa de crescimento está em equilíbrio com a calcificação e a degradação da cartilagem, e com a sua substituição por osso trabecular. Se a taxa de degradação da cartilagem é reduzida relativamente à síntese, então a cartilagem da placa de crescimento acumula-se, como acontece, por exemplo, na discondroplasia da tíbia. Recordemos que a discondroplasia consiste numa anomalia espontânea, ou induzida, nas placas de crescimento epifisárias dos ossos longos das estirpes de rápido crescimento das espécies avícolas, caracterizada pelo aparecimento de uma massa cartilaginosa avascular opaca, não calcificada, que se estende até à metáfise, numa zona em que, normalmente, existe osso trabecular (Leach e Lilburn, 1992; Orth e Cook, 1994). O *turnover* da cartilagem da placa de crescimento pode alterar-se por dois mecanismos: (1) incremento da taxa de proliferação dos condrócitos e da produção de matriz extracelular, sem alterações na taxa de ossificação endocondral; ou (2) taxa de proliferação de condrócitos "normal", com um decréscimo na taxa de degradação da cartilagem (Cook et al, 1994). Se este *turnover* se desequilibrar pelo primeiro dos mecanismos (incremento na taxa de

proliferação dos condrócitos), então a discondroplasia deveria estar positivamente correlacionada com o comprimento do osso, ou seja, os animais com discondroplasia teriam os ossos mais compridos. Para além de não ter sido encontrada nenhuma correlação entre estes dois aspectos (Bai et al, 1993), as taxas de proliferação celular encontradas nas placas de crescimento discondroplásicas e normais são similares (Farquharson et al, 1992; Loveridge et al, 1993). Estes resultados, eliminam como mecanismo possível para a acumulação de cartilagem observada na discondroplasia, um eventual incremento na taxa de proliferação. No entanto, outros trabalhos contrariam estas observações, uma vez que, e através da imunomarcacão PCNA, foram observadas células em divisão e um aumento da taxa de proliferação nas lesões (Pines et al, 1998). Estes autores (Pines et al, 1998), sugerem mesmo, que a presença de condrócitos em proliferação no interior das lesões é o evento primeiro na etiologia da discondroplasia. A presença destes condrócitos em proliferação pode, assim, por outro lado, explicar a ausência de marcadores da hipertrofia dos condrócitos que se verifica na discondroplasia, como sejam a actividade da fosfatase alcalina, do colagénio de tipo X e da osteopontina (Farquharson e Jefferies, 2000).

Para investigar acerca da possibilidade do segundo mecanismo ser determinante no estabelecimento da discondroplasia, ou seja, uma diminuição na reabsorção da cartilagem da placa de crescimento, foram usados como modelos de indução, o desequilíbrio da relação Ca:P da dieta (Thorp et al, 1993), a administração da toxina de *Fusarium* (Lawler et al, 1985, 1988) e o modelo cisteína (Bai et al, 1992). No modelo relação Ca:P desequilibrada, Thorp et al (1993) não observaram diferenças na actividade TRAP dos condroclastos/osteoclastos, entre as placas de crescimento de indivíduos normais e as placas de crescimento de indivíduos com lesões discondroplásicas. Por outro lado, Lawler et al (1985, 1988), utilizando o modelo-*Fusarium*, e através de análises histomorfométricas e da actividade da fosfatase ácida, concluíram, igualmente, não existirem diferenças significativas entre as placas de crescimento de indivíduos normais e as placas de crescimento de indivíduos com lesões discondroplásicas. Estes resultados, sugerem, portanto, que a acumulação de cartilagem na discondroplasia, não deve estar associada com um decréscimo da reabsorção da cartilagem da placa de crescimento.

No outro modelo utilizado, o modelo-cisteína, num dos estudos, foi avaliada a taxa de reabsorção da cartilagem embrionária em animais injectados na placa de crescimento, com um nível fisiológico de cisteína indutor de discondroplasia. A taxa de reabsorção da cartilagem embrionária foi significativamente menor no tibiotarso que recebeu a injeção de cisteína, mas não no osso controlo, injectado com PBS (Bai et al, 1992). A indução do aparecimento de lesões discondroplásicas e o decréscimo nas taxas de reabsorção da cartilagem embrionária, foram igualmente observadas, em animais alimentados com uma dieta com 3% de cisteína em comparação com animais alimentados com a dieta controlo (Bai et al, 1992). Estes estudos sugerem que a cisteína pode induzir o aparecimento de lesões discondroplásicas interferindo

com a reabsorção da cartilagem. Por outro lado, a capacidade para interferir com a reabsorção da cartilagem num tecido isolado, injectando cisteína, sugere que esta tem um efeito directo na cartilagem da placa de crescimento e não actua através de efeitos sistémicos ou hormonais. No outro estudo, foram realizados trabalhos *in vitro* para evidenciar uma eventual interferência da cisteína na degradação da cartilagem (Bai et al, 1992). Placas de crescimento proximais de tiobiotarsos foram removidas e incubadas em meio de cultura adequado, na presença, ou na ausência, de cisteína. Os níveis de degradação da cartilagem foram avaliados pela medição da libertação de sulfato de condroitina (produto do catabolismo dos proteoglicanos) e de hidroxiprolina (produto do catabolismo dos colagénios) (Bai et al, 1992). Embora a cisteína não tenha tido efeito na degradação dos proteoglicanos, a solubilização do colagénio foi reduzida em cerca de 50%, na concentração de cisteína de 20  $\mu$ M, e por completo na concentração de 20 mM. Por outro lado, foi feita a imunomarcação para a colagenase, em secções de placas de crescimento normais e discondroplásicas. Enquanto o tecido normal mostrou imunomarcação positiva para a colagenase em toda a zona de hipertrofia e na região de transição condro-óssea, as secções do tecido discondroplásico mostraram uma imunomarcação similar ao tecido normal apenas na zona pré-hipertrofica e na parte superior da zona de hipertrofia, mas uma marcação bastante reduzida na parte inferior da zona de hipertrofia e na região de transição condro-óssea. Portanto, os dados *in vivo* e os ensaios *in vitro*, por um lado, e os dados imunohistoquímicos, por outro, sugerem que a discondroplasia induzida pela cisteína, e ao contrário do que acontece com os modelos de desequilíbrio na relação Ca:P e *Fusarium*, pode ser o resultado do decréscimo da reabsorção da cartilagem da placa de crescimento e, mais especificamente, da produção de colagenase. Adicionalmente, Rath et al (1997), observaram uma diminuição da actividade de MMPs em lesões discondroplásicas espontâneas, sugerindo que esta redução pode ser, em parte, uma das razões para a acumulação de matriz extracelular na discondroplasia. Não estão ainda bem definidas as células responsáveis pela reabsorção da cartilagem (Leach e Lilburn, 1992), mas vários autores referem-se a elas, como sendo células indiferenciadas com propriedades macrofagocitárias (condroclastos/osteoclastos), capazes de produzirem a colagenase (Silvestrini et al, 1979; Gowan et al, 1984; Redini et al, 1988). Outros autores observaram, em ratos, anomalias na função osteoclástica, traduzidas por uma falha na vascularização da placa de crescimento, dando origem a lesões similares às da discondroplasia. Por exemplo, ratos transgénicos, deficientes em actividade TRAP, a qual é expressa pelos osteoclastos, apresentaram uma zona de hipertrofia expandida, não vascularizada, que se estendia até à metáfise (Hayman et al, 1996). Por outro lado, ratos *knockout* para a MMP-9 apresentaram igualmente uma zona de hipertrofia estendida, não vascularizada e áreas de células apoptóticas no centro desta zona (Vu et al, 1998), tal como acontece na discondroplasia. A importância dos osteoclastos no processo de reabsorção da cartilagem da placa de crescimento, foi ainda evidenciada pelo facto dos osteoclastos de ratos normais expressarem a MMP-9, e um transplante de medula óssea de um indivíduo normal recuperar o fenótipo nulo (Praul et al, 2000).

Uma das características da discondroplasia é a falha na vascularização da placa de crescimento (Riddel, 1977; Nie et al, 1995; ver Orth e Cook, 1994). Como já foi referido, sabe-se que a invasão da cartilagem pelos vasos sanguíneos metafisários é um passo necessário para que se complete o processo de ossificação endocondral. Não se sabe, contudo, se é a apoptose dos condrócitos hipertróficos o estímulo para o recrutamento dos vasos sanguíneos, e das células especializadas para a degradação da matriz extracelular, ou se, pelo contrário, é a invasão dos vasos sanguíneos, o sinal para a morte dos condrócitos, e para os passos subsequentes, transmitindo os sinais reguladores celulares e/ou humorais adequados (Gibson et al, 1995, 1997; Gerber et al, 1999). Por exemplo, a vascularização incompleta em ratos deficientes em MMP-9, é atribuída a uma redução na apoptose dos condrócitos hipertróficos (Vu et al, 1998) e, durante a involução da glândula mamária, a degradação da matriz extracelular pelas MMPs é necessária para que se verifique a apoptose (Lund et al, 1996; Furth, 1999). Deste modo, será interessante tentar saber o que se passa a este respeito na discondroplasia, o que poderá ajudar a esclarecer acerca da diminuição da actividade de reabsorção, traduzida na acumulação de matriz extracelular.

Não têm sido desenvolvidos muitos trabalhos acerca da transição dos condrócitos hipertróficos para o fenótipo apoptótico (Orth et al, 2000). Segundo Ohyama et al (1997), o desenvolvimento de lesões discondroplásicas, pode envolver falhas no processo de apoptose dos condrócitos hipertróficos. Estes autores observaram, através de métodos imunohistoquímicos (TUNEL), condrócitos apoptóticos na zona de hipertrofia nas placas de crescimento de indivíduos normais, e a ausência total de apoptose nos condrócitos de lesões discondroplásicas. Esta falha na apoptose pode estar relacionada com uma expressão reduzida de alguns factores de crescimento observada na placa de crescimento discondroplásica (Loveridge et al, 1993) e, em parte, ser responsável pela retenção dos condrócitos e da matriz observada na discondroplasia (Farquharson e Jefferies, 2000). Outros autores (Praul et al, 1997; Rath et al, 1994, 1998), no entanto, observaram que pequenas lesões discondroplásicas continham poucos, ou quase nenhuns, condrócitos apoptóticos, enquanto lesões graves apresentavam numerosas células apoptóticas. A demonstração de células apoptóticas nas lesões discondroplásicas é consistente com a observação prévia dum decréscimo nos níveis de DNA destas lesões (Hargest et al, 1985; Freedman et al, 1985). Rath et al (1998) sugerem que a apoptose maciça dos condrócitos é responsável pela criação das lesões discondroplásicas, contrariamente a Praul et al (1997, 2000), para quem a apoptose não é a causa principal da discondroplasia, mas uma situação secundária relativamente à formação da massa cartilágnea característica desta patologia, e que pode explicar a reduzida actividade metabólica, a redução dos níveis de proteínas de DNA e de RNA, e a expressão reduzida de muitos factores envolvidos no processo de ossificação endocondral, que se verificam na discondroplasia. Deve, ainda, ser referido que nos trabalhos de Praul et al (1997) e de Rath et al (1998), não foi observada apoptose nos condrócitos hipertróficos de placas de crescimento normais, o que contraria os resultados de outros autores (Hatori et al, 1995; Roach et al, 1995; Ohyama et al, 1997; Roach,



1997). Do que foi dito anteriormente parece evidente que a morte dos condrócitos é essencial para a substituição da cartilagem por osso no processo de ossificação endocondral. Mas parece igualmente evidente que a apoptose maciça produz os efeitos opostos, podendo colocar-se a questão se efectivamente a osteogénese se segue à morte dos condrócitos. No caso da discondroplasia, e uma vez que esta é uma anomalia do desenvolvimento, é perfeitamente possível que a apoptose observada seja a resposta ao defeito inicial e não a raiz do problema.

Pretende-se com o presente capítulo, avaliar eventuais alterações nos mecanismos homeostáticos no processo de ossificação endocondral na discondroplasia induzida pelo tirame.

## 5.2 Materiais e Métodos

### 5.2.1 Proliferação e diferenciação celular

Para a avaliação da proliferação celular foi usado um marcador específico de proliferação, o *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) e vários marcadores relacionados com o ciclo celular e com a diferenciação dos condrócitos: o *c-myc*, as proteínas da família S-100, a tubulina-beta, a caderina e a ubiquitina (Tabela 5.1). A imunomarcagem foi realizada através do método LAB-SA (*PCNA-Staining Kit*, Zymed, USA, ref<sup>o</sup> 93-1143; ver capítulo 3). As marcações para os outros anticorpos foram realizadas, igualmente, através do método LAB-SA (ver Capítulo 3).

**Tabela 5.1** Anticorpos primários usados na avaliação da proliferação celular

Anticorpo	Diluição	Pré-Tratamento	Incubação		Localização celular
			Tempo	Temperatura	
Caderina (pan)	1/50	Citrato <sup>1</sup>	Overnight	4°C	Membrana celular
<i>c-myc</i>	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Nuclear
PCNA	1/200	Citrato	Overnight	4°C	Nuclear
S-100	1/100	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
Tubulina β	1/100	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
Ubiquitina	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Núcleo, citoplasma e membrana celular

<sup>1</sup> HIER utilizando tampão Citrato pH 6.0

Para cada um dos marcadores, foram utilizadas secções de controlo negativo nas quais o anticorpo primário foi substituído por PBS.

### 5.2.2. Apoptose

A avaliação da apoptose foi realizada através da imunomarcção das proteínas associadas a este tipo de morte celular, a Bcl-2 e caspase-3 (Tabela 5.2), através do método LAB-SA (ver Capítulo 3).

**Tabela 5.2** Anticorpos primários utilizados na avaliação da apoptose

Anticorpo	Diluição	Pré-Tratamento	Incubação		Localização celular
			Minutos	Temperatura	
Bcl-2	1/200	Citrato <sup>1</sup>	Overnight	4°C	Membrana celular
Caspase-3	1/100	Citrato	Overnight	4°C	Citoplasma

<sup>1</sup> HIER utilizando tampão Citrato, pH 6.0

Para cada um dos marcadores, foram utilizadas secções de controlo negativo nas quais o anticorpo primário foi substituído por PBS.

### 5.2.3 Vascularização

Para avaliar a vascularização da placa de crescimento, efectuou-se a imunomarcção, através do método LAB-SA (ver capítulo 3) dos seguintes marcadores (Tabela 5.3): a actina (músculo liso), a laminina-1, o Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e o factor VIII related antigen/von Willebrand Factor (vWF).

Relativamente ao VEGF, o clone utilizado reconhece as isoformas VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> e VEGF<sub>189</sub>. Por seu lado, o anticorpo utilizado na imunomarcção do vWF reage especificamente com as células endoteliais dos vasos e com as plaquetas.

**Tabela 5.3** Anticorpos primários usados na avaliação da vascularização

Anticorpo	Diluição	Pré-Tratamento	Incubação		Localização celular
			Tempo	Temperatura	
Actina	1/200	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
Laminina-1	1/50	Protease <sup>1</sup>	Overnight	4°C	Membrana basal
VEGF	1/50	EDTA <sup>2</sup>	Overnight	4°C	Citoplasma, superfície celular e matriz extracelular
vWF	1/50	Pepsina <sup>3</sup>	Overnight	4°C	Citoplasma

<sup>1</sup> Protease: 1mg/ml PBS, 5 min a 37°C; <sup>2</sup> HIER utilizando tampão EDTA pH 8.0; <sup>3</sup> Pepsina: 1mg/ml Tris-HCl, pH 2.0 10-15 min à temperatura ambiente

Para cada um dos marcadores, foram utilizadas secções de controlo negativo nas quais o anticorpo primário foi substituído por PBS.

## 5.2.4 Reabsorção da matriz

A avaliação da reabsorção da matriz foi realizada através da imunomarcagem das metaloproteinases da matriz (MMPs) e dos inibidores naturais, os TIMPs. As imunomarcações foram realizadas através do método LAB-SA (ver Capítulo 3 e Tabela 5.4).

Relativamente às MMPs convém referir que, e de acordo com as especificações do fabricante: o anticorpo para a MMP-1 reage com a forma activa da enzima, o anticorpo para a MMP-2 reage apenas com a proMMP-2 e não mostra reacção cruzada com a proMMP-9 e com a MMP-9, o anticorpo para a MMP-3 reage com as formas latente e activa da enzima, o anticorpo para a MMP-7 reage com a forma activa da enzima, o anticorpo para a MMP-9 reage com a forma activa da enzima, o anticorpo para a MMP-10 reage com as formas latente e activa da enzima, o anticorpo para a MMP-11 reage com a forma activa da enzima, o anticorpo para a MMP-13 reage com as formas latente e activa, o anticorpo para a MMP-14 reage com a forma activa da enzima, o anticorpo para a MMP-15 reage com a forma activa da enzima e o anticorpo para a MMP-16 reage com a forma activa da enzima.

Para cada um dos marcadores, foram utilizadas secções de controlo negativo nas quais o anticorpo primário foi substituído por PBS.

**Tabela 5.4** Anticorpos primários usados na avaliação da reabsorção da matriz

Anticorpo	Diluição	Pré-Tratamento	Incubação		Localização celular
			Tempo	Temperatura	
MMP-1	1/50	Citrato <sup>1</sup>	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-2	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-3	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-7	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-9	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-10	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-11	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-13	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Citoplasma
MMP-14	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma e membrana celular
MMP-15	1/50	Não	Overnight	4°C	Citoplasma e membrana celular
MMP-16	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Citoplasma e membrana celular
TIMP-1	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Citoplasma
TIMP-2	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Citoplasma
TIMP-3	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Citoplasma
TIMP-4	1/50	Citrato	Overnight	4°C	Citoplasma

<sup>1</sup> HIER utilizando tampão Citrato pH 6.0

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Proliferação e diferenciação

Quanto ao PCNA foram observados condrócitos com imunomarcagem nuclear positiva na zona de proliferação, quer nas placas de crescimento normais (21,2%), quer nas placas de crescimento discondroplásicas (20,7%), não sendo as diferenças encontradas significativas (Tabela 5.5; Figura 5.1). Não foi observada imunomarcagem nas secções de controlo negativo.

Quanto ao *c-myc*, foram observados condrócitos positivos em todas as zonas da placa de crescimento. No entanto, a marcação foi mais evidente nos condrócitos proliferativos (Tabela 5.5; Figura 5.2), sendo o padrão de expressão similar em ambos os tipos de placas de crescimento. Relativamente aos condrócitos hipertróficos, a percentagem de células nas placas de crescimento normais foi significativamente mais elevada (34,4%), mais do dobro, do que nas placas de crescimento discondroplásicas (15,3%). Embora a expressão do *c-myc* esteja presente no núcleo e no citoplasma, é evidente uma predominância nuclear, nas células da zona de proliferação, mas também no citoplasma dos condrócitos da parte superior da zona de hipertrofia (Figura 5.2). Muitos dos condrócitos hipertróficos terminais, os quais estão junto aos canais vasculares, mostram marcação positiva no núcleo com ou sem marcação citoplasmática (Figura 5.2). Outro facto saliente foi a evidente imunomarcagem positiva de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como inúmeras células da medula (Figura 5.2), com um padrão de expressão similar em ambos os tipos de placa de crescimento. Não foi observada imunomarcagem nas secções de controlo negativo.

Tabela 5.5 Imunomarcagem para o PCNA e para a *c-myc* nos vários tipos celulares na tíbia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	PCNA <sup>2</sup>		<i>c-myc</i>	
	Normal	Discondroplasia	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	-	-	±	±
Condrócitos proliferativos	++ (21,2 ± 0,9)	++ (20,7 ± 1,7)	+++	+++
Condrócitos hipertróficos	-	-	++ (34,4 ± 1,0 <sup>a</sup> )	+ (15,3 ± 4,0 <sup>b</sup> )
Osteoblastos	ne <sup>3</sup>	ne	+++	++
Osteoclastos	ne	ne	+++	+++
Osteócitos	ne	ne	++	++
Medula óssea	ne	ne	+++	+++

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcagem ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcagem fraca (6-25%); ++ = imunomarcagem moderada (26-50%); +++ = imunomarcagem intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas (para cada marcador, valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05); <sup>2</sup> cálculos efectuados de acordo com os mesmos critérios, mas com a ampliação de 200x; <sup>3</sup> ne = não estimado

Relativamente à tubulina-beta, não foi observada imunomarcção nas zonas de repouso, quer nas placas de crescimento normais, quer nas discondroplásicas. Nas zonas de proliferação de ambos os tipos de placas de crescimento foram observados alguns condrócitos positivos, com um padrão de expressão similar entre elas. Pelo contrário, a imunomarcção observada nos condrócitos hipertróficos é mais evidente, expressa-se a nível citoplasmático (Tabela 5.6; Figura 5.3), registando-se diferenças significativas entre as placas de crescimento normais (27,2%) e as placas de crescimento discondroplásicas (14,9%), na percentagem de células positivas, quase o dobro. Foi também observada alguma expressão nos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como em inúmeras células da medula, com um padrão de expressão similar em ambos os tipos de placa de crescimento. Não foi observada imunomarcção nas secções de controlo negativo.

Quanto à ubiquitina, foram observados condrócitos positivos em todas as zonas da placa de crescimento. No entanto, a marcação foi mais evidente nos condrócitos da zona de hipertrofia, tendo-se verificando diferenças significativas entre as placas de crescimento normais (95,4%) e as placas de crescimento discondroplásicas (89,2%) na percentagem de células positivas (Tabela 5.6; Figura 5.4). Embora a expressão da ubiquitina esteja presente no núcleo, no citoplasma e na membrana celular, é evidente uma predominância nuclear, nas células da zona de proliferação, mas no citoplasma dos condrócitos da parte superior da zona de hipertrofia (Figura 5.4). Muitos dos condrócitos hipertróficos terminais, os quais estão junto aos canais vasculares, mostram marcação positiva no núcleo e no citoplasma (Figura 5.4). De registar ainda, a imunomarcção positiva de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como de inúmeras células da medula, com um padrão de expressão similar nos dois tipos de placa de crescimento. Não foi observada imunomarcção nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.6** Imunomarcção para a tubulina-beta e para a ubiquitina, nos vários tipos celulares na tíbia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	Tubulina-beta		Ubiquitina	
	Normal	Discondroplasia	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	-	-	+	+
Condrócitos proliferativos	±	±	++	++
Condrócitos hipertróficos	++ (27,2 ± 2,1 <sup>a</sup> )	+ (14,9 ± 0,5 <sup>b</sup> )	+++ (95,4 ± 0,6 <sup>a</sup> )	+++ (89,2 ± 2,8 <sup>b</sup> )
Osteoblastos	+++	+++	++	++
Osteoclastos	+++	+++	++	++
Osteócitos	++	++	+	+
Medula óssea	+++	+++	+++	+++

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcção ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcção fraca (6-25%); ++ = imunomarcção moderada (26-50%); +++ = imunomarcção intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas (para cada marcador, valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05).

Quanto à caderina, foram observados condrócitos positivos em todas as zonas da placa de crescimento, em ambos os tipos de placas de crescimento. No entanto, a marcação foi mais evidente nos condrócitos da zona de hipertrofia, com uma sobre-expressão nas placas de crescimento discondroplásicas (91.2%), sendo a percentagem de células positivas, significativamente mais elevada nestas, do que nas placas de crescimento normais (34,8%) (Tabela 5.7; Figura 5.5). Embora a caderina seja uma proteína que se expressa ao nível da membrana celular, na zona de proliferação a imunomarcação é também nuclear e citoplasmática, enquanto nos condrócitos hipertróficos, a expressão da caderina é essencialmente citoplasmática (Figura 5.5). A dificuldade em observar a expressão membranar da caderina, tem a ver com a ocorrência de artefactos derivados das técnicas de fixação. Os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, bem como inúmeras células da medula, expressam igualmente a caderina, com um padrão de expressão similar nos dois tipos de placa de crescimento. Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

Quanto às proteínas S-100, foram observados condrócitos positivos fundamentalmente na zona de hipertrofia, quer nas placas de crescimento normais quer nas placas de crescimento discondroplásicas (Tabela 5.7; Figura 5.6). Nestas últimas, foi evidente a expressão citoplasmática das S-100 no interior das lesões (Figura 5.6), embora algumas células proliferativas tenham exibido uma expressão nuclear. Por outro lado, alguns condrócitos na fase final de hipertrofia, junto aos canais vasculares mostraram uma imunomarcação citoplasmática intensa (Figura 5.6). Outro facto saliente foi a evidente imunomarcação positiva de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como de inúmeras células da medula (Figura 5.6). A matriz óssea e as zonas junto aos locais de mineralização apresentam igualmente uma imunomarcação intensa (Figura 5.6). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.7** Imunomarcação para a caderina e para as proteínas, nos vários tipos celulares na tibia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	Caderina		S-100	
	Normal	Discondroplasia	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	±	±	-	±
Condrócitos proliferativos	+	++	-	±
Condrócitos hipertróficos	++ (34.8 ± 2.6 <sup>a</sup> )	+++ (91.2 ± 0.2 <sup>b</sup> )	±	+
Osteoblastos	++	++	+	+
Osteoclastos	++	++	+++	+++
Osteócitos	++	++	++	+++
Medula óssea	++	++	+	+

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas (para cada marcador, valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05).

### 5.3.2 Apoptose

Quanto à Bcl-2 não se observam condrócitos positivos nas zonas de reserva e de proliferação, quer nas placas de crescimento normais quer nas placas de crescimento discondroplásicas (Tabela 5.8; Figura 5.7a). Nas placas de crescimento normais é possível observar alguns condrócitos hipertróficos positivos, junto aos canais vasculares, o que não acontece nas placas de crescimento discondroplásicas. Nas placas de crescimento normais os osteoblastos aparecem intensamente marcados e as estruturas vasculares são igualmente evidentes. Alguns osteoclastos são igualmente positivos. Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásicas a intensidade de imunomarcação é menor, bem como o número de células osteoblásticas e outras células presentes na medula óssea positivas. Muitas das trabéculas ósseas já formadas, apresentam inúmeras células negativas, enquanto as estruturas vasculares apresentam uma imunomarcação não tão evidente. De salientar ainda o facto de algumas células hematopoiéticas positivas para a Bcl-2, estarem em pleno decurso da mitose, em particular na metafase e na anafase (Figura 5.7b). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

Quanto à caspase-3, o maior número de condrócitos positivos observado foi na zona de hipertrofia, em particular junto aos canais vasculares, tanto nas placas de crescimento normais como nas placas de crescimento discondroplásicas (Tabela 5.8; Figura 5.8). Os osteoblastos aparecem com forte imunomarcação em ambos os tipos de placas de crescimento. De referir que nos locais de mineralização, é possível observar condrócitos positivos, bem como, muito provavelmente, células precursoras de condroclastos/osteoclastos, nos canais de vascularização (Figura 5.8). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.8** Imunomarcação para a Bcl-2 e para a caspase-3 nos vários tipos celulares na tíbia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	Bcl-2		Caspase-3	
	Normal	Discondroplasia	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	-	-	-	-
Condrócitos proliferativos	-	-	±	±
Condrócitos hipertróficos	±	-	+	++
Osteoblastos	+++	++	++	++
Osteoclastos	++	±	±	+
Osteócitos	-	-	±	±
Medula óssea	++	±	±	+

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%).

### 5.3.3 Vascularização

Quanto ao VEGF, não foram observados condrócitos positivos na zona de reserva nas placas de crescimento normais e nas placas de crescimento discondroplásicas (Tabela 5.9; Figura 5.9). Relativamente à zona de proliferação é possível observar algumas células positivas em ambos os tipos de placa de crescimento (Figura 5.9). No que diz respeito aos condrócitos hipertróficos, é possível observar células positivas nas placas de crescimento normais (88,0%) e nas placas de crescimento discondroplásicas (72,6%), embora a percentagem seja significativamente menor nestas últimas (Tabela 5.9; Figura 5.9). A expressão do VEGF é essencialmente citoplasmática, podendo, nalguns casos, ser observada imunomarcação ao nível da membrana celular (Figura 5.9). Deve ser referido que se verificou uma grande heterogeneidade no padrão de imunomarcação nas placas de crescimento discondroplásicas dos vários indivíduos analisados, enquanto o padrão de expressão do VEGF nas placas de crescimento normais pode considerar-se homogéneo entre as diferentes secções analisadas. Outro facto saliente foi a evidente imunomarcação positiva de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como inúmeras células da medula, com um padrão de expressão similar em ambos os tipos de placa de crescimento. Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.9** Imunomarcação para o VEGF nos vários tipos celulares na tíbia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	VEGF	
	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	-	-
Condrócitos proliferativos	±	±
Condrócitos hipertróficos	+++ (88,0 ± 2,8 <sup>a</sup> )	+++ (72,6 ± 2,3 <sup>b</sup> )
Osteoblastos	++	++
Osteoclastos	++	++
Osteócitos	+	+
Medula óssea	++	++

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%); os valores entre parêntesis representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas. Valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05.

Quanto ao von Willebrand Factor (vWF), não foi observada imunomarcação nas placas de crescimento normais. Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásicas, a imunomarcação positiva para o vWF foi evidente, particularmente na matriz das áreas associadas à reparação vascular (Figura 5.10). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.



Quanto à laminina-1, não foi observada imunomarcacão nos condrócitos, em qualquer zona da placa de crescimento, quer nas placas de crescimento normais, quer nas placas de crescimento discondroplásicas. Nas placas de crescimento normais é possível observar imunomarcacão intensa ao longo dos canais vasculares, situação que não se observa nas placas de crescimento discondroplásicas, nas quais a imunomarcacão é rara e, quando aparece, é muito fraca (Figura 5.11). Não foi observada imunomarcacão nas secções de controlo negativo.

Quanto à actina, não foi observada imunomarcacão nos condrócitos, em qualquer zona da placa de crescimento, quer nos animais normais, quer nos animais com discondroplasia. Nas placas de crescimento normais é possível observar imunomarcacão intensa ao longo dos canais vasculares, situação que não se observa nas placas de crescimento discondroplásicas nas quais, a imunomarcacão é rara e, quando aparece, é muito fraca (Figura 5.12). Não foi observada imunomarcacão nas secções de controlo negativo.

#### **5.3.4 Reabsorção da cartilagem**

##### **Colagenases**

Quanto à colagenase 1 (MMP-1), foram observados condrócitos positivos em todas as zonas da placa de crescimento, com uma maior expressão, no entanto, na zona de hipertrofia, tanto nas placas de crescimento normais (91,4%), como nas placas da crescimento discondroplásicas (93,8%), não sendo, as diferenças encontradas, na percentagem de células positivas, significativas (Tabela 5.10; Figura 5.13). O padrão de expressão, fundamentalmente citoplasmático, é similar em ambos os tipos de placas de crescimento. Para além disso é possível observar uma acentuada imunomarcacão de condrócitos hipertróficos, de forma claramente arredondada, nas placas da crescimento discondroplásicas, junto às zonas de acumulação de matriz (Figura 5.13). O padrão de expressão observado nos osteoblastos, nos osteoclastos, nos osteócitos e noutras células da medula, é semelhante em ambos os tipos de placa de crescimento. Não foi observada imunomarcacão nas secções de controlo negativo.

Quanto à colagenase 3 (MMP-13), apenas foram observados condrócitos positivos na zona de hipertrofia, com imunomarcacão citoplasmática (Tabela 5.10; Figura 5.14). Nas placas de crescimento normais, a imunomarcacão dos condrócitos não é muito evidente. Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásicas a imunomarcacão é, por vezes, bastante intensa, em particular nas zonas em que se verifica acumulação de matriz (Figura 5.14). O padrão de imunomarcacão, positiva, igualmente citoplasmática, dos osteoblastos, dos osteoclastos, dos osteócitos e das células da medula óssea é similar em ambos os tipos de placas de crescimento (Tabela 5.10). Não foi observada imunomarcacão nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.10** Imunomarcação para as collagenases nos vários tipos celulares na tibia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	Colagenase 1 (MMP-1)		Colagenase 3 (MMP-13)	
	Normal	Discondroplasia	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	-	±	-	-
Condrócitos proliferativos	±	++	-	-
Condrócitos hipertróficos	+++ (91,4 ± 1,4)	+++ (93,8 ± 2,4)	±	+
Osteoblastos	++	++	++	++
Osteoclastos	++	++	+++	+++
Osteócitos	++	++	±	±
Medula óssea	++	++	+	+

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%). Valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05.

### Gelatinases

Quanto à gelatinase A (MMP-2), não se observaram diferenças no padrão de expressão da MMP-2 entre as placas de crescimento normais e as placas de crescimento discondroplásicas. Com efeito, apenas aparecem alguns condrocitos hipertróficos positivos, para além de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Tabela 5.11; Figura 5.15). Por outro lado, é ainda possível observar nas placas de crescimento discondroplásicas, junto às lesões, nos locais de acumulação de matriz extracelular, inúmeros condrocitos hipertróficos positivos, de forma arredondada (Figura 5.15). Em todos os tipos celulares a expressão da MMP-2 é citoplasmática. Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.11** Imunomarcação para as gelatinases nos vários tipos celulares na tibia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	Gelatinase A (MMP-2)		Gelatinase B (MMP-9)	
	Normal	Discondroplasia	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	-	-	-	-
Condrócitos proliferativos	-	-	±	±
Condrócitos hipertróficos	±	±	+++ (90,7 ± 1,5 <sup>a</sup> )	+++ (87,3 ± 1,7 <sup>b</sup> )
Osteoblastos	+	+	++	++
Osteoclastos	++	++	+++	+++
Osteócitos	++	++	++	++
Medula óssea	++	++	++	++

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas. Valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05.

Quanto à gelatinase B (MMP-9), foram observados alguns condrócitos positivos na zona de proliferação em ambos os tipos de placa de crescimento. No entanto, a marcação foi mais evidente nos condrócitos hipertróficos, sendo a percentagem de células positivas (90,7%) nas placas de crescimento normais, significativamente mais elevada do que a percentagem de células positivas (87,3%) nas placas de crescimento discondroplásicas (Tabela 5.11; Figura 5.16). A expressão da MMP-9 é citoplasmática, e é evidente nas placas de crescimento discondroplásicas, a expressão da MMP-9 nos condrócitos que se encontram junto às lesões (Figura 5.16). De referir ainda, que o padrão de expressão da MMP-9, entre os dois tipos de placas de crescimento, é similar no que diz respeito a outros tipos celulares, designadamente, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, com ligeira a moderada imunomarcação citoplasmática (Tabela 5.11; Figura 5.16). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

### Estromalisinas

Quanto à estromalisina-1 (MMP-3), foram observados condrócitos positivos apenas nas placas de crescimento discondroplásicas, junto às zonas de acumulação de matriz extracelular (Tabela 5.12; Figura 5.17). Nestes condrócitos hipertróficos, de forma arredondada, a expressão da MMP-3, embora não possa considerar-se muito acentuada, é citoplasmática (Figura 5.17). Nalgumas secções correspondentes a placas de crescimento discondroplásicas, é ainda possível observar uma ligeira imunomarcação junto aos locais de deposição de matriz óssea (Figura 5.17). O padrão de expressão da MMP-3, entre os dois tipos de placas de crescimento, é similar no que diz respeito a outros tipos celulares, designadamente, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, com ligeira a moderada imunomarcação citoplasmática (Tabela 5.12; Figura 5.17). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

Quanto à estromalisina-2 (MMP-10), não se observaram diferenças no padrão de expressão da MMP-10 entre as placas de crescimento normais e as placas de crescimento discondroplásicas. No entanto, a percentagem de condrócitos hipertróficos positivos, essencialmente na fase final do estágio de hipertrofia, é significativamente mais elevada nas placas de crescimento discondroplásicas (28,7%) do que nas placas de crescimento normais (26,2%). A expressão da MMP-10 nestas células é citoplasmática, o mesmo acontecendo nos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Tabela 5.12; Figura 5.18). Por outro lado, é ainda possível observar nas placas de crescimento discondroplásicas, junto às lesões, nos locais de acumulação de matriz extracelular, inúmeros condrócitos hipertróficos de forma arredondada, positivos para a MMP-10 (Figura 5.18). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

Quanto à estromalisina-3 (MMP-11), relativamente às placas de crescimento normais, apenas foram observados condrócitos positivos, no citoplasma, na fase inicial da hipertrofia (Tabela 5.12; Figura 5.19). Quanto às placas de crescimento discondroplásicas é de salientar a evidente sobre-expressão da MMP-11 nos condrócitos hipertróficos, quer na fase inicial, quer na fase final da hipertrofia, com expressão citoplasmática (Tabela 5.12; Figura 5.19), sendo a percentagem de células positivas significativamente mais elevada nas placas de crescimento discondroplásicas (63,5%), do que nas placas de crescimento normais (26,5%). Por outro lado, e tal como foi verificado para outras MMPs, observaram-se inúmeros condrócitos hipertróficos, de forma arredondada no interior e nos limites das lesões (Tabela 5.12; Figura 5.19). Em ambos os tipos de placas de crescimento é ainda possível observar osteoblastos, osteoclastos e osteócitos positivos para a MMP-11, com expressão igualmente citoplasmática, semelhante em ambos os tipos de placas de crescimento (Tabela 5.12). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.12** Imunomarcação para as estromalisinas nos vários tipos celulares da tibia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	Estromalisina-1 (MMP-3)		Estromalisina-2 (MMP-10)		Estromalisina-3 (MMP-11)	
	Normal	Discond	Normal	Discond.	Normal	Discond.
Condrócitos de reserva	-	-	-	-	-	-
Condrócitos proliferativos	-	-	-	-	-	±
Condrócitos hipertróficos	-	±	++	++	++	+++
			(26,2 ± 0,6 <sup>a</sup> )	(28,7 ± 0,3 <sup>b</sup> )	(26,5 ± 3,8 <sup>a</sup> )	(63,5 ± 14,7 <sup>b</sup> )
Osteoblastos	±	±	+++	+++	++	++
Osteoclastos	++	++	+++	+++	++	++
Osteócitos	++	++	++	++	++	++
Medula óssea	++	++	++	++	++	++

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas (para cada marcador, valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05).

### **Metaloproteinases Tipo Membranares**

Quanto à MT-MMP-1 (MMP-14), nas placas de crescimento normais apenas se observaram condrócitos positivos na fase inicial da hipertrofia (Tabela 5.13; Figura 5.20). Relativamente às placas de crescimento discondroplásicas, o padrão de expressão é similar, embora apareçam condrócitos positivos para a MMP-14 na fase terminal da hipertrofia, e no interior e nos limites das lesões, situações em que é evidente a sobre-expressão desta enzima (Figura 5.20). A percentagem de células positivas nas placas de crescimento discondroplásicas (38,2%), foi mais elevada do que nas placas de crescimento normais (34,9%), embora estas diferenças, não sejam significativas. A expressão é citoplasmática e ao nível da membrana celular, embora esta última nem sempre fácil de detectar em consequência de artefactos derivados da fixação. Em ambos os tipos de placas de crescimento é ainda possível observar osteoblastos, osteoclastos e osteócitos positivos para a MMP-14, com expressão igualmente citoplasmática,

bem como outros tipos celulares da medula óssea. Não foi observada imunomarcacão nas secoes de controlo negativo.

Quanto à MT-MMP-2 (MMP-15) o padrão de expressão é similar nos dois tipos de placas de crescimento. Nas placas de crescimento normais é possível observar alguns condrócitos positivos na fase inicial da hipertrofia (Tabela 5.13; Figura 5.21). O facto mais saliente tem a ver com a imunomarcacão intensa junto aos locais de mineralizaco e de deposico de matriz óssea (Figura 5.21). Nas placas de crescimento discondroplásicas, é ainda possível observar condrócitos positivos para a MMP-15, no interior e nos limites das lesoes (Figura 5.21). A expressão é citoplasmática e ao nível da membrana celular, embora esta última nem sempre fácil de detectar em consequência de artefactos derivados da fixaco. Nalgumas células é ainda possível observar imunomarcacão nuclear. A imunomarcacão positiva nos locais de formao de osteóide, permite evidenciar a existência de eventuais deformaoes da tíbia, causadas pela deficiente deposico de osso (Figura 5.21). Em ambos os tipos de placas de crescimento é ainda possível observar osteoblastos, osteoclastos e osteócitos positivos para a MMP-15, com expressão igualmente citoplasmática, bem como outros tipos celulares da medula óssea (Tabela 5.14). Não foi observada imunomarcacão nas secoes de controlo negativo.

**Tabela 5.13** Imunomarcacão para as MMPs membranares nos vários tipos celulares da tíbia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	MT-MMP-1 (MMP-14)		MT-MMP-2 (MMP-15)		MT-MMP-3 (MMP-16)	
	Normal	Discond.	Normal	Discond.	Normal	Discond.
Condrócitos de reserva	-	-	-	-	-	-
Condrócitos proliferativos	-	-	-	-	±	+
Condrócitos hipertróficos	++	++	±	+	+++	+++
	(34,9 ± 7,5)	(38,2 ± 5,1)			(88,7 ± 2,6)	(89,2 ± 1,4)
Osteoblastos	++	++	+++	++	+++	+++
Osteoclastos	++	++	+++	++	+++	+++
Osteócitos	++	++	+++	++	++	+++
Medula óssea	+	+	±	+	++	++

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcacão ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcacão fraca (6-25%); ++ = imunomarcacão moderada (26-50%); +++ = imunomarcacão intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas (para cada marcador, valores com ndice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05).

Quanto à MT-MMP-3 (MMP-16), o padrão de expressão é similar em ambos os tipos de placas de crescimento, sendo possível observar condrócitos positivos apenas na zona de hipertrofia (Tabela 5.13; Figura 5.22). A percentagem de células positivas nas placas de crescimento discondroplásicas (89,2%), foi ligeiramente mais elevada do que nas placas de crescimento normais (88,7%), embora estas diferenças, não sejam significativas. Em ambos os tipos de placas de crescimento é ainda possível observar osteoblastos, osteoclastos e osteócitos positivos para a MMP-16, com expressão igualmente citoplasmática, bem como outros tipos celulares da medula óssea (Tabela 5.14). Não foi observada imunomarcacão nas secoes de controlo negativo.

### Matrilisinas

Quanto à matrilisina-1 (MMP-7), verificou-se uma expressão elevada da MMP-7 nas placas de crescimento discondroplásicas (46,9%), quando comparadas com as placas de crescimento normais (24,9%), sendo estas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5.14; Figura 5.23). Por outro lado, para além de um maior número de condrócitos positivos, na fase inicial da hipertrofia, é possível observar muitos condrócitos hipertróficos positivos junto às zonas das lesões, no interior e nos limites destas (Figura 5.23). Deve ainda ser referido que nas placas de crescimento discondroplásicas são evidentes alguns condrócitos positivos na zona de proliferação (Figura 5.23). Em todas as situações a expressão da MMP-7 é citoplasmática. Em ambos os tipos de placas de crescimento é também possível observar osteoblastos, osteoclastos e osteócitos positivos para a MMP-7, com expressão igualmente citoplasmática, bem como outros tipos celulares da medula óssea (Tabela 5.14). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.14** Imunomarcação para a matrilisina-1 (MMP-7) nos vários tipos celulares na tíbia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	Matrilisina-1 (MMP-7)	
	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	-	-
Condrócitos proliferativos	±	±
Condrócitos hipertróficos	+ (24,9 ± 0,8 <sup>a</sup> )	++ (46,9 ± 4,4 <sup>b</sup> )
Osteoblastos	++	++
Osteoclastos	++	++
Osteócitos	+	+
Medula óssea	++	++

<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas. Valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05.

### TIMPs

Quanto ao TIMP-1 não se observaram condrócitos positivos em qualquer das zonas, em qualquer dos tipos de placa de crescimento. Nas placas de crescimento normais é possível observar imunomarcação positiva fraca, nos osteoclastos, ao nível do citoplasma. É ainda possível observar nestas placas de crescimento, nos canais vasculares, mas em locais em que ainda não se verifica a reabsorção da cartilagem, células mononucleadas com marcação para o TIMP-1. Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásicas, os osteoclastos, ainda que positivos para o TIMP-1, apresentam uma imunomarcação menos evidente. Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

Quanto ao TIMP-2, nas placas de crescimento normais, apenas se conseguem observar alguns condrócitos hipertróficos positivos (21,5%), enquanto nas placas de crescimento discondroplásicas é possível observar uma percentagem elevada (47,0%) de condrócitos hipertróficos, quer na fase inicial, quer na fase final da hipertrofia (Tabela 5.15; Figura 5.24), sendo estas diferenças estatisticamente significativas. A expressão do TIMP-2 nas placas de crescimento discondroplásicas é algo heterogénea e nalgumas secções foram observadas vastas zonas em que praticamente todos os condrócitos eram positivos. Por outro lado, foi ainda possível verificar que as células junto às lesões eram igualmente positivas para este marcador (Figura 5.24). Em todas as situações a expressão do TIMP-2 é citoplasmática. Em ambos os tipos de placas de crescimento é também possível observar osteoblastos, osteoclastos, mas não osteócitos, positivos para o TIMP-2, com expressão igualmente citoplasmática, bem como outros tipos celulares da medula óssea (Tabela 5.15). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

Quanto ao TIMP-3, o padrão de expressão é similar ao verificado para o TIMP-2, embora pareça haver uma maior intensidade de imunomarcação em ambos os tipos de placas de crescimento, fundamentalmente ao nível dos condrócitos hipertróficos (Tabela 5.15; Figura 5.25). As diferenças encontradas na percentagem de células positivas, foram significativamente mais elevadas nas placas de crescimento discondroplásicas (94,3%), do que nas placas de crescimento normais (91,4%). Junto às lesões é possível observar inúmeros condrócitos positivos para o TIMP-3 (Figura 5.25). Em todas as situações a expressão do TIMP-3 é citoplasmática. Em ambos os tipos de placas de crescimento é ainda possível observar osteoblastos, osteoclastos, e osteócitos, positivos para o TIMP-3, com expressão igualmente citoplasmática, bem como outros tipos celulares da medula óssea (Tabela 5.15). Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

**Tabela 5.15** Imunomarcação para os TIMPs nos vários tipos celulares da tíbia proximal <sup>1</sup>

Tipos celulares	TIMP-2		TIMP-3		TIMP-4	
	Normal	Discond.	Normal	Discond.	Normal	Discond.
Condrócitos de reserva	-	-	-	-	-	-
Condrócitos proliferativos	-	-	±	++	±	±
Condrócitos hipertróficos	+	++	+++	+++	+++	+++
	(21,5 ± 1,8 <sup>a</sup> )	(47,0 ± 9,2 <sup>b</sup> )	(91,4 ± 0,8 <sup>a</sup> )	(94,3 ± 0,8 <sup>b</sup> )	(84,3 ± 1,8 <sup>a</sup> )	(87,8 ± 0,6 <sup>b</sup> )
Osteoblastos	++	++	++	++	++	+++
Osteoclastos	++	++	++	++	++	++
Osteócitos	-	-	++	++	++	++
Medula óssea	++	++	+	+	+	+

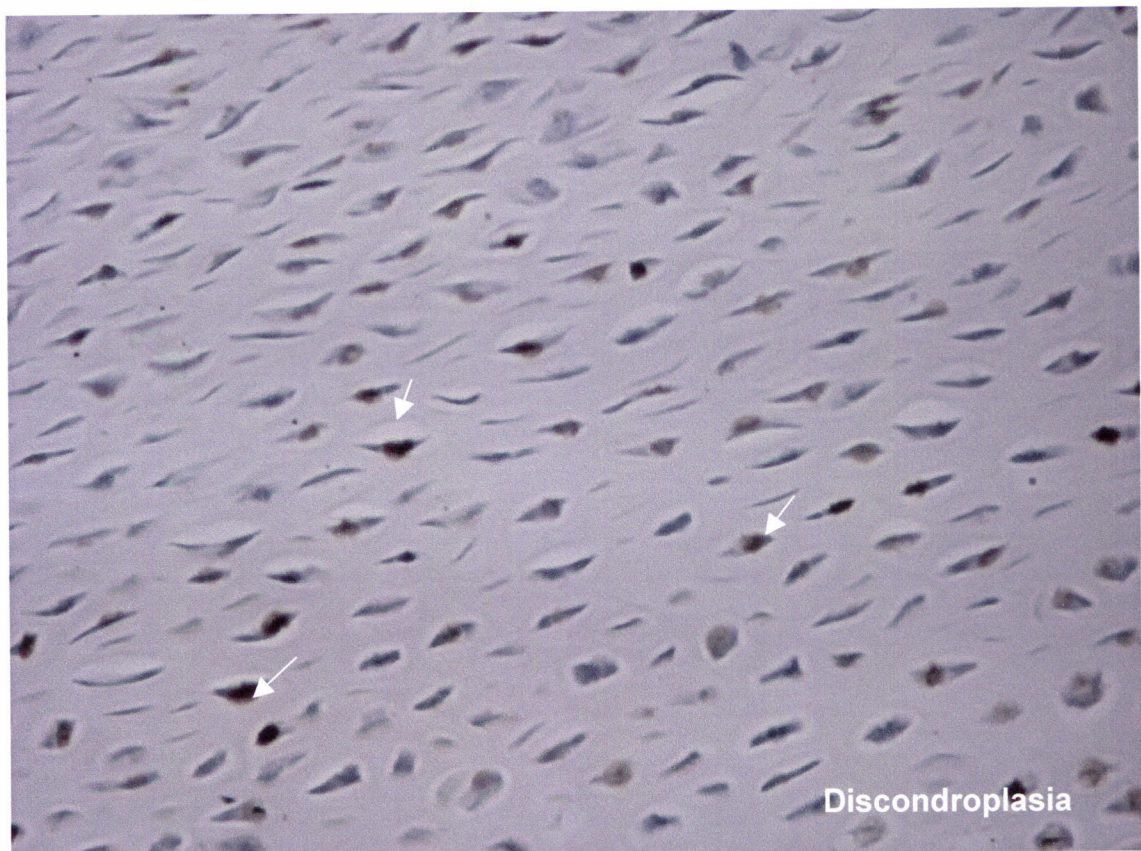
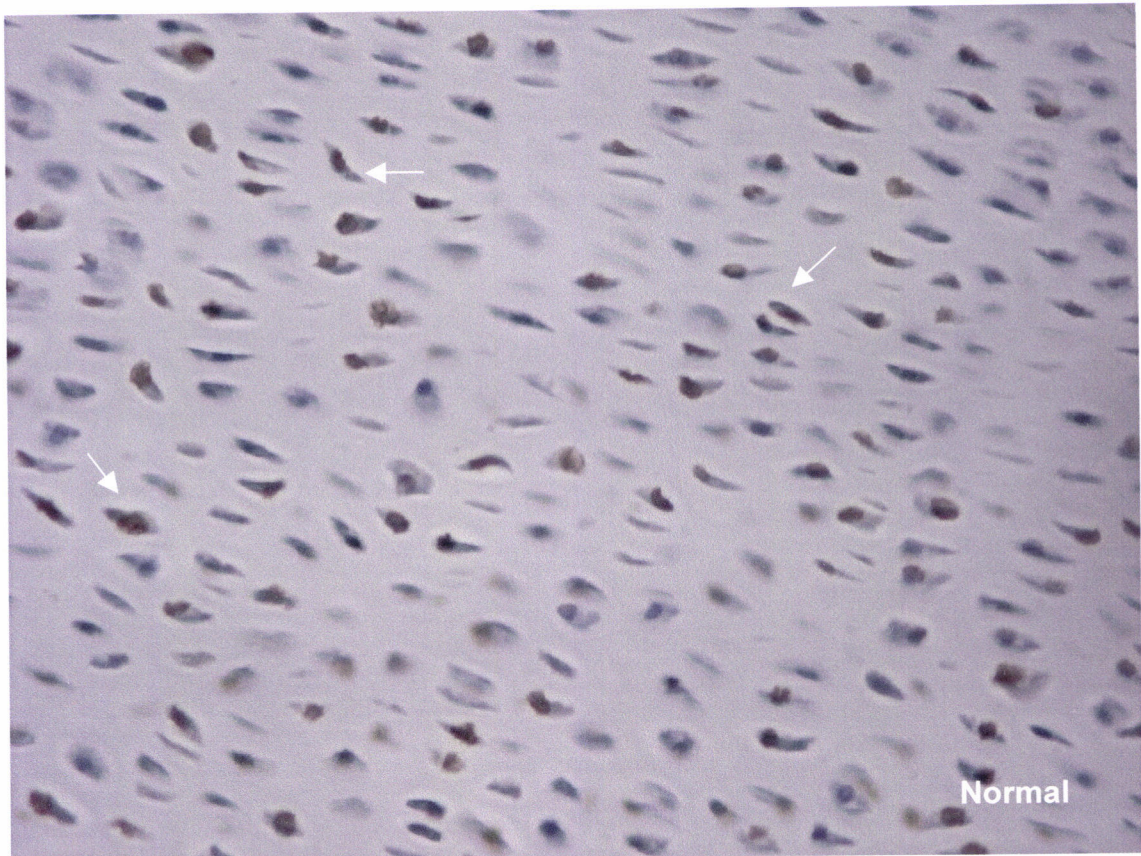
<sup>1</sup> - = negativo (0%); ± = imunomarcação ocasional, focal (1-5%); + = imunomarcação fraca (6-25%); ++ = imunomarcação moderada (26-50%); +++ = imunomarcação intensa (>50%); os valores entre parêntesis, representam a média (em %) ± desvio padrão, de células positivas (para cada marcador, valores com índice diferente diferem significativamente, entre grupos, para p<0,05).

Finalmente, quanto ao TIMP-4, o padrão de expressão é similar ao observado para o TIMP-3, sendo evidente a transição da zona de proliferação, em que não se verificou imunomarcação, para a zona de hipertrofia, onde é possível observar inúmeros condrócitos positivos para o TIMP-4 (Tabela 5.15; Figura 5.26). As diferenças encontradas na percentagem de células positivas, foram significativamente mais elevadas nas placas de crescimento discondroplásicas (87,8%) do que nas placas de crescimento normais (84,3%). Em ambos os tipos de placas de crescimento é ainda possível observar osteoblastos, osteoclastos, e osteócitos positivos para o TIMP-4, com expressão igualmente citoplasmática, bem como outros tipos celulares da medula óssea (Tabela 5.15). Junto às lesões é possível observar uma forte expressão do TIMP-4 nos condrócitos hipertróficos (Figura 5.26). Deve ainda referir-se que, e à semelhança do que se verificou para outros marcadores, a imunomarcação é tanto mais evidente nos condrócitos quanto maiores e mais arredondados forem as células. Em todas as situações a expressão do TIMP-4 é citoplasmática. Não foi observada imunomarcação nas secções de controlo negativo.

#### **MMPs e TIMPs**

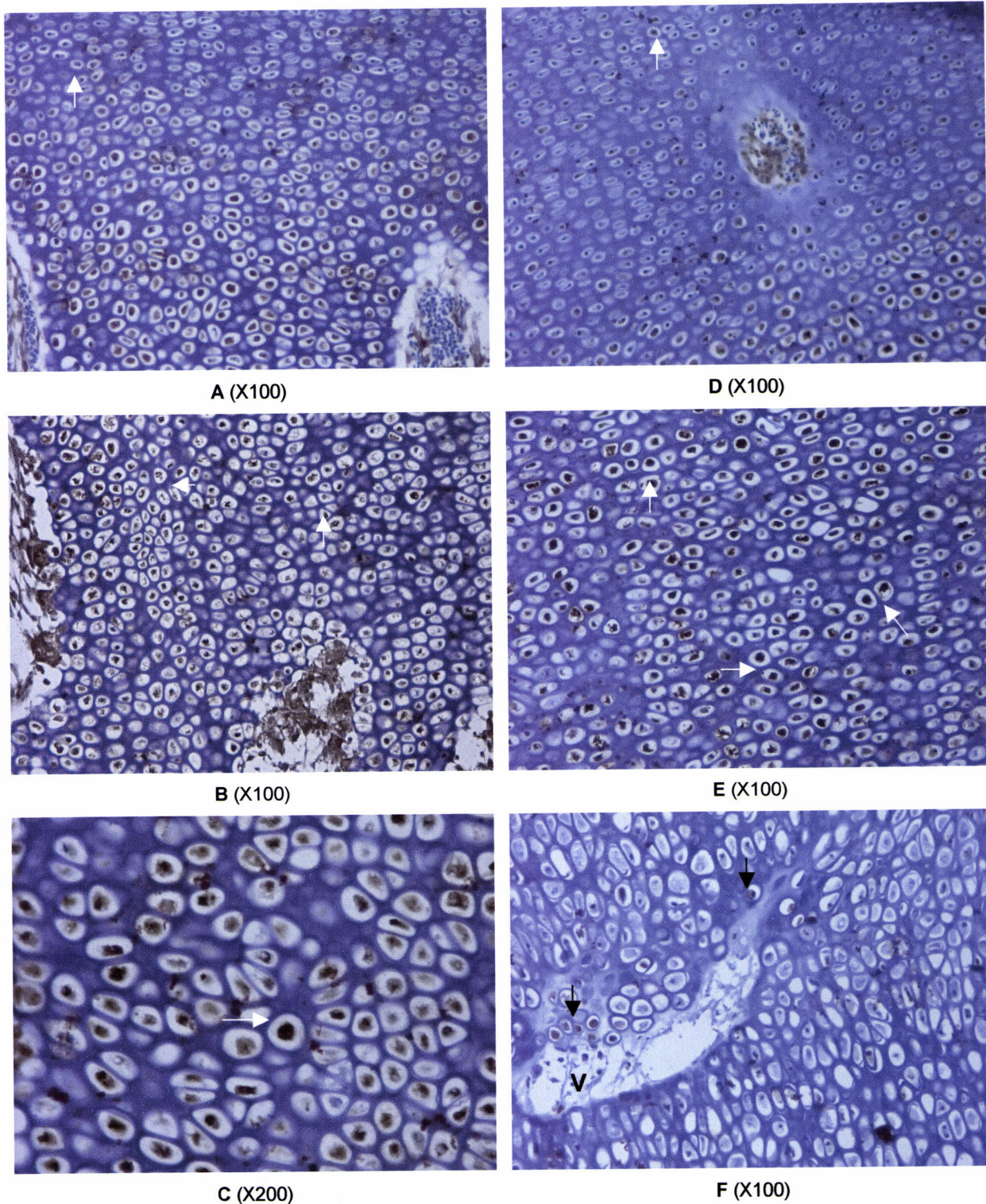
Observando secções seriadas da mesma placa de crescimento, no sentido de avaliar da síntese simultânea das várias proteínas consideradas, no decurso do processo de ossificação endocondral, é possível verificar que as mesmas células exibem expressão positiva para cada algumas das metaloproteinases e seus inibidores (Figura 5.27).





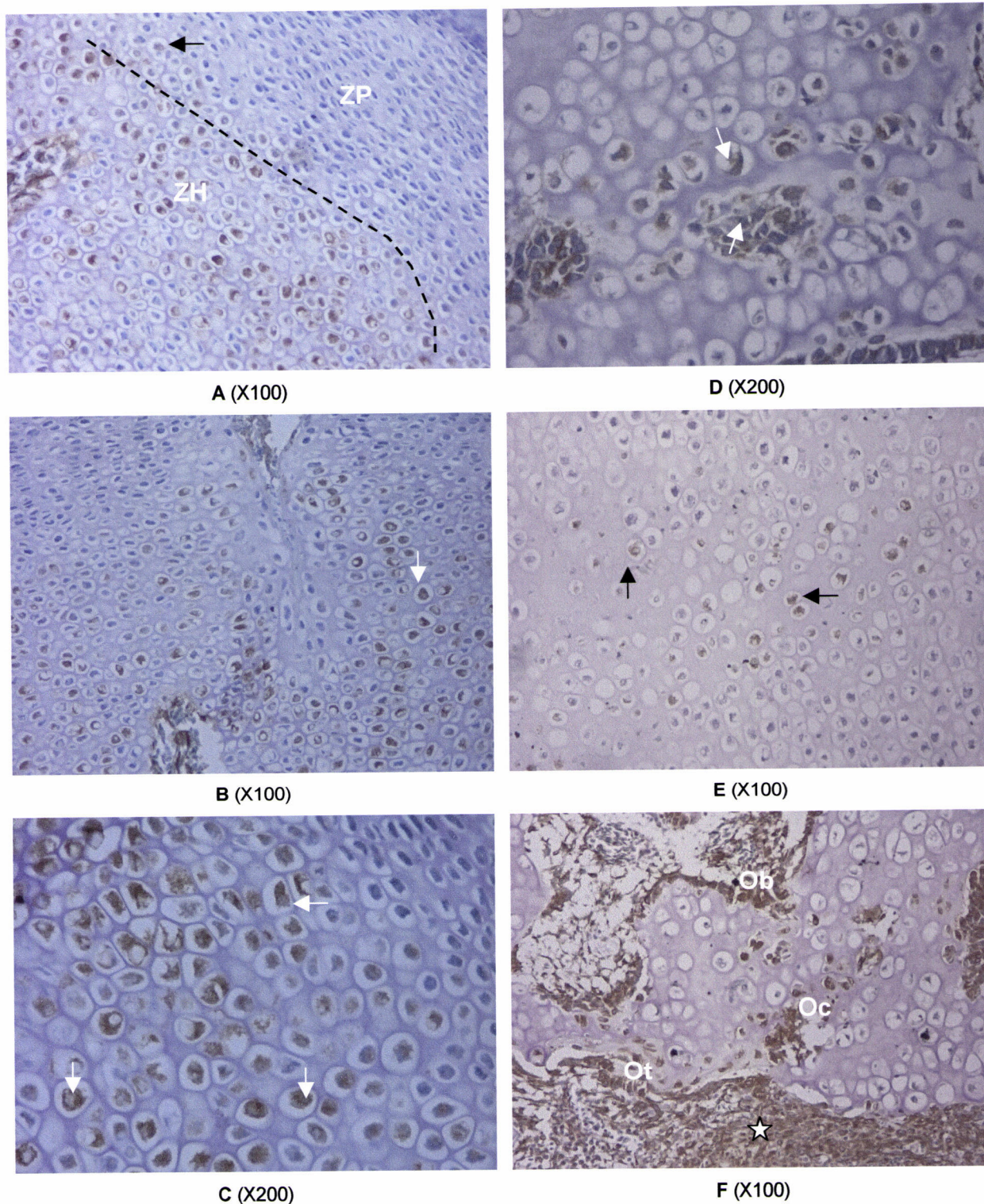
**Figura 5.1** Imunomarcção para o PCNA. Em ambos os tipos de placas de crescimento, são evidentes condrócitos da zona de proliferação positivos (setas) [X200, Contracoloração com Hematoxilina de Harris].





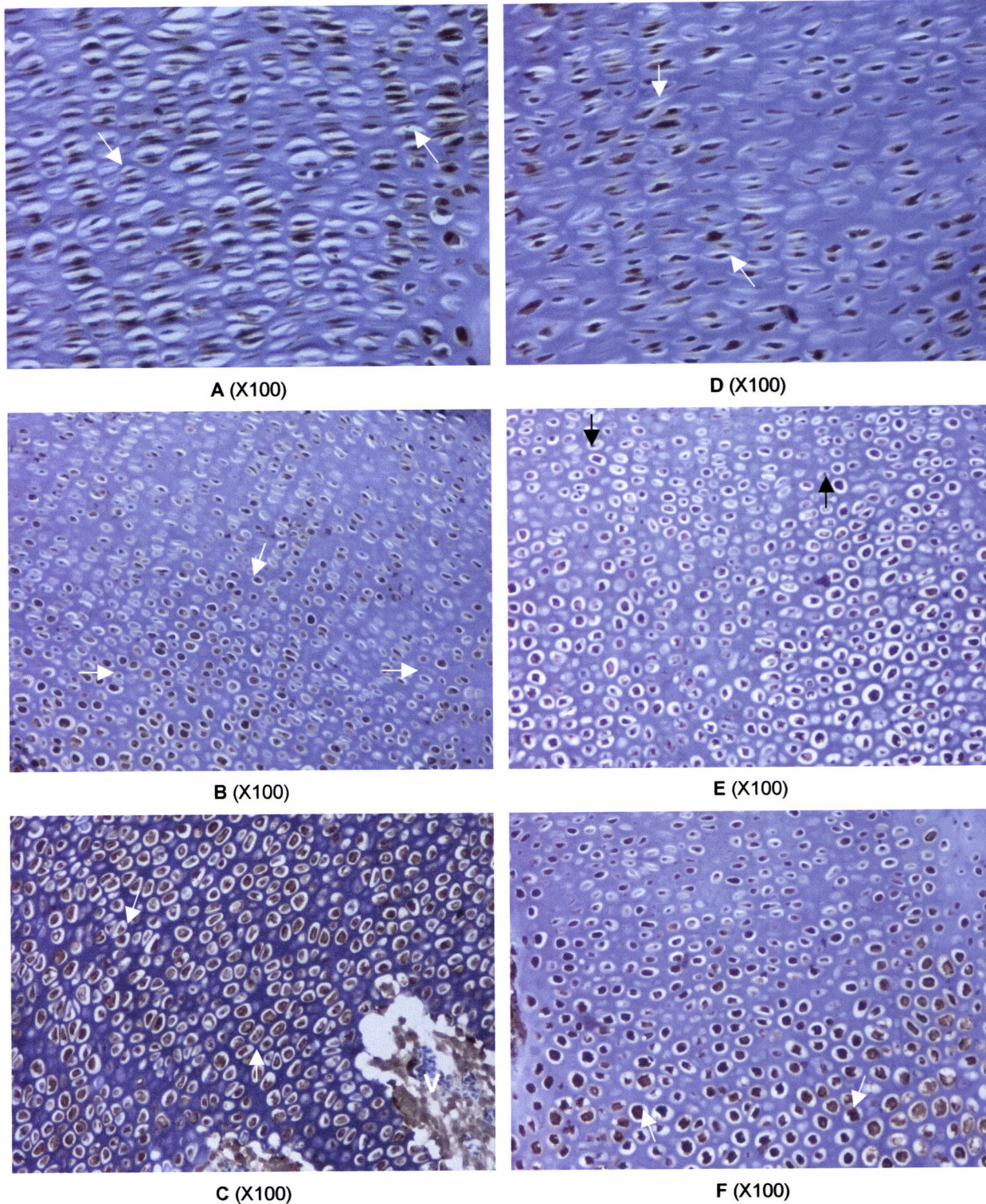
**Figura 5.2** Imunomarcacão para o *c-myc*. São bem visíveis células positivas em todas as imagens. Em A (placa de crescimento normal) e em D (placa de crescimento discondroplásica)  possível observar na parte superior algumas células proliferativas positivas (setas). Em B e C (placas de crescimento normais) e em E e F (placas de crescimento discondroplásicas)  possível observar condrocitos hipertróficos positivos (setas) para a *c-myc*, embora nas placas de crescimento discondroplásicas o número de células positivas seja em menor número. Em F as células positivas são em número reduzido, encontrando-se junto a um canal vascular (V), o que pode fazer supor que estas sejam células apoptóticas (seta) [Contracoloraco com Hematoxilina de Mayer].





**Figura 5.3** Imunomarcção para a tubulina-beta. Não foi observada imunomarcção nas zonas de repouso, quer nas placas de crescimento normais (A), quer nas discondróplicas. Nas zonas de proliferação (ZP) de ambos os tipos de placas de crescimento foram observados alguns condrócitos positivos (seta em A, imagem na qual a linha a tracejado assinala a passagem da ZP para a zona de hipertrofia, ZH). A marcação mais evidente foi observada nos condrócitos hipertróficos (B, C e D, placas de crescimento normais; E, placa de crescimento discondróplica, em que os condrócitos positivos são claramente em menor número), alguns deles numa fase terminal do estágio de hipertrofia (ver setas em D). É ainda possível observar imunomarcção positiva nas células da medula (estrela em F) e em osteoblastos (Ob), osteoclastos (Oc) e osteócitos (Ot) [Contracoloração com Hematoxilina de Harris].

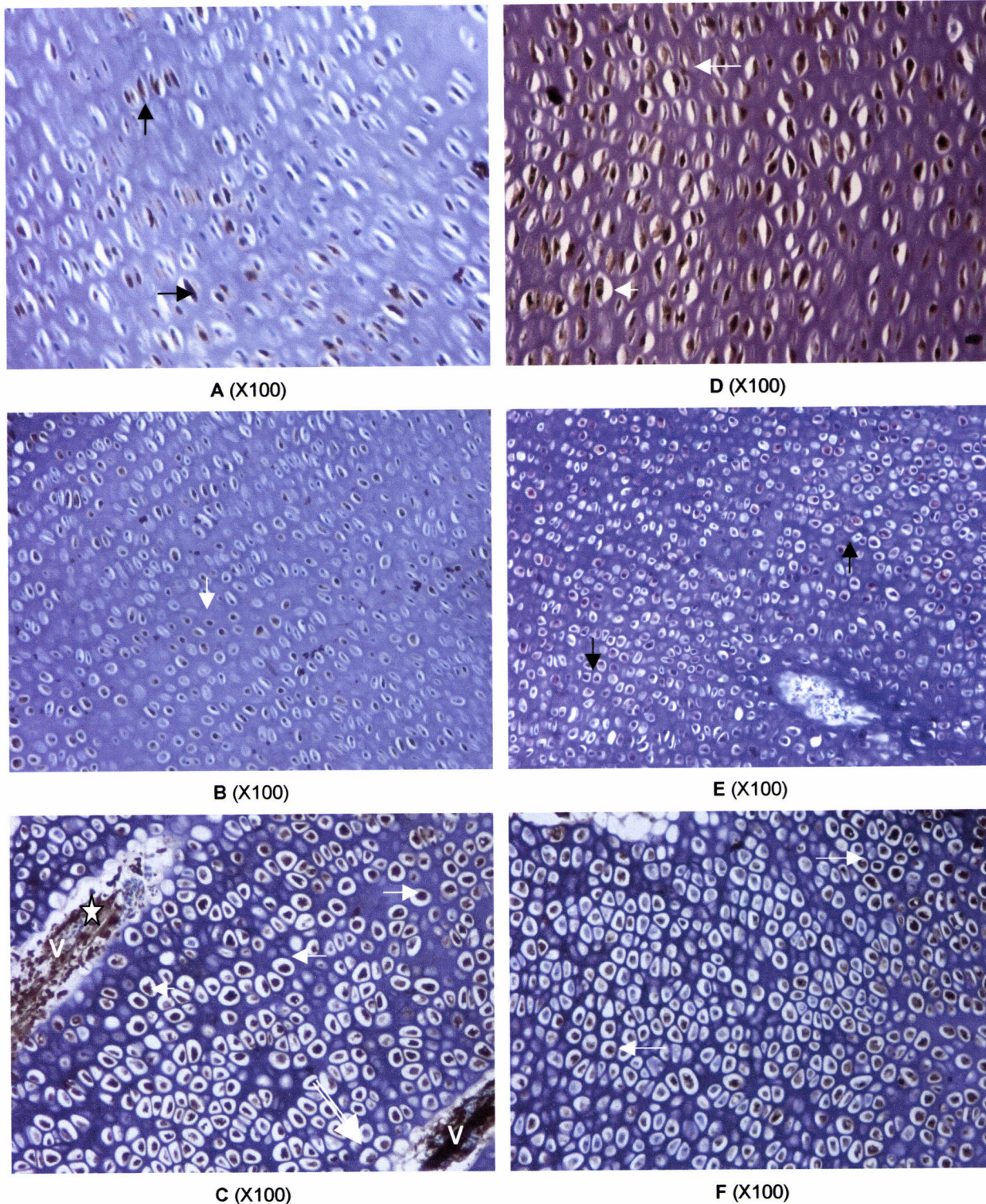




**Figura 5.4** **Imunomarcção para a ubiquitina.** É possível observar condrócitos positivos (setas) em todas as zonas da placa de crescimento (setas). **A** (condrócitos proliferativos), **B** (condrócitos na fase inicial da hipertrofia) e **C** (condrócitos na fase final da hipertrofia) correspondem a placas de crescimento normais; **D** (condrócitos proliferativos), **E** (condrócitos na fase inicial da hipertrofia) e **F** (condrócitos na fase final da hipertrofia) referem-se a placas de crescimento discondroplásicas. Na imagem **C**, é ainda possível observar células positivas no interior dum canal vascular (**V**) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

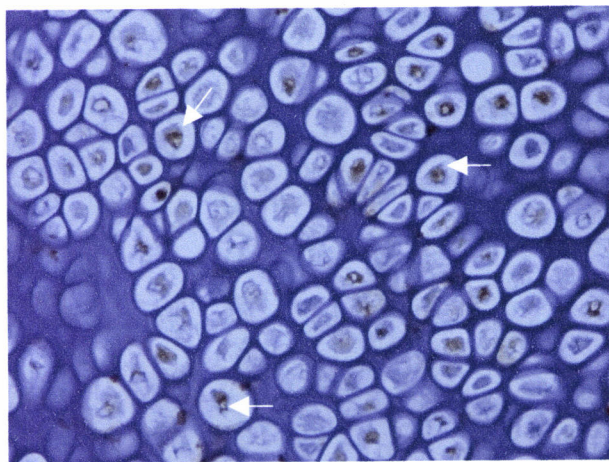




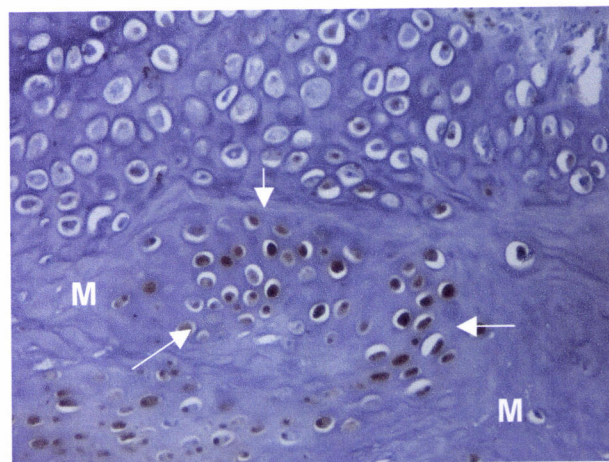


**Figura 5.5** Imunomarcção para a pan-caderina. São bem visíveis células positivas em todas as imagens. No entanto, nas zonas de proliferação (A) e na fase inicial de hipertrofia (B), das placas de crescimento normais os condrócitos positivos (setas) são muito menos frequentes do que nas correspondentes zonas (D) e (E) das placas de crescimento discondroplásicas. Os condrócitos hipertróficos das placas de crescimento normais (C) e das placas de crescimento discondroplásicas (F), apresentam uma imunomarcção intensa (setas). Alguns dos condrócitos hipertróficos terminais (seta dupla), junto aos canais vasculares (V), mostram marcação positiva, bem como os osteoblastos, os osteoclastos e células da medula óssea (estrela) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

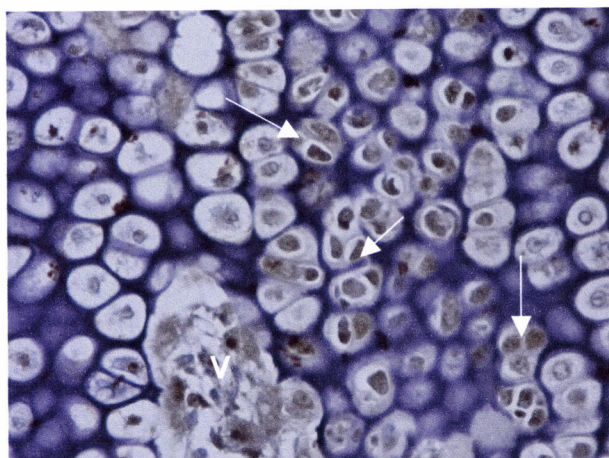




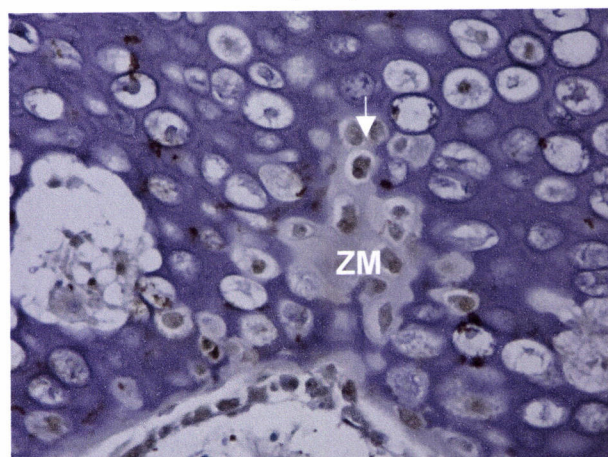
A (X200)



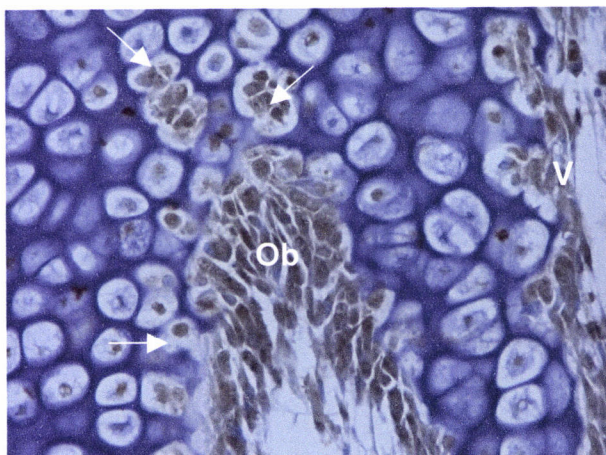
D (X100)



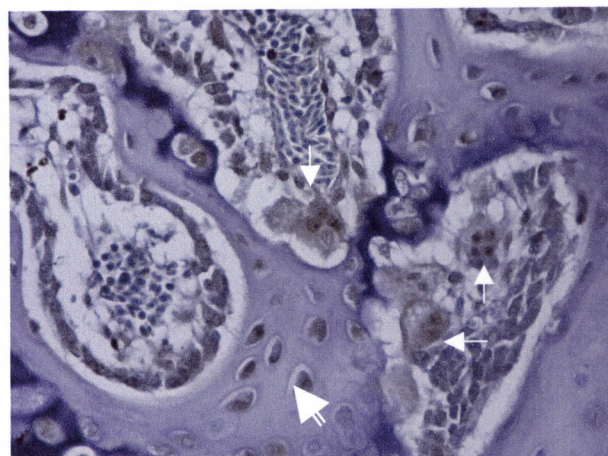
B (X200)



E (X200)



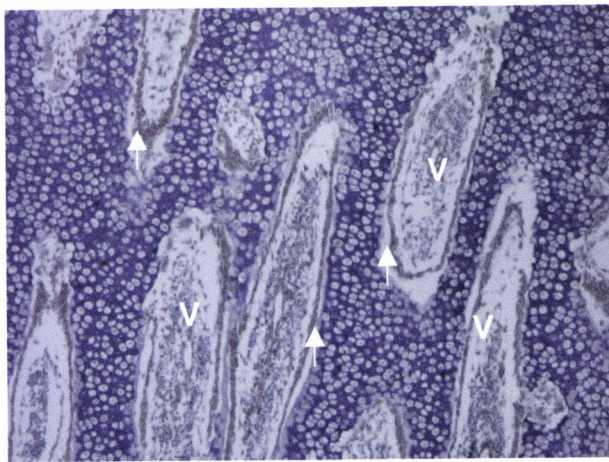
C (X200)



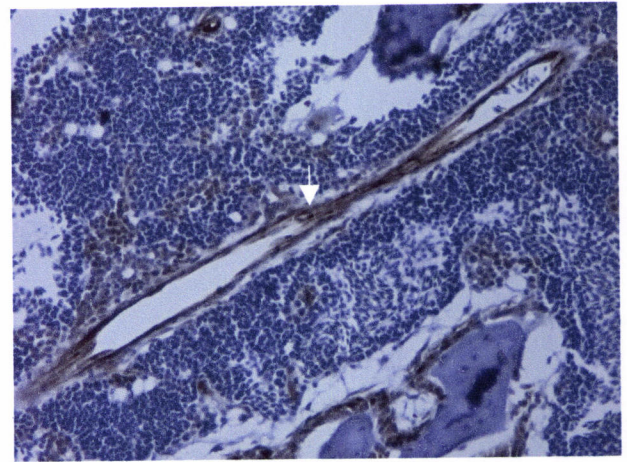
F (X200)

**Figura 5.6** Imunomarcacão para as proteínas S100. As imagens A, B e C dizem respeito a placas de crescimento normais. Em A, são visíveis condrocitos hipertróficos positivos (setas) para as S100; em B e C, podem observar-se condrocitos hipertróficos na fase final da hipertrofia (setas), junto aos canais vasculares (V) e em C,  ainda possível observar células osteoblásticas positivas (Ob). Por seu lado, as imagens D, E e F dizem respeito a placas de crescimento discondroplásticas. Em D são visíveis condrocitos hipertróficos positivos (setas) no interior duma zona de lesão, onde se acumula matriz (M); em E, podem observar-se condrocitos hipertróficos na fase final da hipertrofia (setas), junto a uma zona de mineralizao (ZM), e, em F,  possível observar osteoclastos (setas simples) e osteócitos positivos (seta dupla) para as S100 [Contracolorao com Hematoxilina de Mayer].

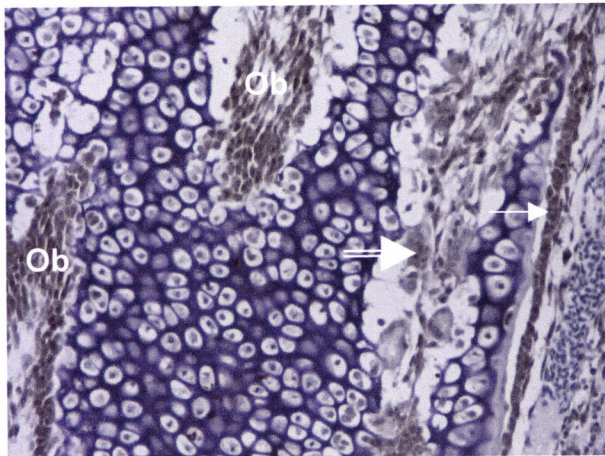




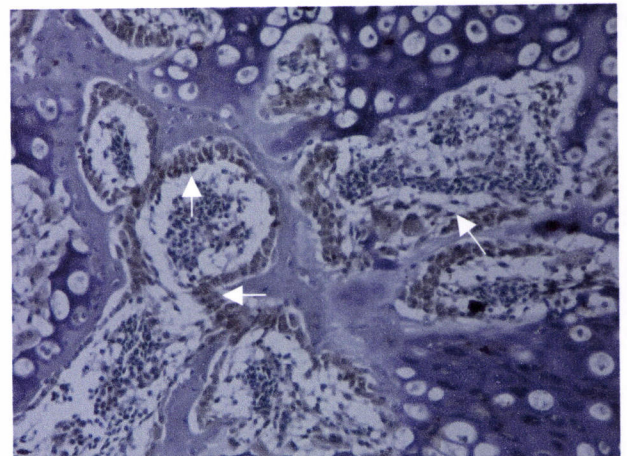
A (X40)



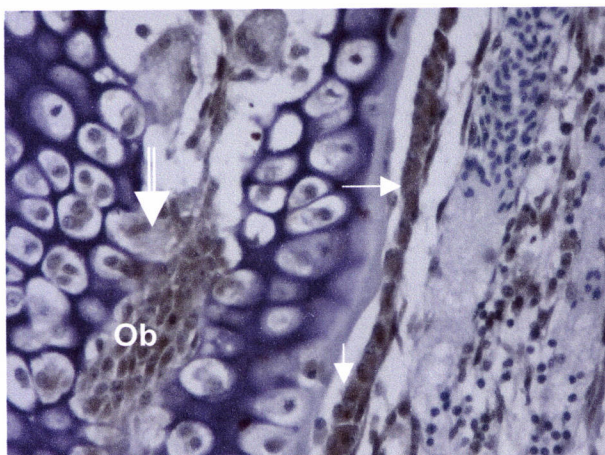
D (X200)



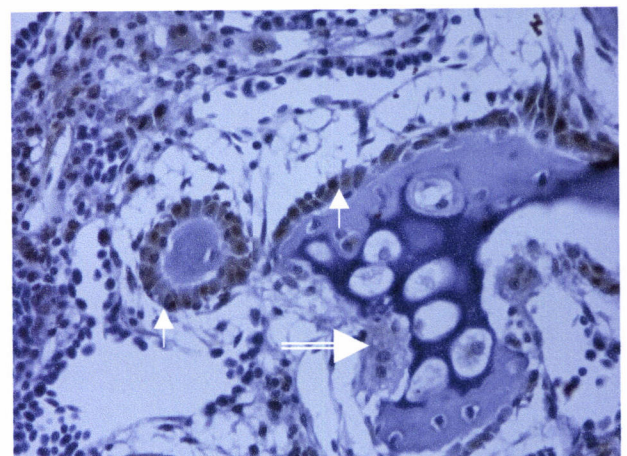
B (X100)



E (X100)



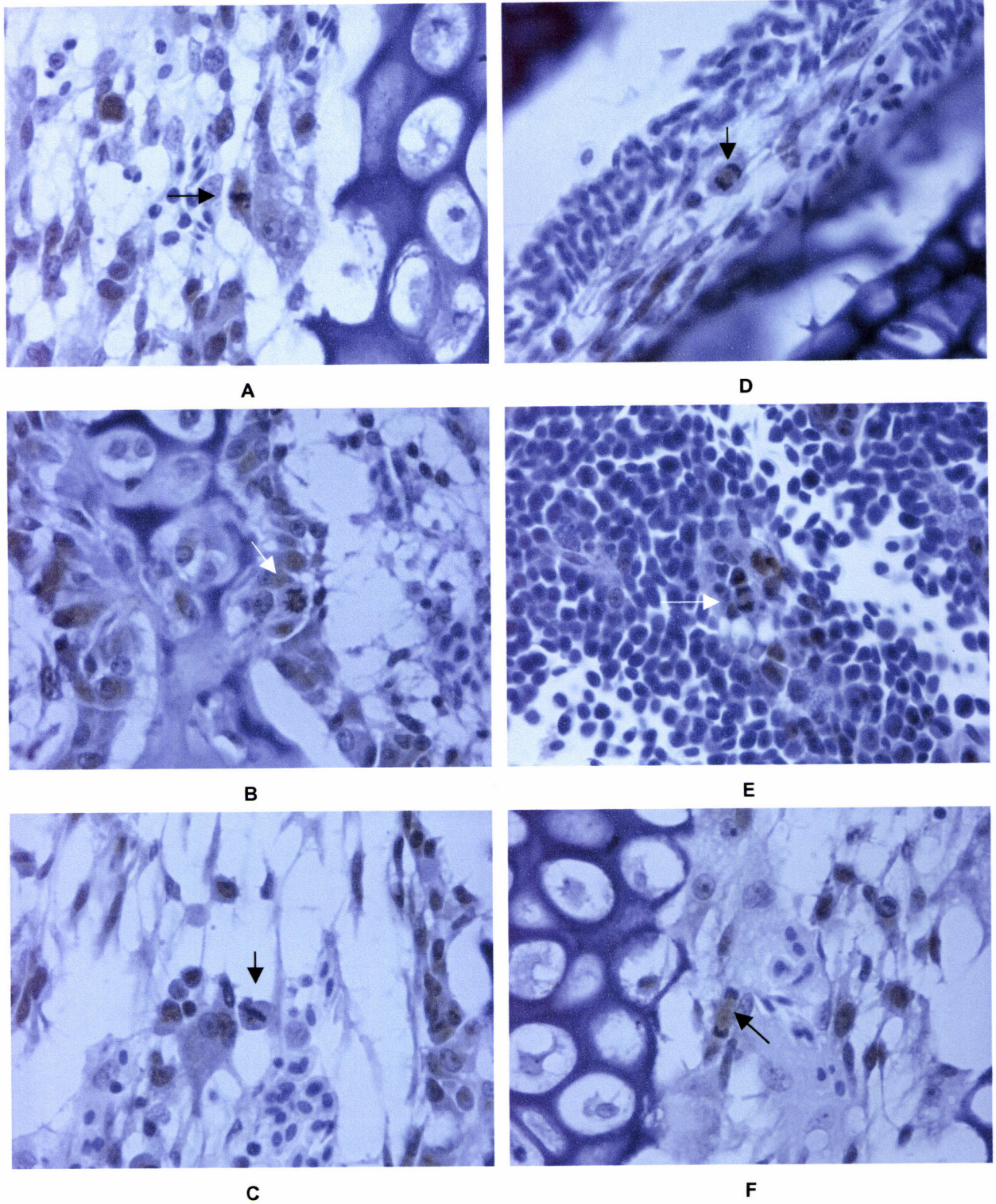
C (X200)



F (X200)

**Figura 5.7a** Imunomarcacão para a Bcl-2. Nas imagens A, B e C, referentes a placas de crescimento normais,   possível observar células osteoblásticas (Ob e setas simples), em redor dos canais de vasculariza o (V), nos locais de deposi o de osso, uma evidente imunomarcacão positiva para a Bcl-2. Nas imagens D, igualmente referente a uma placa de crescimento normal,   possível observar imunomarcacão positiva para a Bcl-2 (seta) nas células que formam uma estrutura vascular. Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásticas (E e F) a imunomarcacão não   tão intensa e o padrão de expressão é mais irregular (setas). Em B, C e F é ainda possível observar alguns osteoclastos positivos (duplas setas) para a Bcl-2 [Contracolora o com Hematoxilina de Mayer].

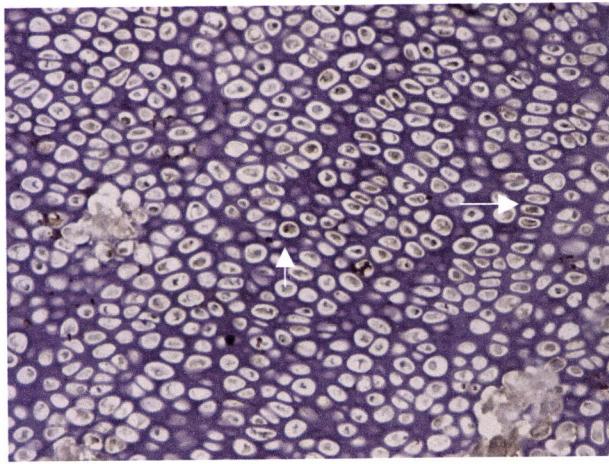




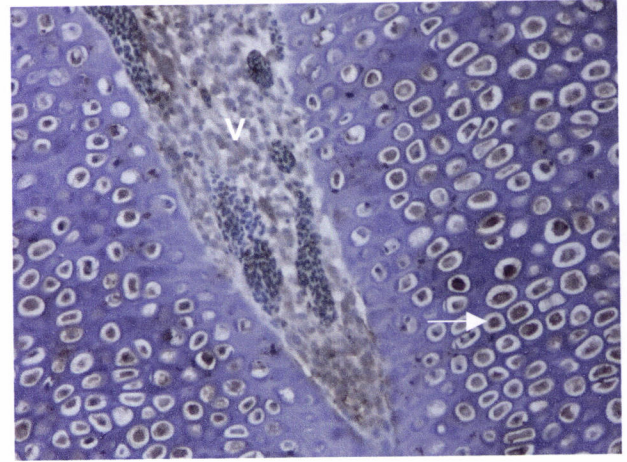
**Figura 5.7b** Imunomarcacão para a Bcl-2. É possível observar nas imagens várias figuras de mitose (setas), designadamente, metafase (A, B e C) e anafase (D, E e F), em células hematopoiéticas da medula óssea, positivas para a Bcl-2 [X400; Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].



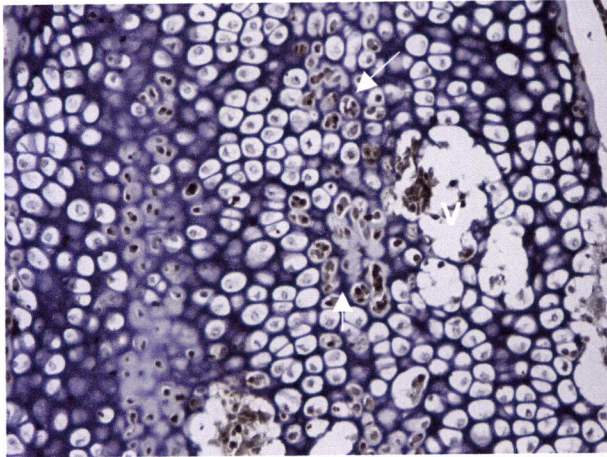




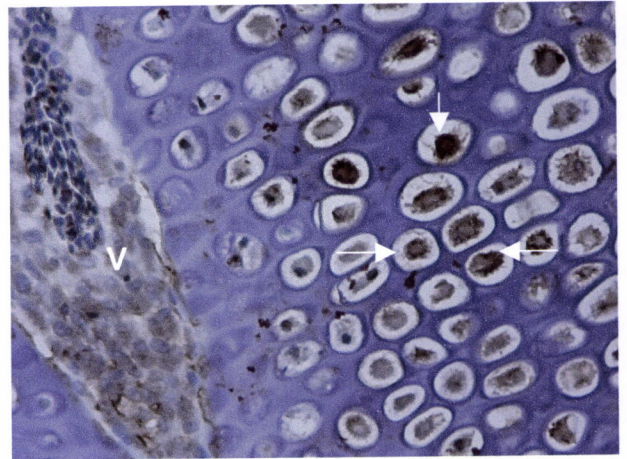
A (X100)



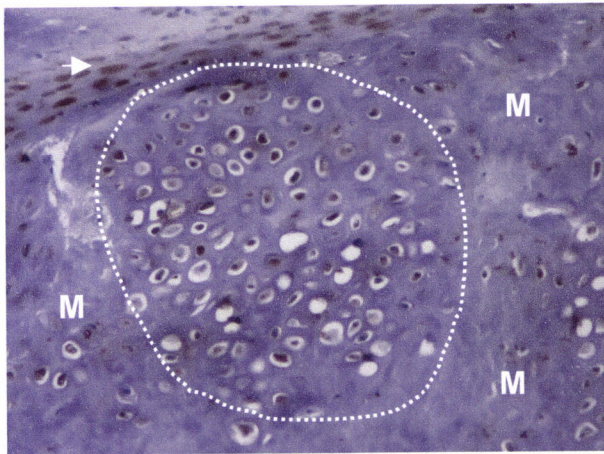
D (X100)



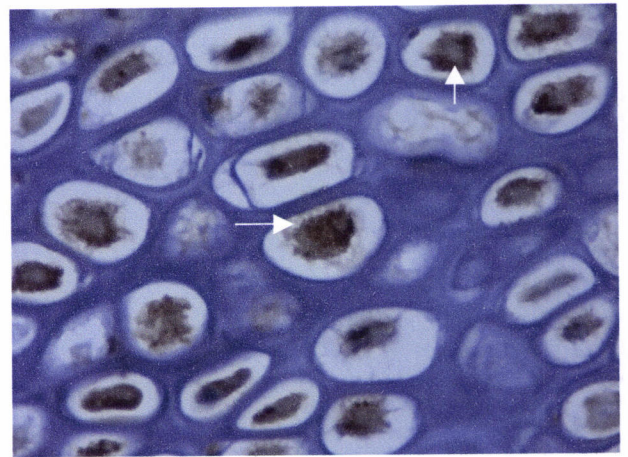
B (X100)



E (X200)



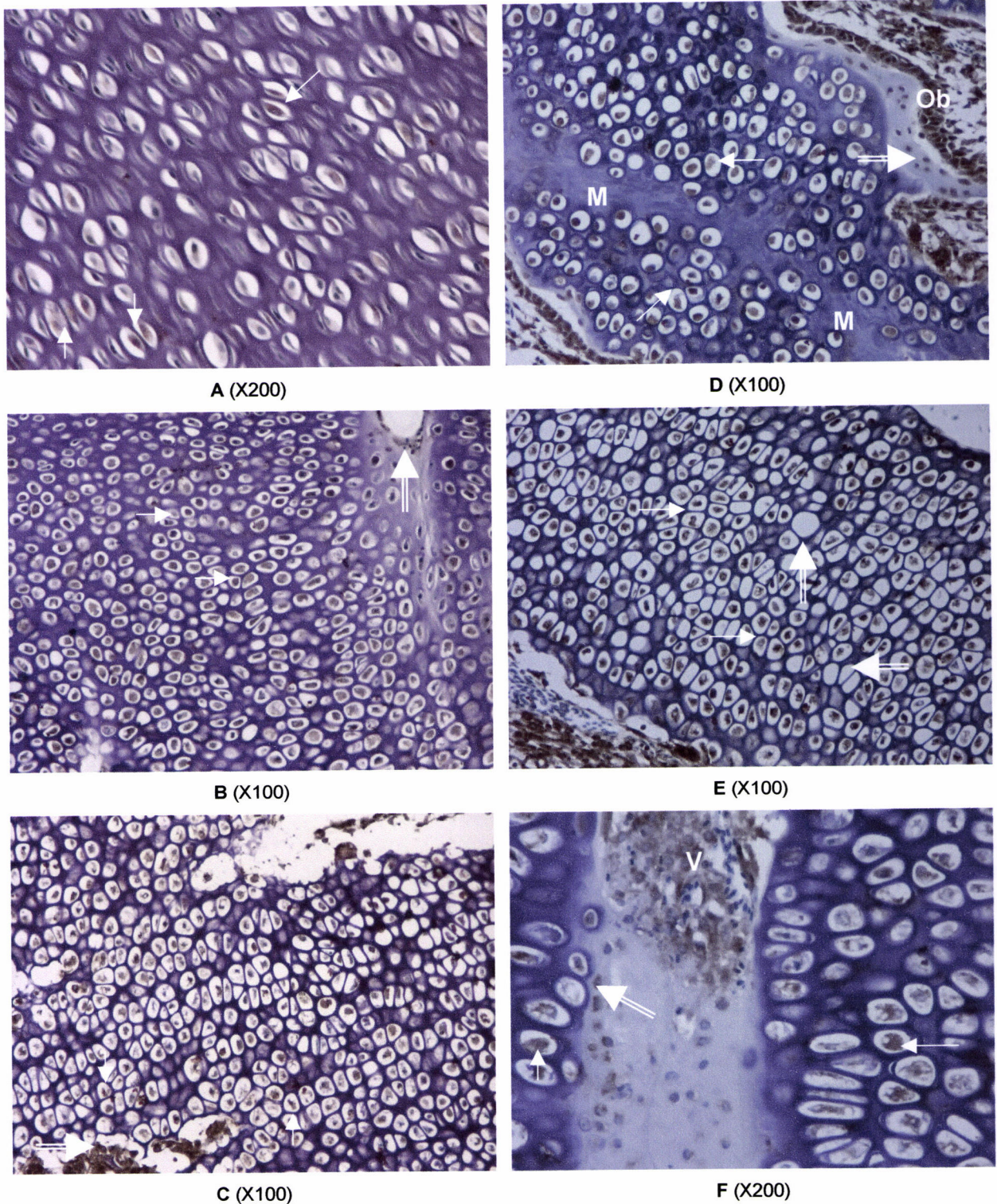
C (X100)



F (X400)

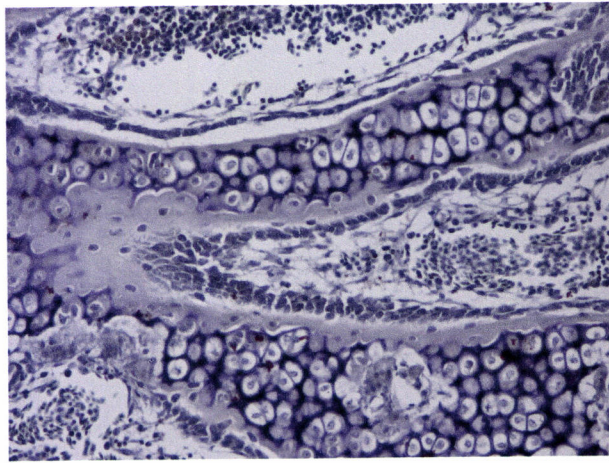
**Figura 5.8** Imunomarcacão para a caspase-3. Nas imagens A e B, relativas a placas de crescimento normais,   possível observar condrócitos hipertróficos positivos (setas) para a caspase-3. Nas imagens C, D, E e F, relativas a placas de crescimento discondroplásicas, é igualmente possível observar condrócitos hipertróficos positivos (setas) para a caspase-3, junto aos canais vasculares (V). Na imagem C, podem observar-se condrócitos positivos no interior duma lesão, delimitada pela linha a tracejado, rodeados por abundante matriz (M), e algumas células do pericôndrio (seta), igualmente positivas para a caspase-3 [Contracolorao com Hematoxilina de Mayer].



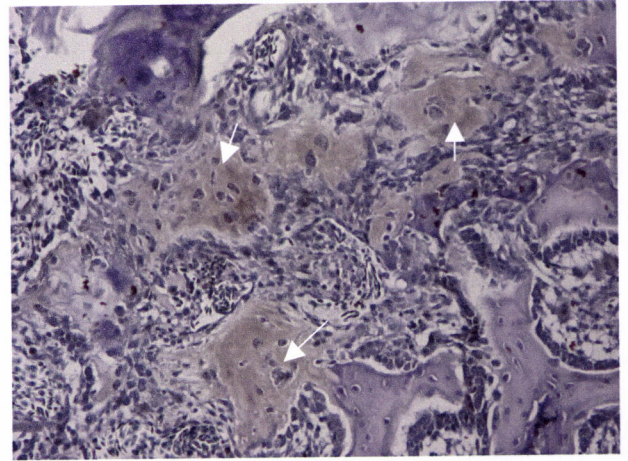


**Figura 5.9** Imunomarcacão para o VEGF. As imagens A, B e C dizem respeito a placas de crescimento normais. Em A, são visíveis condrócitos proliferativos positivos (setas); em B, podem observar-se condrócitos positivos na fase final da hipertrofia (setas), e células positivas a forrar uma estrutura vascular (dupla seta); em C, podem observar-se condrócitos positivos na fase final da hipertrofia (setas) e osteoclastos positivos (dupla seta). As imagens D, E e F dizem respeito a placas de crescimento discondroplásicas. Em D são visíveis condrócitos hipertróficos positivos (setas), rodeados por abundante matriz (M), osteoblastos (Ob) e osteócitos (dupla seta); em E, podem observar-se condrócitos hipertróficos positivos (setas) e várias lacunas vazias (dupla seta); em F, podem observar-se condrócitos hipertróficos (setas) e osteócitos (dupla seta), positivos para o VEGF, bem como algumas células no interior dum canal vascular (V) [Contracolorao com Hematoxilina de Mayer].

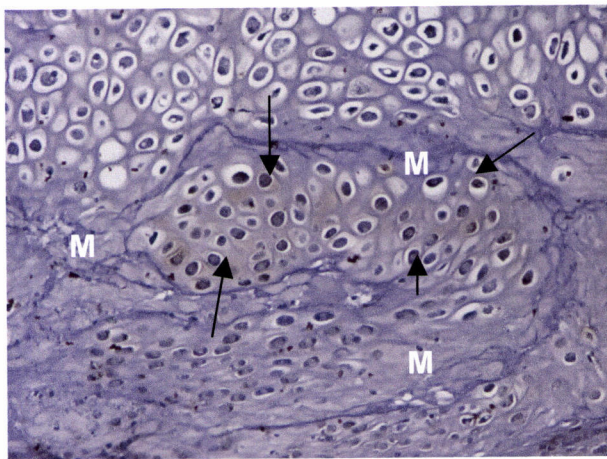




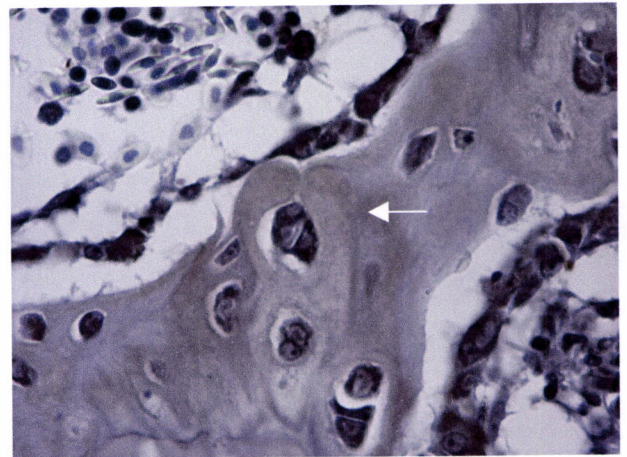
A (X100)



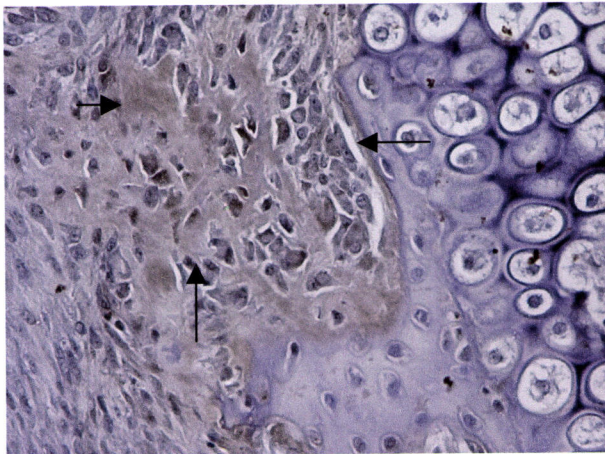
D (X100)



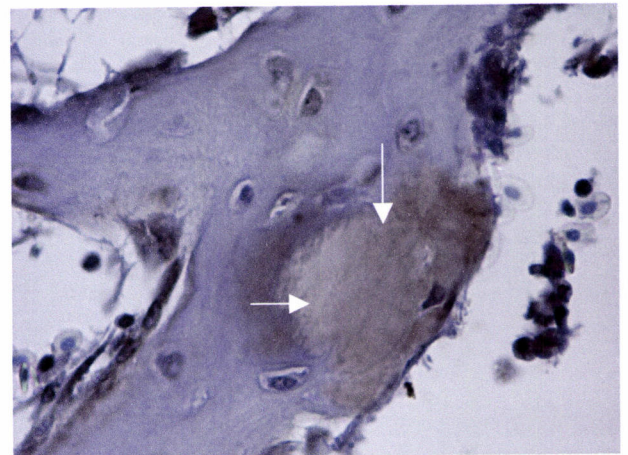
B (X200)



E (X400)



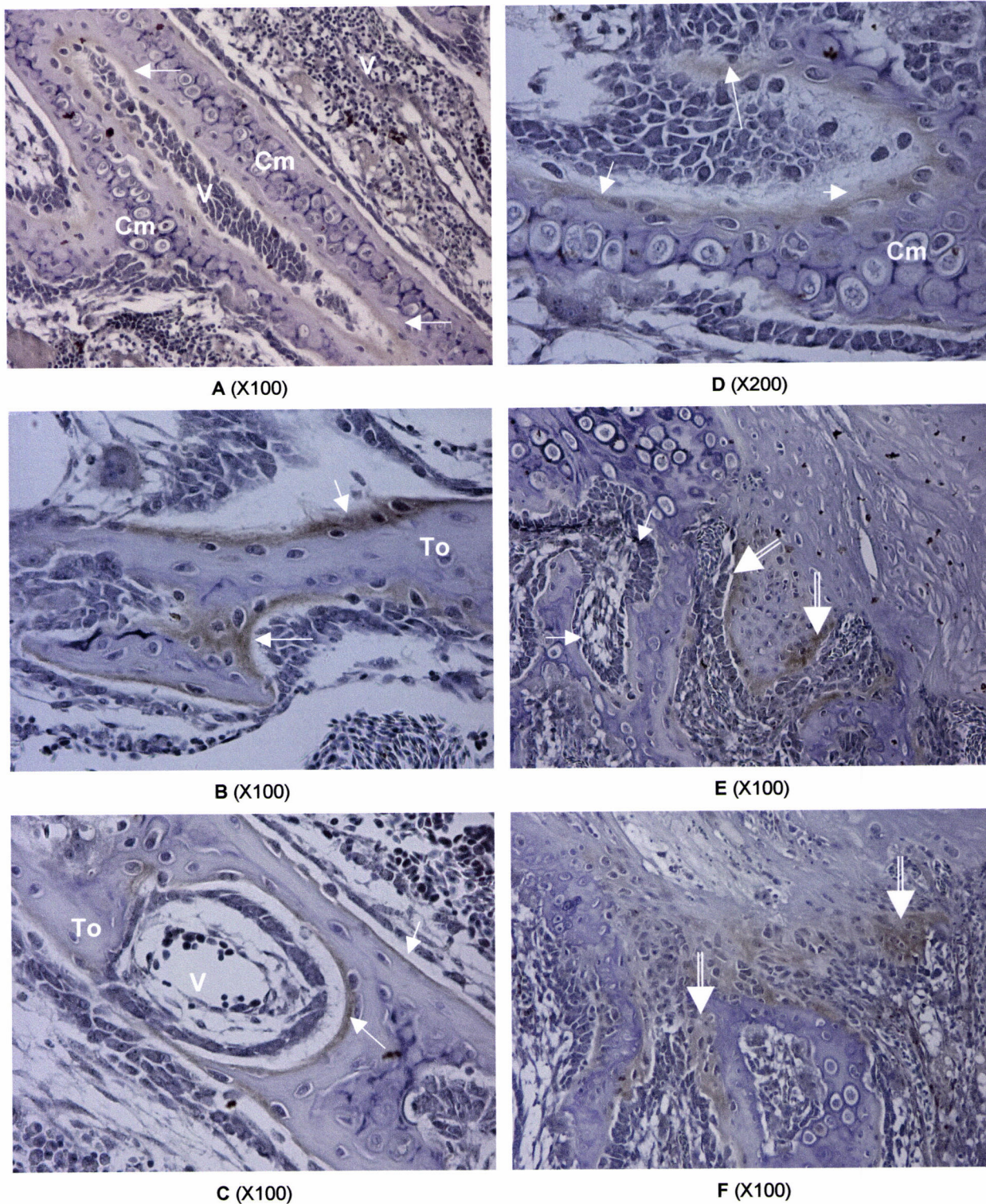
C (X200)



F (X400)

**Figura 5.10** Imunomarcção para o von Willebrand Factor (vWF). A imagem A refere-se a uma secção de placa de crescimento normal onde não se vislumbra imunomarcção positiva. Pelo contrário, nas secções correspondentes a placas de crescimento discondróplásicas, B a F, a imunomarcção positiva para o vWF é evidente (setas), particularmente na matriz de áreas associadas a lesões e a que corresponderão, provavelmente, situações de ruptura de vasos sanguíneos. Na imagem B, é interessante verificar que os condrócitos hipertróficos, rodeados por abundante matriz (M) aparecem positivos para o vWF. Nas imagens E e F a imunomarcção positiva parece estar associada a reparação de microfracturas [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

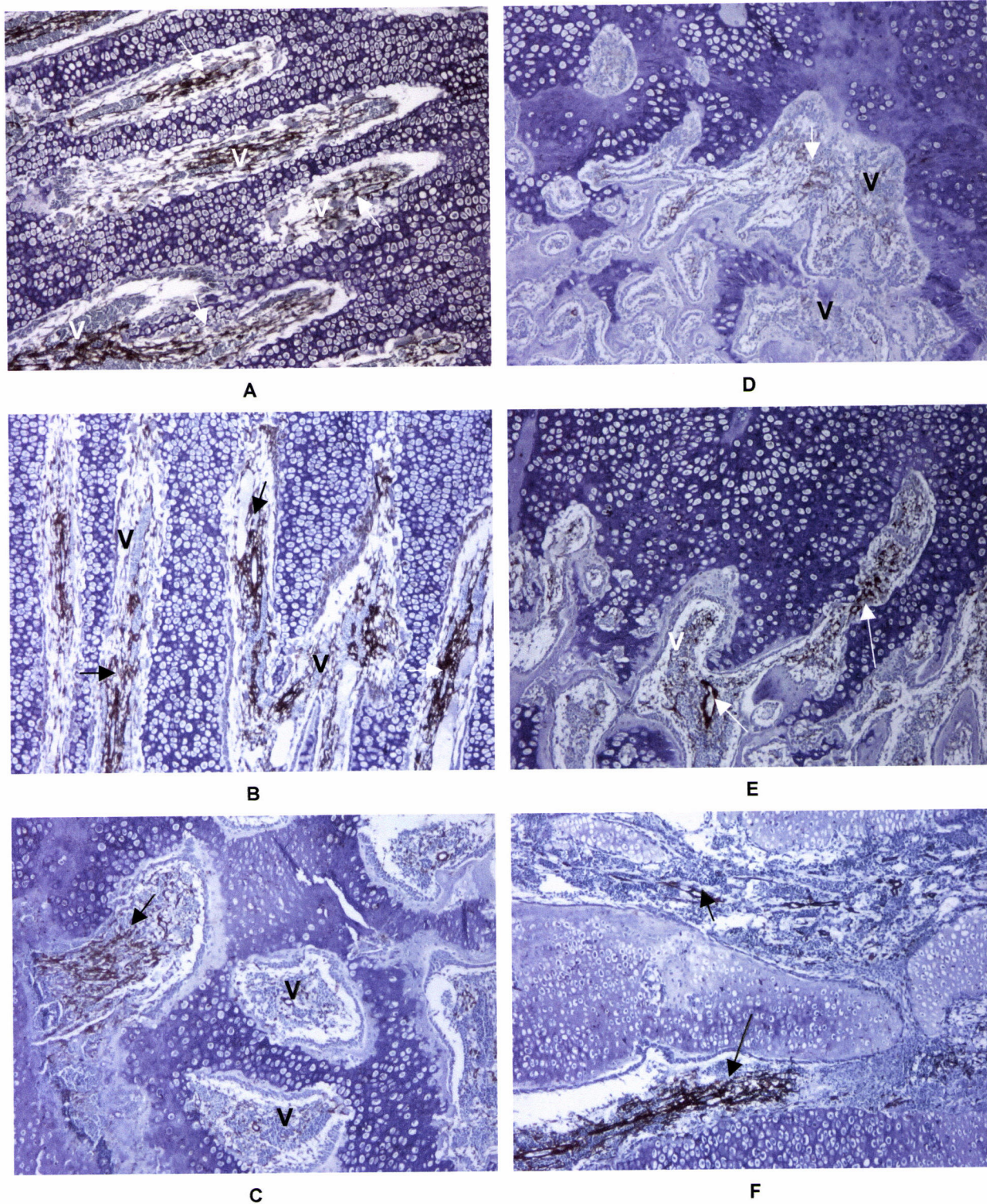




**Figura 5.11** Imunomarcção para a Laminina-1. As imagens A, B, C e D referem-se a secções de placas de crescimento normais onde é evidente a imunomarcção positiva (setas) ao longo dos canais vasculares (V), a forrar as superfícies das trabéculas de cartilagem mineralizada (Cm) e das trabéculas ósseas (To). Nas placas de crescimento discondróplicas, E e F, a imunomarcção não apresentou o mesmo padrão das placas de crescimento normais, com muitas áreas dos canais vasculares negativas (setas simples) e imunomarcção positiva junto às áreas de lesão (setas duplas) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

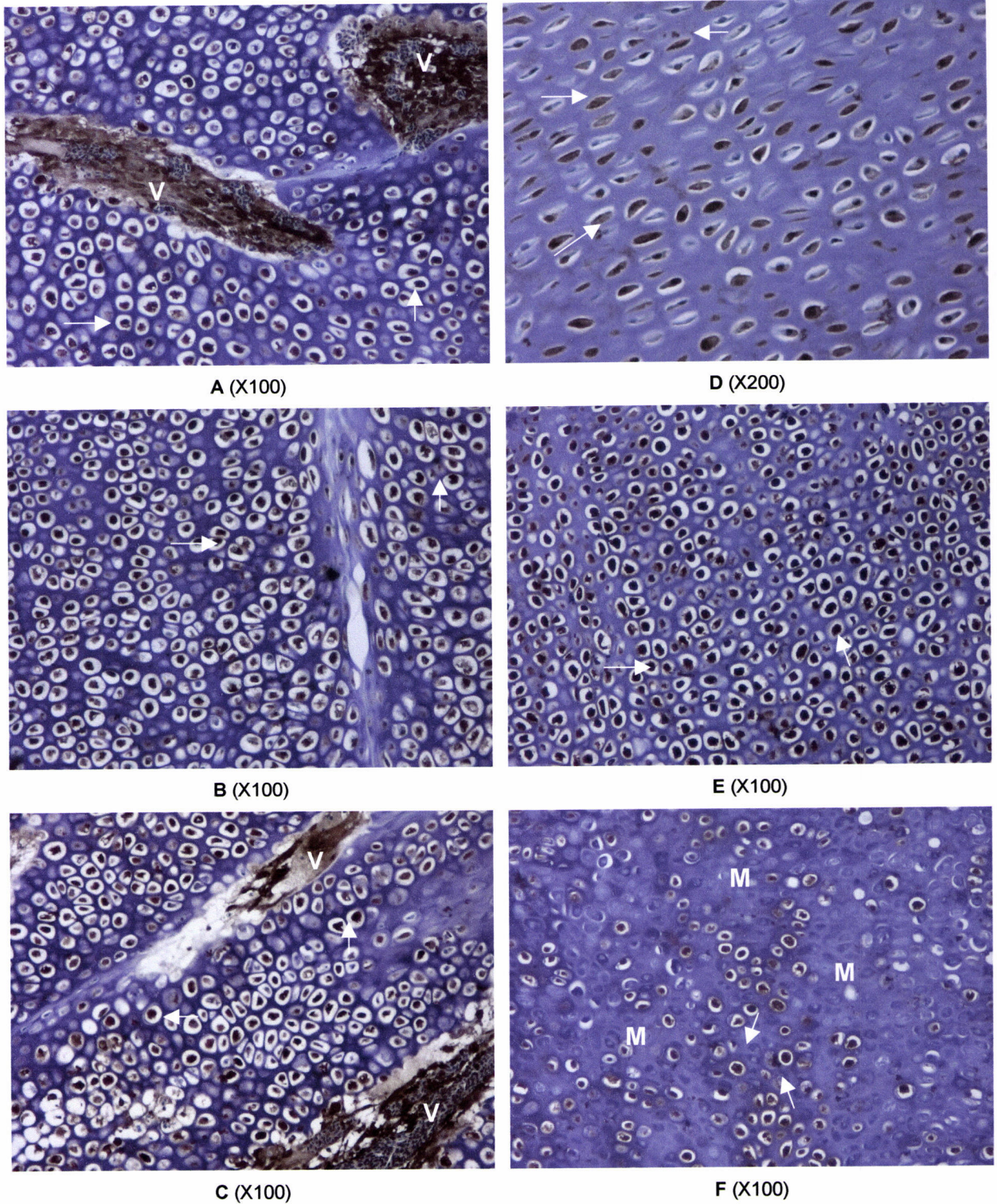






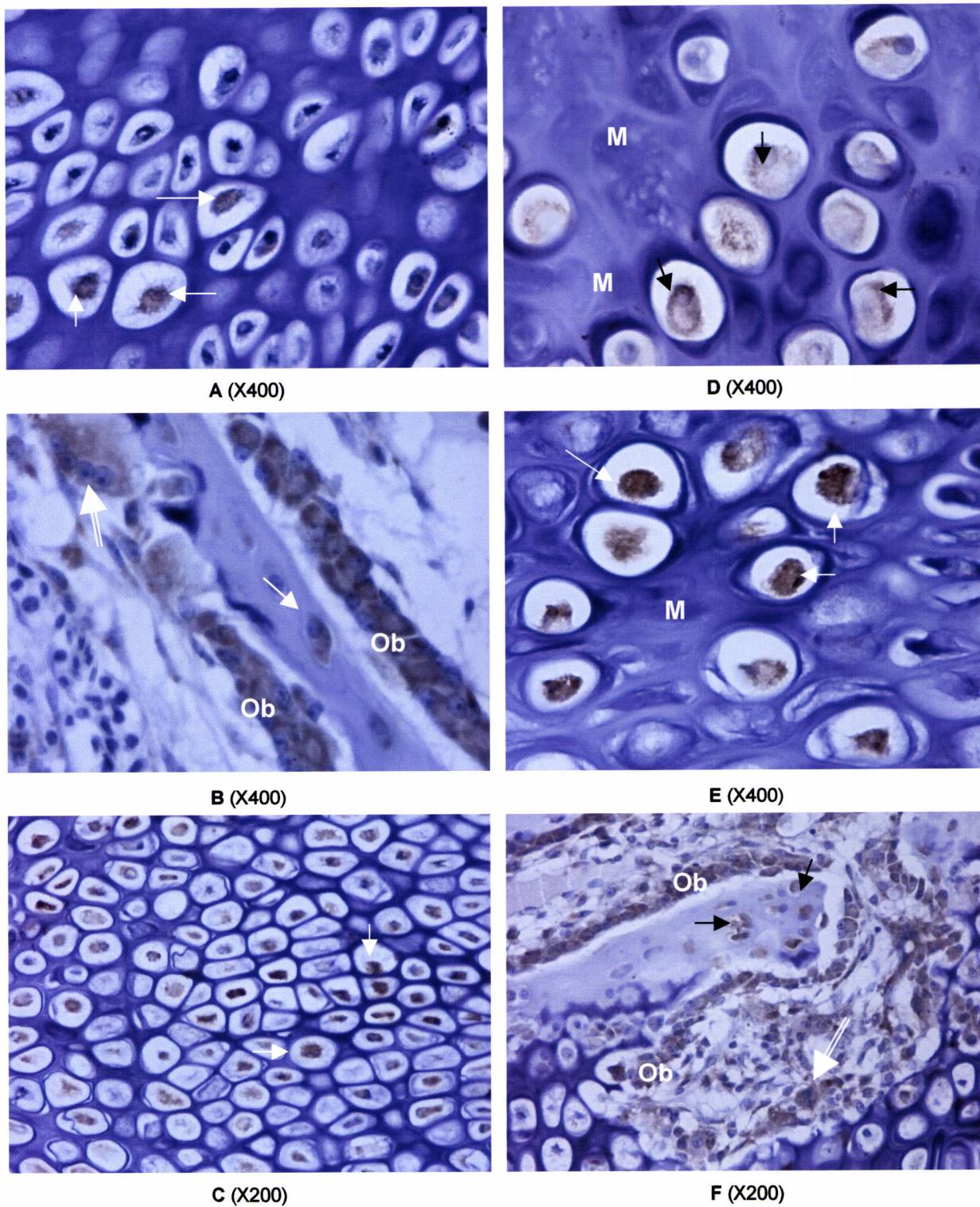
**Figura 5.12** Imunomarcção para a actina. Nas imagens A e B, as quais se referem a placas de crescimento normais, podemos observar um intensa imunomarcção para a actina (setas) em todos os canais vasculares (V). Pelo contrário, nas imagens da placas de crescimento discondroplásicas (C a F), a imunomarcção no interior dos canais vasculares (V), para além de não ser tão intensa (setas), nalguns casos é praticamente inexistente [X40; Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].





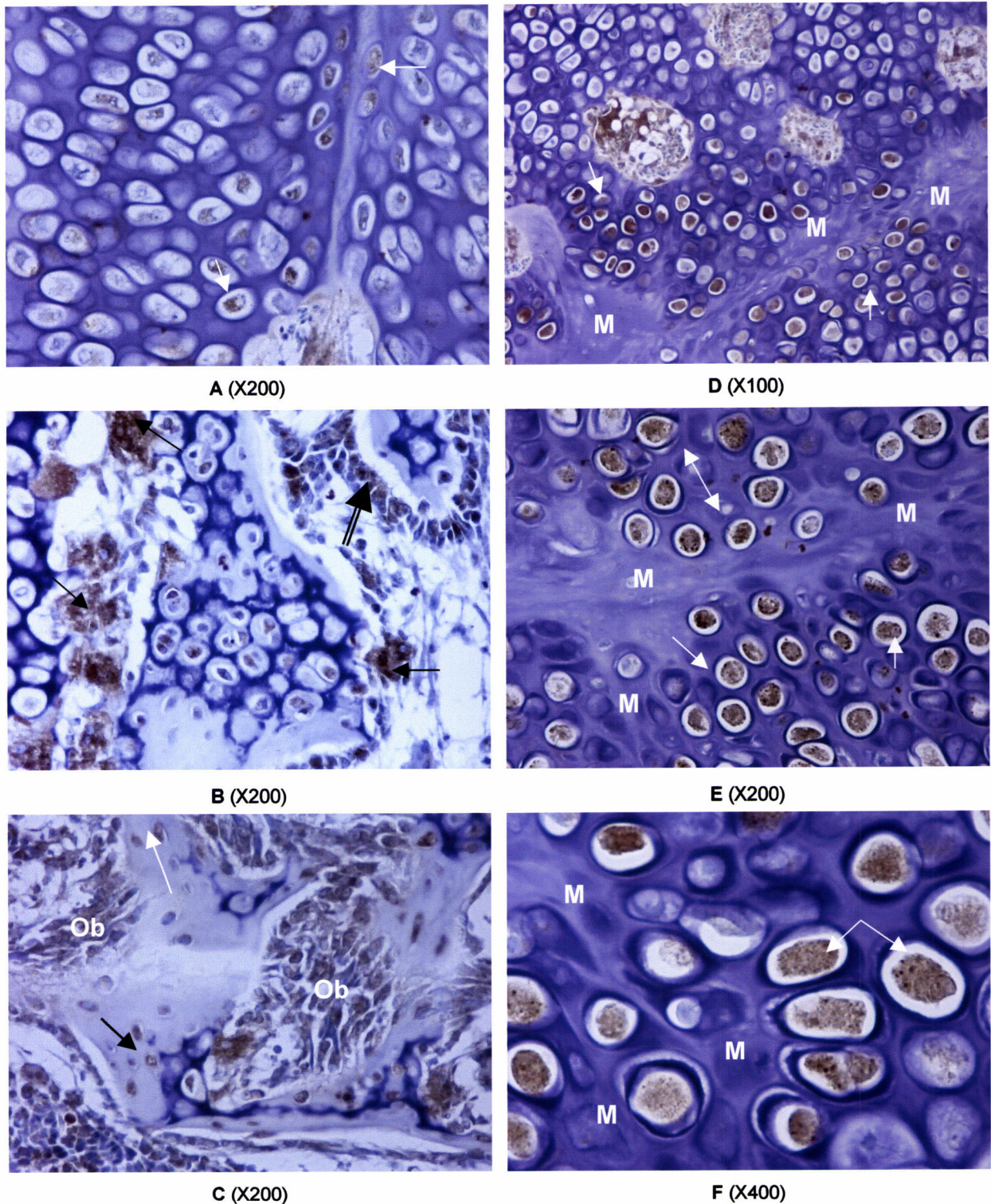
**Figura 5.13** Imunomarcacão para a MMP-1. São bem visíveis células positivas em todas as imagens. Em A, B e C (placas de crescimento normais), os condrócitos hipertróficos positivos (setas) para a MMP-1, distribuem-se ao longo da placa de crescimento, sendo possível observar, igualmente, células positivas nos vasos sanguíneos (V). Em D, E e F (placas de crescimento discondroplásicas)  também possível observar condrócitos positivos (setas): proliferativos em D e hipertróficos em E. Na imagem F, os condrócitos positivos distribuem-se nas áreas em que se verifica acumulao de matriz (M) [Contracolorao com Hematoxilina de Mayer].





**Figura 5.14** Imunomarcação para a MMP-13. As imagens A e B referem-se a placas de crescimento normais. Em A,   possível observar alguns condrócitos hipertróficos positivos (setas); em B podem observar-se osteoclastos (setas duplas), osteoblastos (Ob) e osteócitos positivos para a MMP-13. Nas placas de crescimento discondroplásicas (C, D, E e F), aparecem alguns condrócitos hipertróficos positivos para a MMP-13 (setas), principalmente junto às lesões, em redor da matriz (M); em F, podem observar-se osteoblastos (Ob), osteoclastos (setas duplas) e osteócitos (setas simples), positivos para a MMP-13 [Contracolora o com Hematoxilina de Mayer].

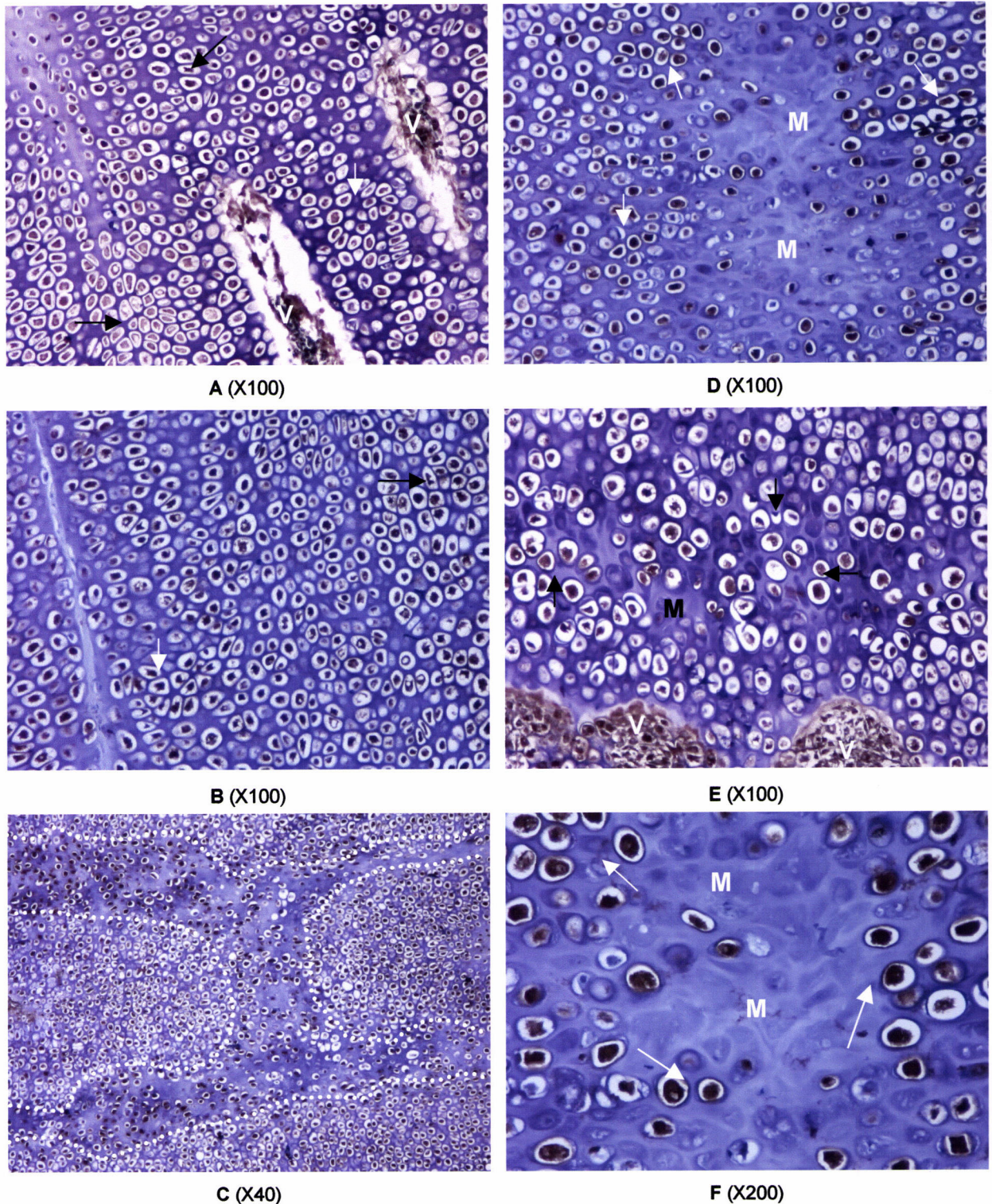




**Figura 5.15** Imunomarcção para a **MMP-2**. As imagens **A**, **B** e **C** referem-se a placas de crescimento normais. Em **A** é possível observar alguns condrócitos hipertróficos positivos (setas simples); em **B**, podem observar-se osteoclastos (setas simples) e osteoblastos (setas duplas) positivos para a MMP-2 e em **C**, osteoblastos (Ob) e osteócitos (setas). Nas placas de crescimento discondroplásicas (**D**, **E** e **F**) aparecem alguns condrócitos hipertróficos positivos para a MMP-2 (setas), principalmente junto às lesões, em redor da matriz (M) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

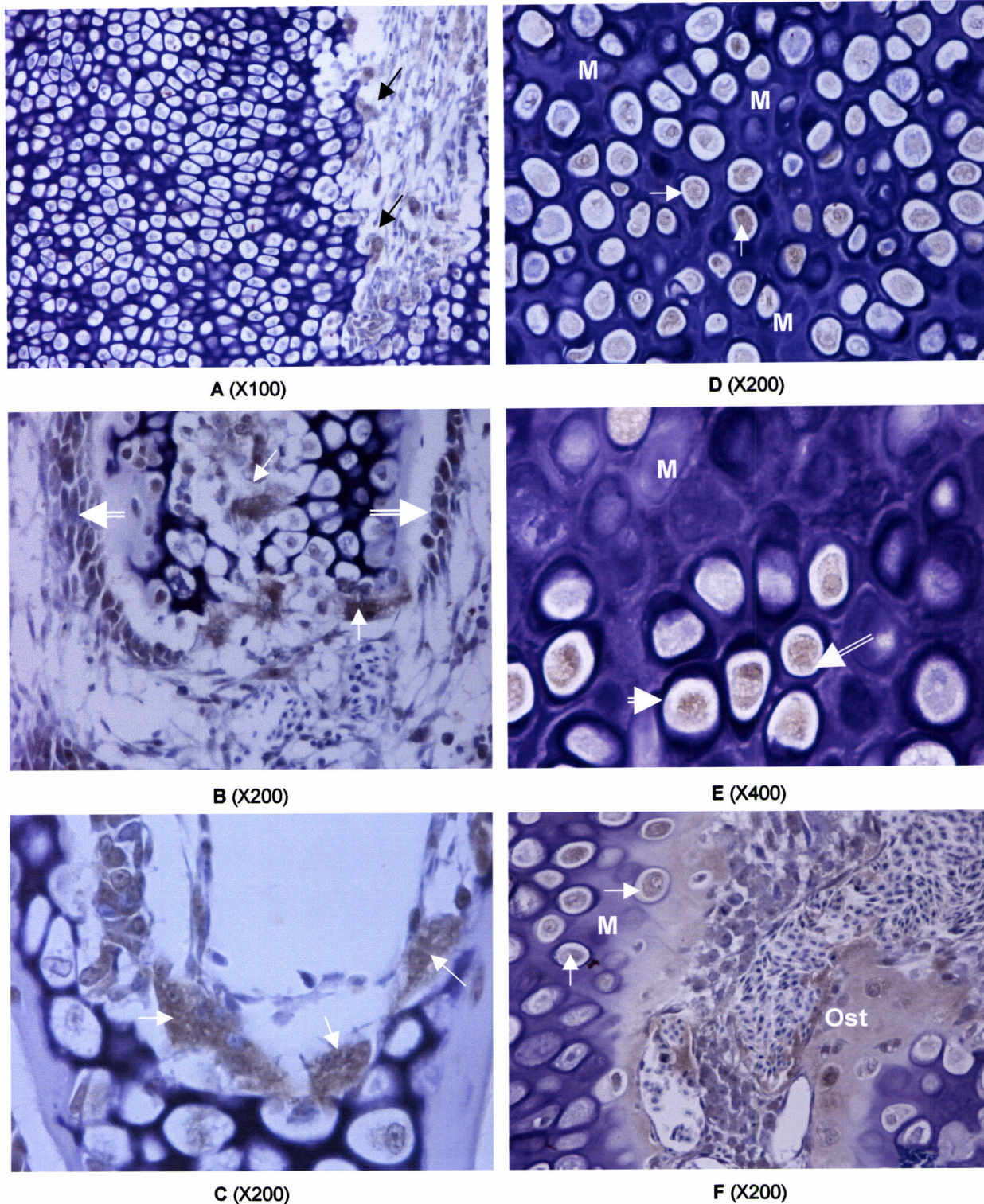






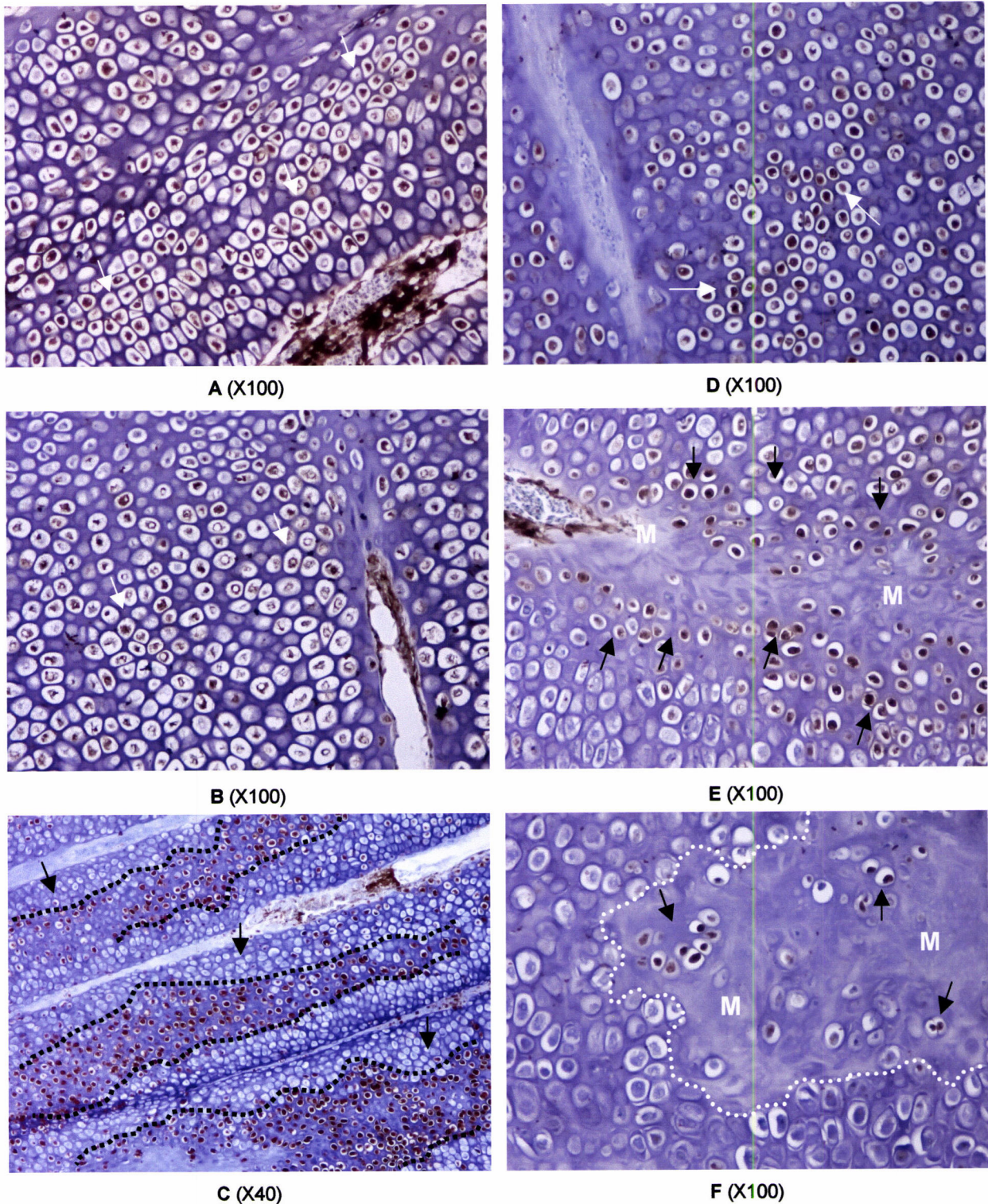
**Figura 5.16** Imunomarcção para a MMP-9. A imagem A refere-se a uma placa de crescimento normal podendo observar-se condrócitos hipertróficos positivos (setas). Nas placas de crescimento discondróplásicas (B, C, D, E e F), aparecem bastantes condrócitos hipertróficos positivos; em B, os condrócitos positivos (setas) e a zona envolvente apresentam um aspecto normal; em C, há uma clara expressão da MMP-9 em quase todos os condrócitos, mais acentuada naqueles que envolvem a lesão (delimitada pelas linhas a tracejado); em D, E e F é também possível observar uma sobre-expressão da MMP-9 nas células junto à matriz (M). Em A e em F pode ainda observar-se imunomarcção positiva nas células presentes nos vasos sanguíneos (V) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].





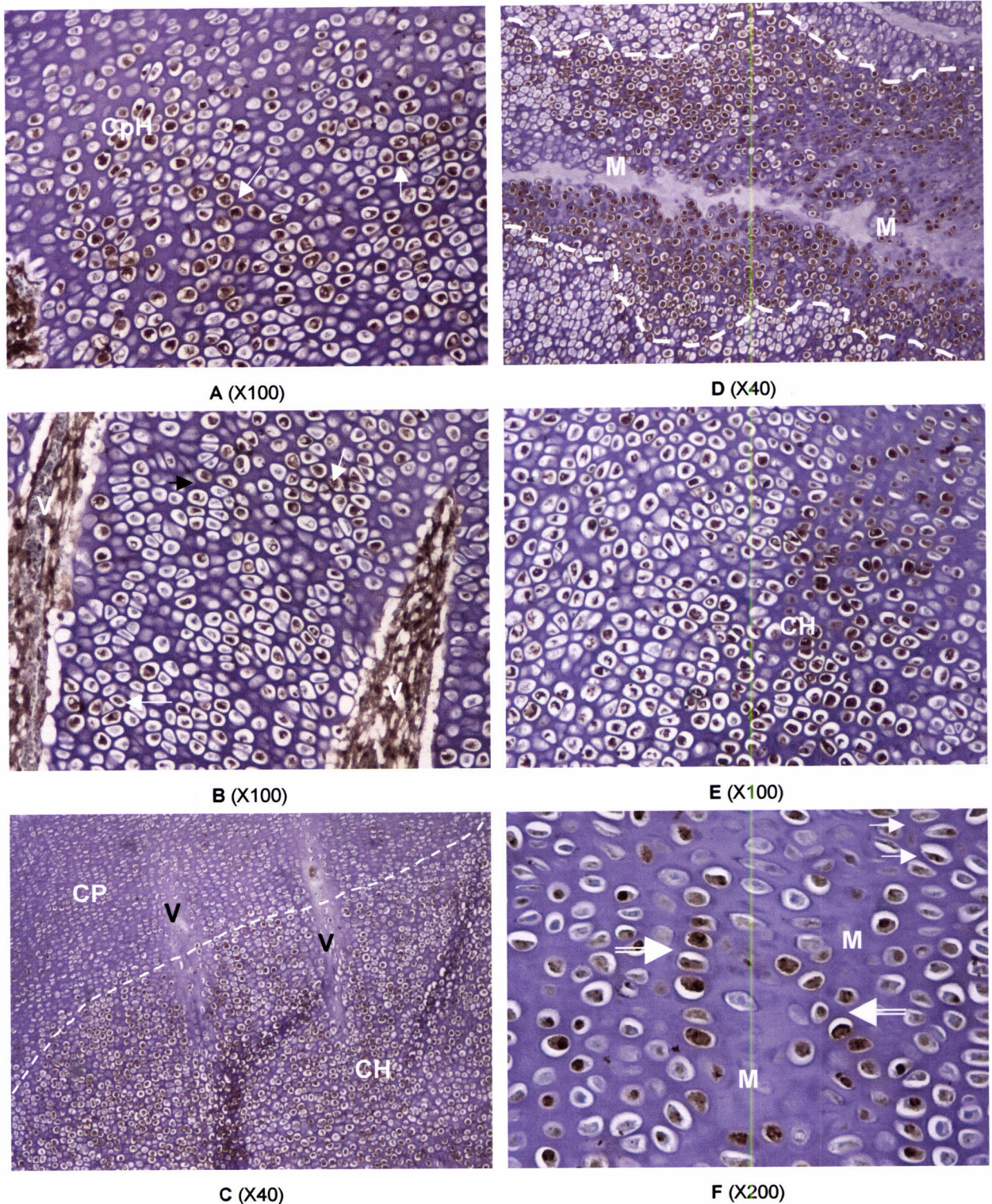
**Figura 5.17** Imunomarcção para a MMP-3. Nas imagens A, B e C (placas de crescimento normais), apenas é possível observar osteoclastos (setas simples) e osteoblastos (setas duplas) não aparecendo condrócitos positivos. Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásicas (D, E e F) aparecem alguns condrócitos hipertróficos positivos para a MMP-3 (setas), principalmente junto às lesões, em redor da matriz (M). Na imagem F, é ainda possível observar imunomarcção positiva nas zonas de deposição de osteóide (Ost) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].





**Figura 5.18** Imunomarcção para a MMP-10. As imagens A e B referem-se a placas de crescimento normais e em ambas é possível observar alguns condrócitos hipertróficos positivos (setas). Nas placas de crescimento discondroplásicas (C, D, E e F) aparecem bastantes condrócitos hipertróficos positivos para a MMP-10 (setas em D, E e F), principalmente junto às lesões, em redor da matriz acumulada (M); em C, as células positivas acompanham as lesões (delimitadas pelas linhas a tracejado), aparecendo igualmente muitas células negativas e/ou lacunas vazias (setas); em F, podem observar-se alguns condrócitos no interior duma lesão de grande tamanho, delimitada pela linha a tracejado, bem como inúmeras células negativas em redor da lesão [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

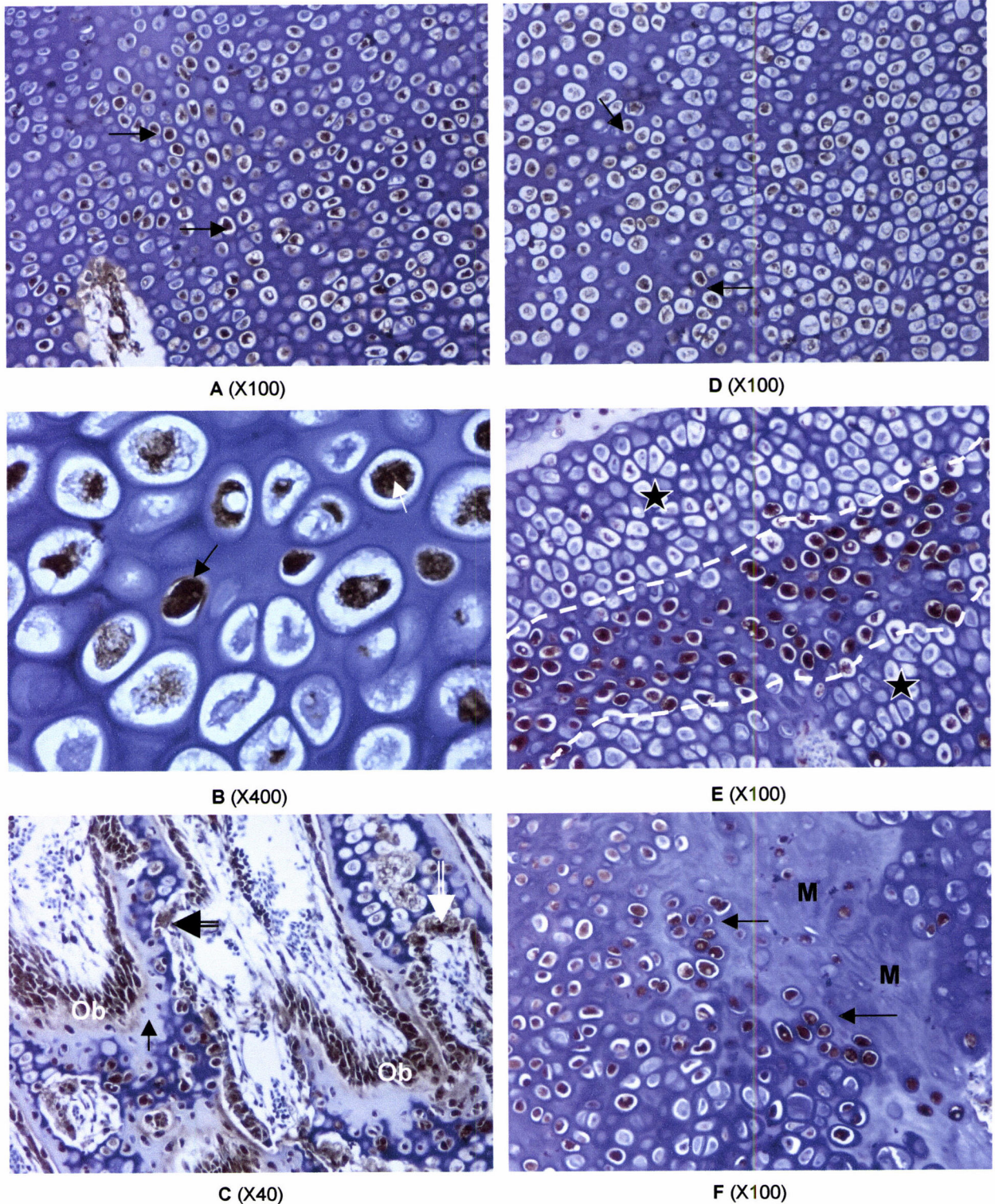




**Figura 5.19** **Imunomarcção para a MMP-11.** As imagens **A** e **B** referem-se a placas de crescimento normais, e em ambas é possível observar alguns condrócitos pré-hipertrofos (CpH) e hipertrofos positivos (setas). Nas placas de crescimento discondroplásicas (**C**, **D**, **E** e **F**), aparecem bastantes condrócitos hipertrofos positivos, principalmente junto às lesões, em redor da matriz (**M**); em **C** e em **E**, há uma clara expressão da MMP-11 nos condrócitos hipertrofos (**CH**), mas não nos condrócitos proliferativos (**CP**); no entanto, em **F** é possível observar, na parte superior direita da imagem, alguns destes condrócitos (setas simples), para além de condrócitos na fase inicial da hipertrofia (seta dupla), positivos para a MMP-11. De salientar que as células positivas acompanham as lesões em toda a sua extensão (delimitada pelas linhas a tracejado em **D**) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

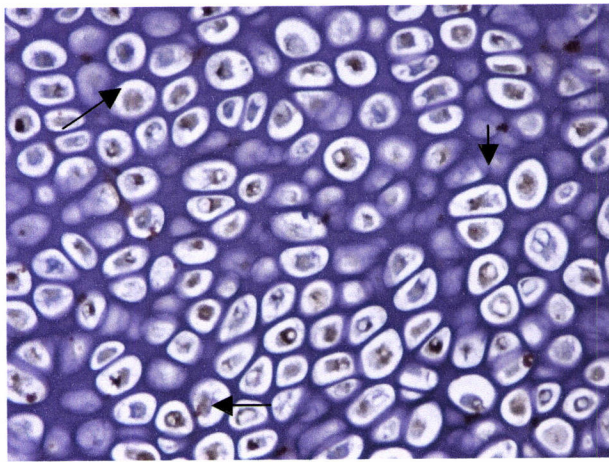




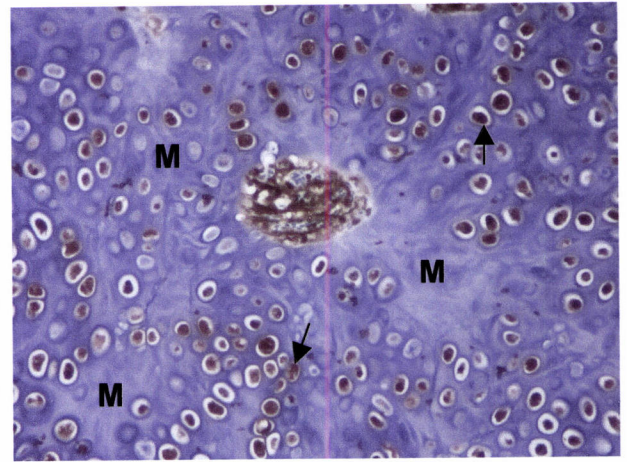


**Figura 5.20** Imunomarcção para a MMP-14. As imagens A, B e C referem-se a placas de crescimento normais e em todas elas é possível observar células positivas: condrócitos hipertróficos (setas), osteoblastos (Ob), osteoclastos (seta dupla) e osteócitos (seta simples). Nas placas de crescimento discondroplásicas (D, E e F) podem observar-se condrócitos hipertróficos positivos para a MMP-14 (setas), principalmente junto às lesões, em redor da matriz (M); em E, as células positivas acompanham a lesão (delimitada pelas linhas a tracejado), aparecendo igualmente muitas células negativas e/ou lacunas vazias (estrelas); em F, pode observar-se que os condrócitos adjacentes à lesão apresentam uma imunomarcção mais intensa (setas) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

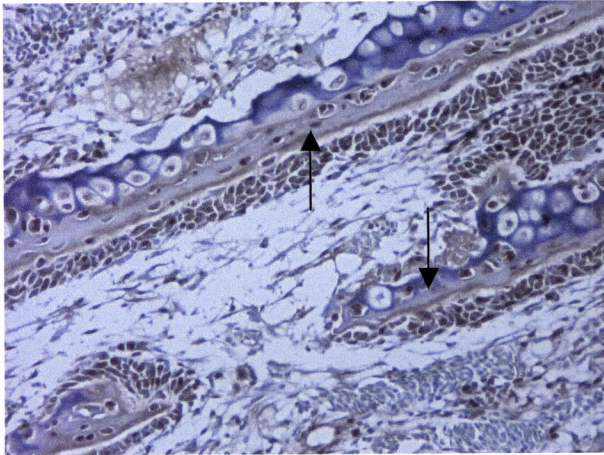




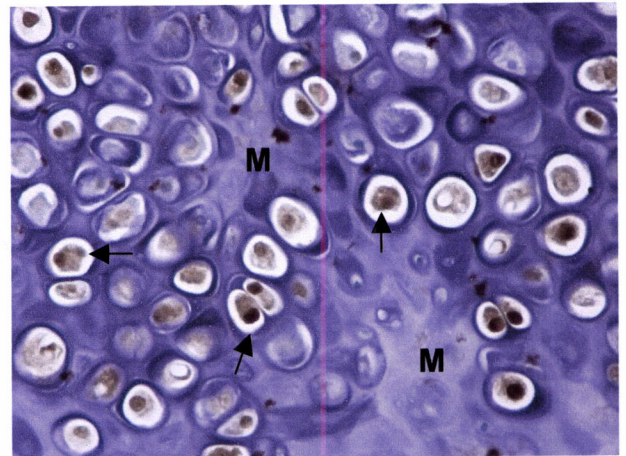
A (X200)



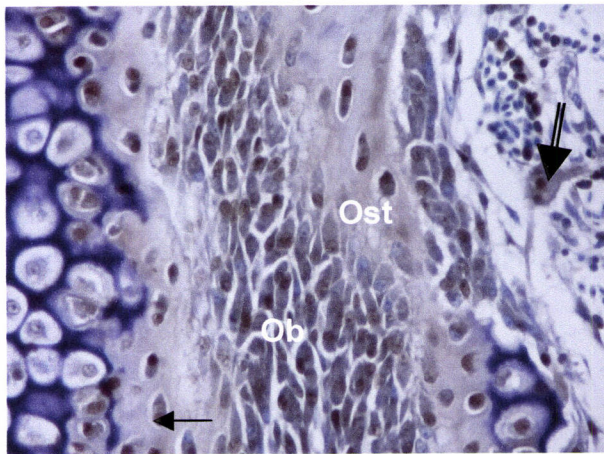
D (X100)



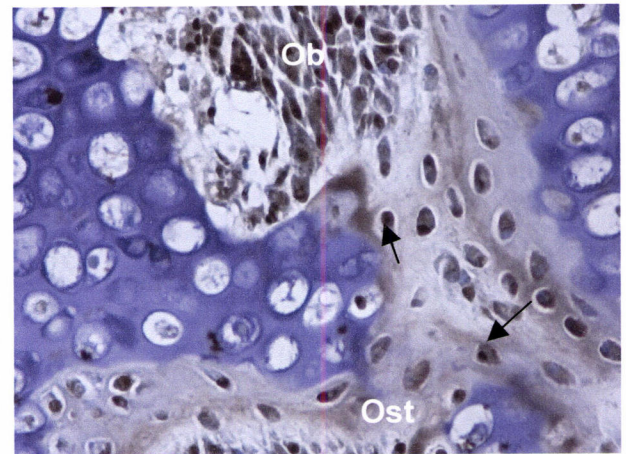
B (X40)



E (X200)



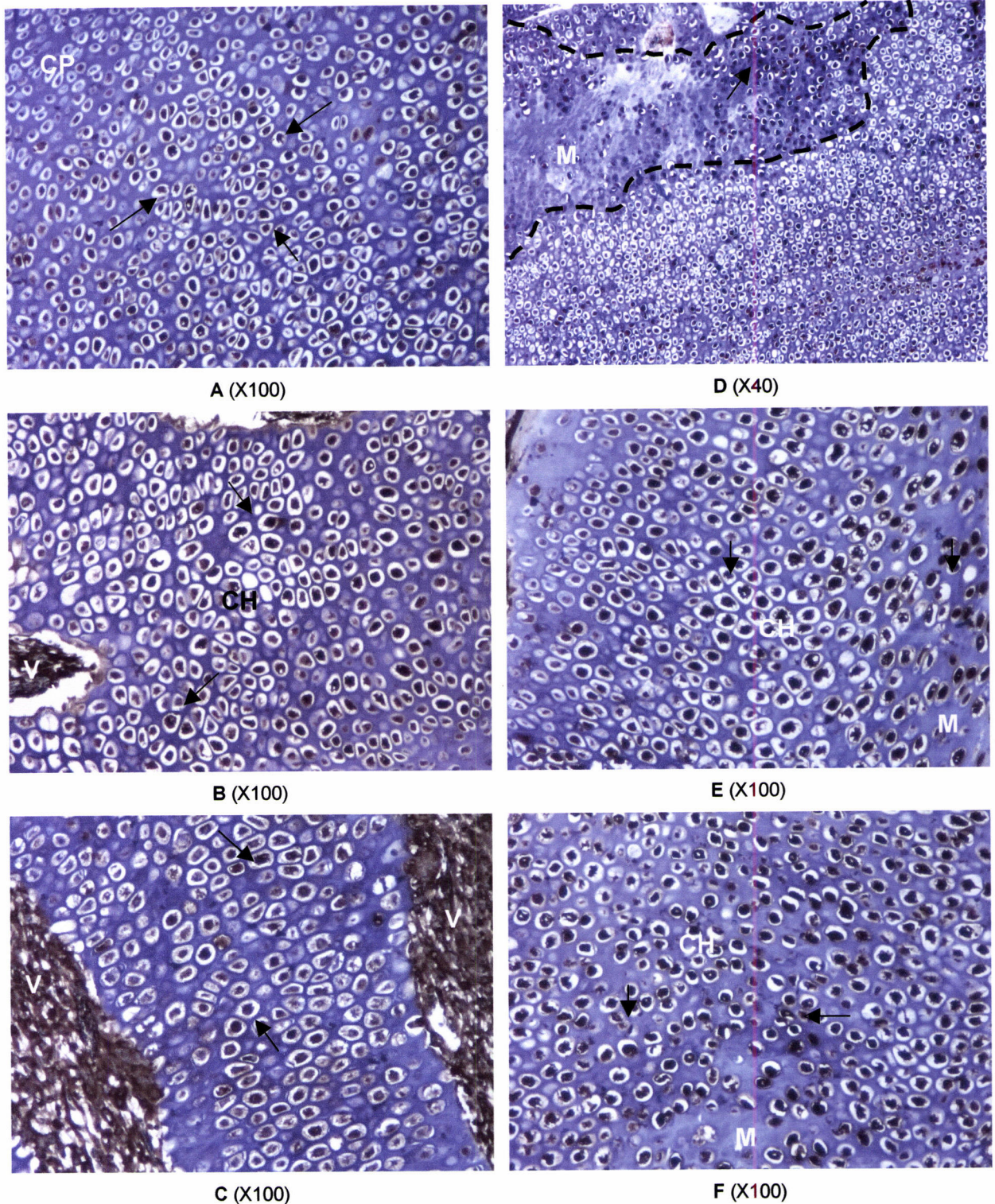
C (X200)



F (X200)

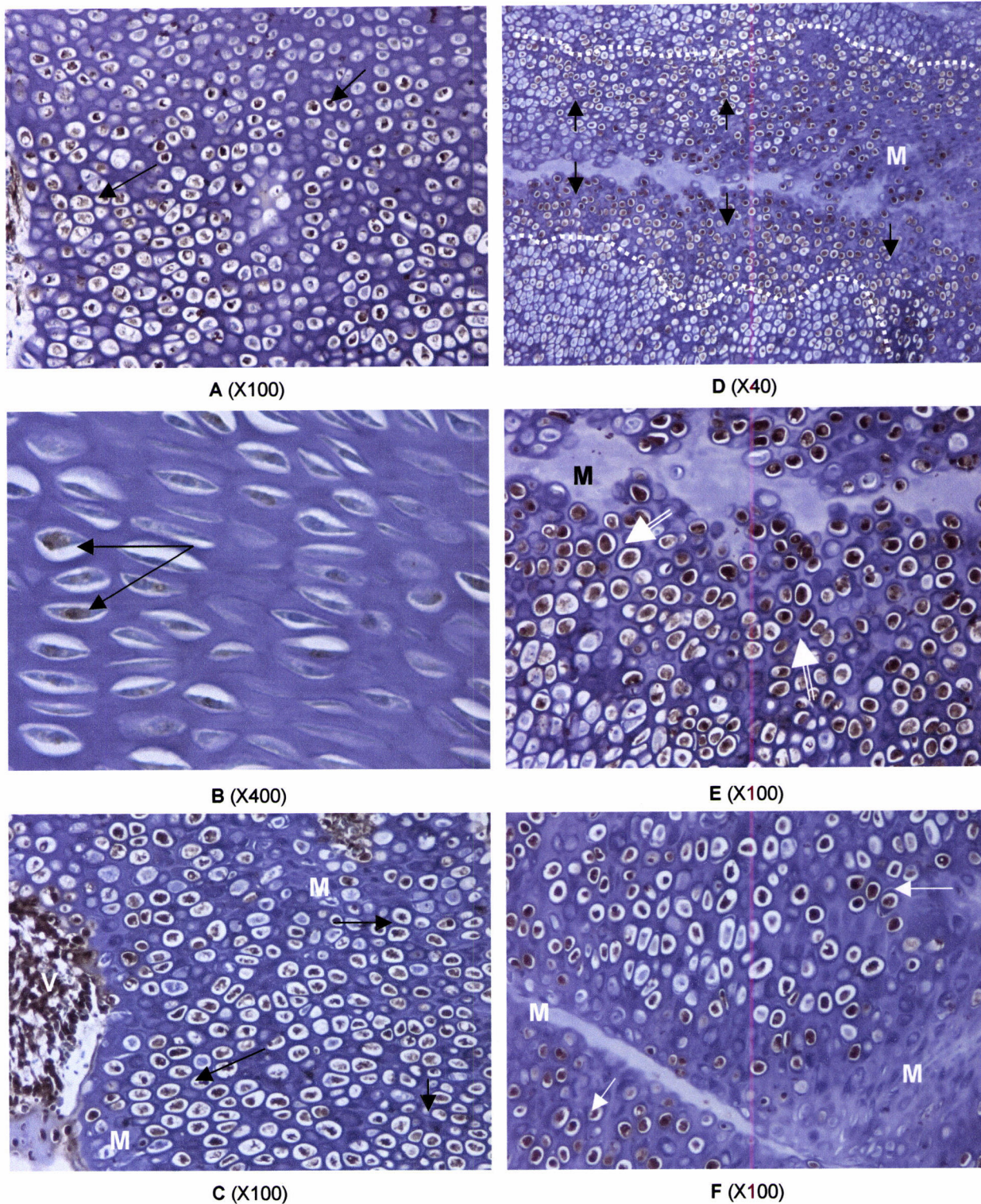
**Figura 5.21** Imunomarcção para a MMP-15. As imagens A, B e C referem-se a placas de crescimento normais e em todas elas é possível observar células positivas: condrócitos hipertróficos (setas), osteoblastos (Ob), osteoclastos (seta dupla) e osteócitos (seta simples), para além duma evidente marcação da superfície das trabéculas ósseas (setas em B). Na imagem C, pode ainda observar-se imunomarcção do osteóide (Ost). Nas placas de crescimento discondróplásicas (D, E e F) podem observar-se condrócitos hipertróficos positivos para a MMP-15 (setas), principalmente junto à acumulação de matriz (M); em F, pode ainda observar-se imunomarcção de osteoblastos (Ob), de osteócitos (setas) e do osteóide (Ost) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].





**Figura 5.22** **Imunomarcção para a MMP-16.** As imagens A e B referem-se a placas de crescimento normais e nelas é possível observar condrócitos positivos (setas) na fase inicial da hipertrofia (em A), e numa fase mais adiantada deste processo (em B); os condrócitos proliferativos (CP) são negativos, e os diferentes tipos celulares presentes nos vasos sanguíneos (V) apresentam uma imunomarcção forte. O padrão de expressão da MMP-16 é similar nas placas de crescimento discondróplásicas (C, D, E e F), com inúmeros condrócitos hipertróficos (CH) positivos (setas), bem como as diferentes populações celulares presentes nos vasos sanguíneos (V); para além disso, a expressão da MMP-16 nos condrócitos hipertróficos (CH) é mais intensa nas zonas de acumulação de matriz (M; delimitada em D, pelas linhas a tracejado) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

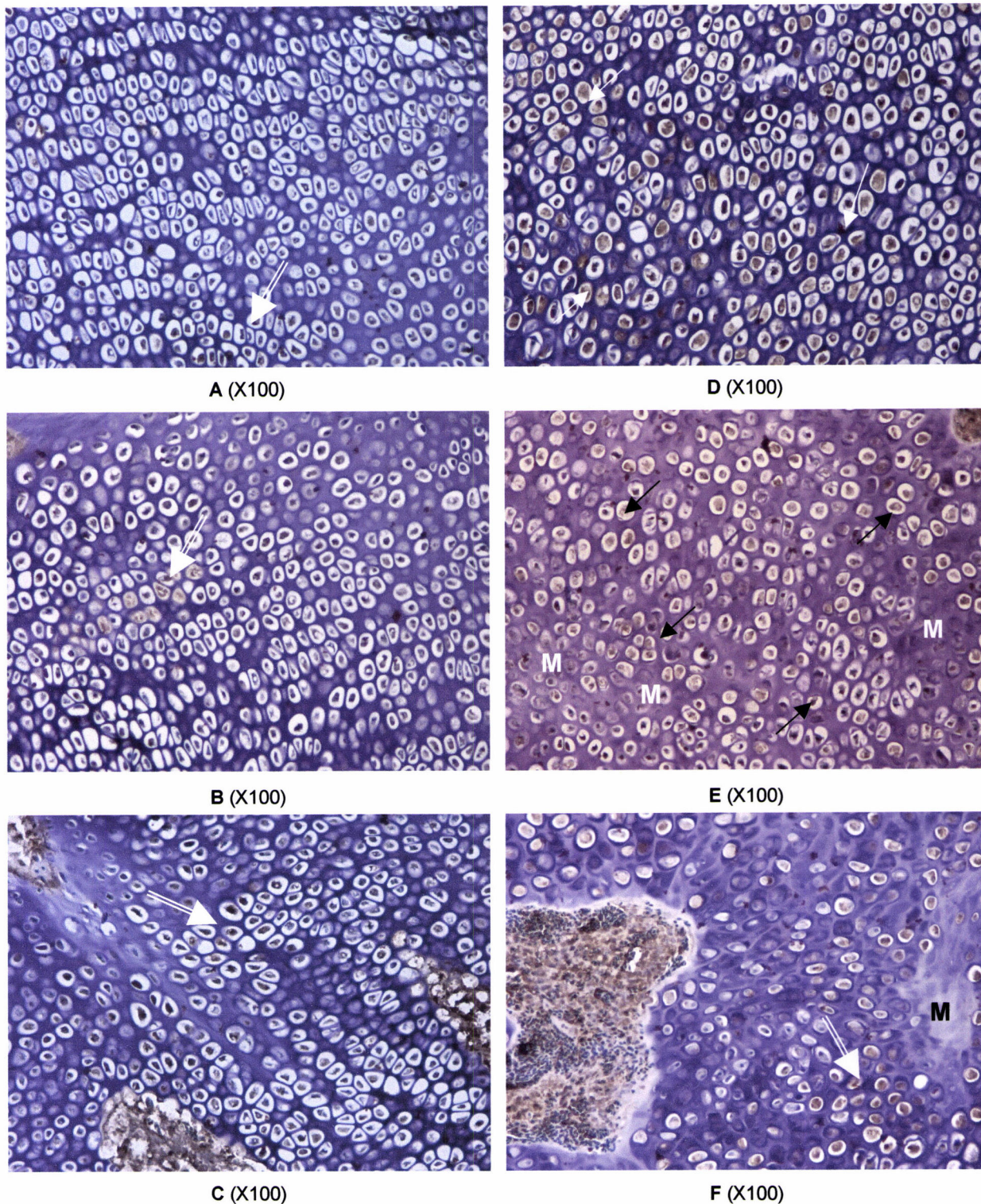




**Figura 5.23** Imunomarcção para a MMP-7. A imagem A refere-se a uma placa de crescimento normal podendo observar-se condrócitos hipertróficos positivos (setas). Nas placas de crescimento discondroplásicas (B, C, D, E e F), é igualmente possível observar condrócitos positivos; em B trata-se de condrócitos proliferativos (setas) e em C, D e F, de condrócitos hipertróficos (setas); os condrócitos hipertróficos junto à matriz (M) apresentam uma imunomarcção mais intensa, bem evidente na imagem D, em que a lesão se encontra delimitada pelas linhas a tracejado; em C, é ainda possível observar imunomarcção positiva nas células presentes nos vasos sanguíneos (V) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].

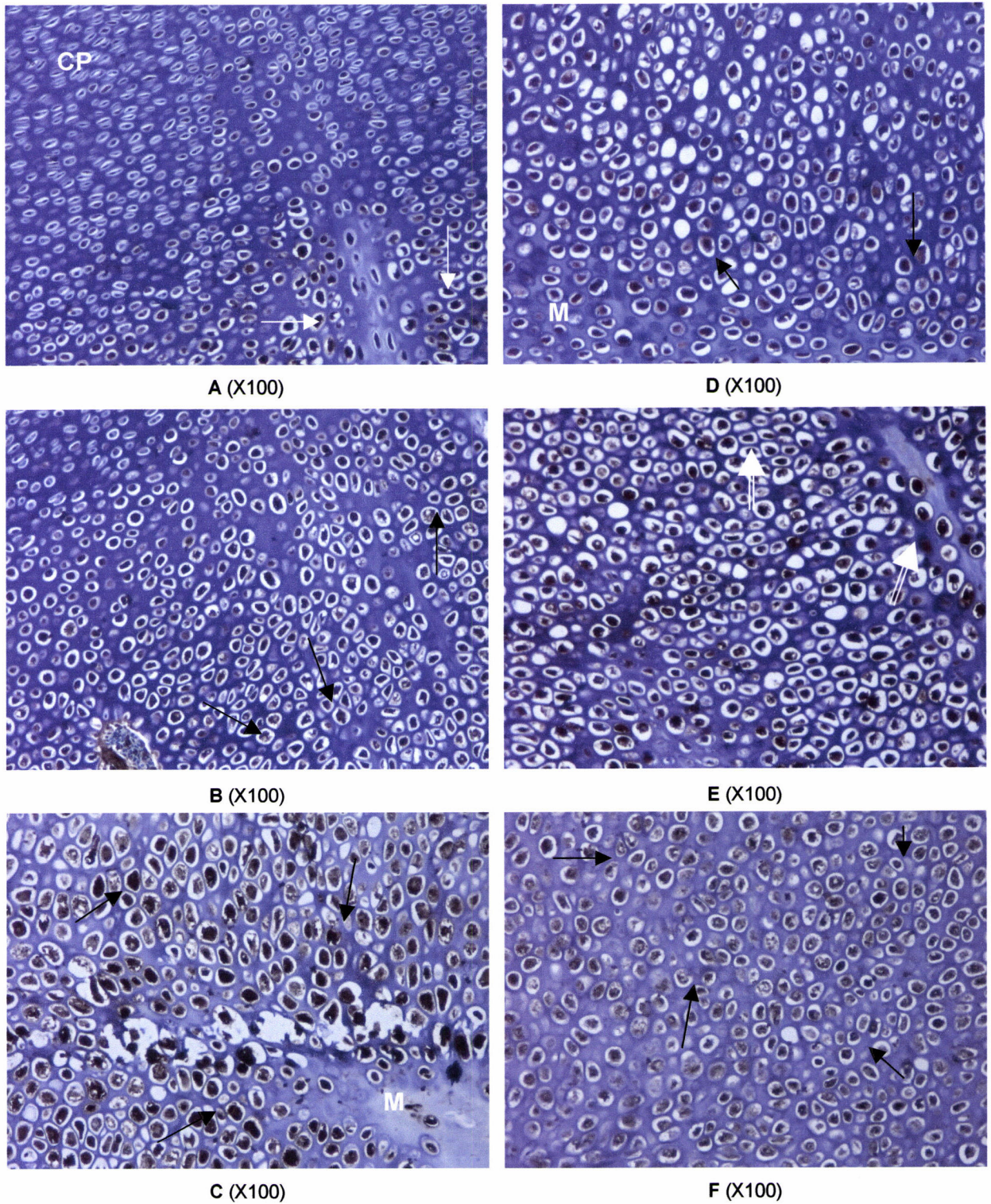






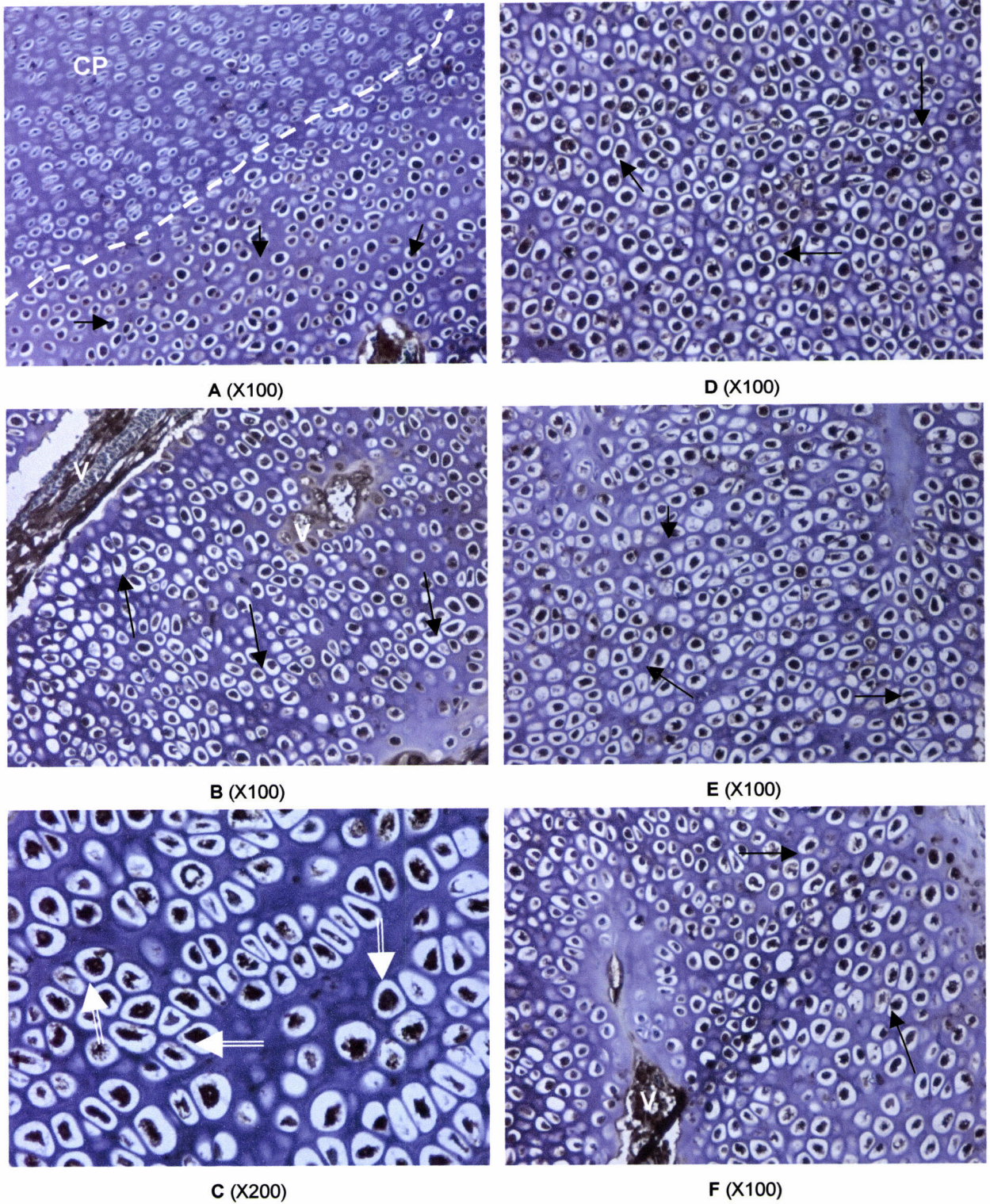
**Figura 5.24** Imunomarcacão para o TIMP-2. As imagens A, B e C referem-se a placas de crescimento normais e em todas elas é possível observar que existem apenas alguns condrócitos hipertróficos positivos (setas) para o TIMP-2. Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásicas (D, E e F) o número deste tipo de células positivas (setas)   claramente mais elevado, tal como os resultados das contagens tinham evidenciado. Curiosamente, pode observar-se um aumento da intensidade de expressão do TIMP-2 nos condrócitos adjacentes   zonas em que existe acumula o de matriz (M) [Contracolora o com Hematoxilina de Mayer].





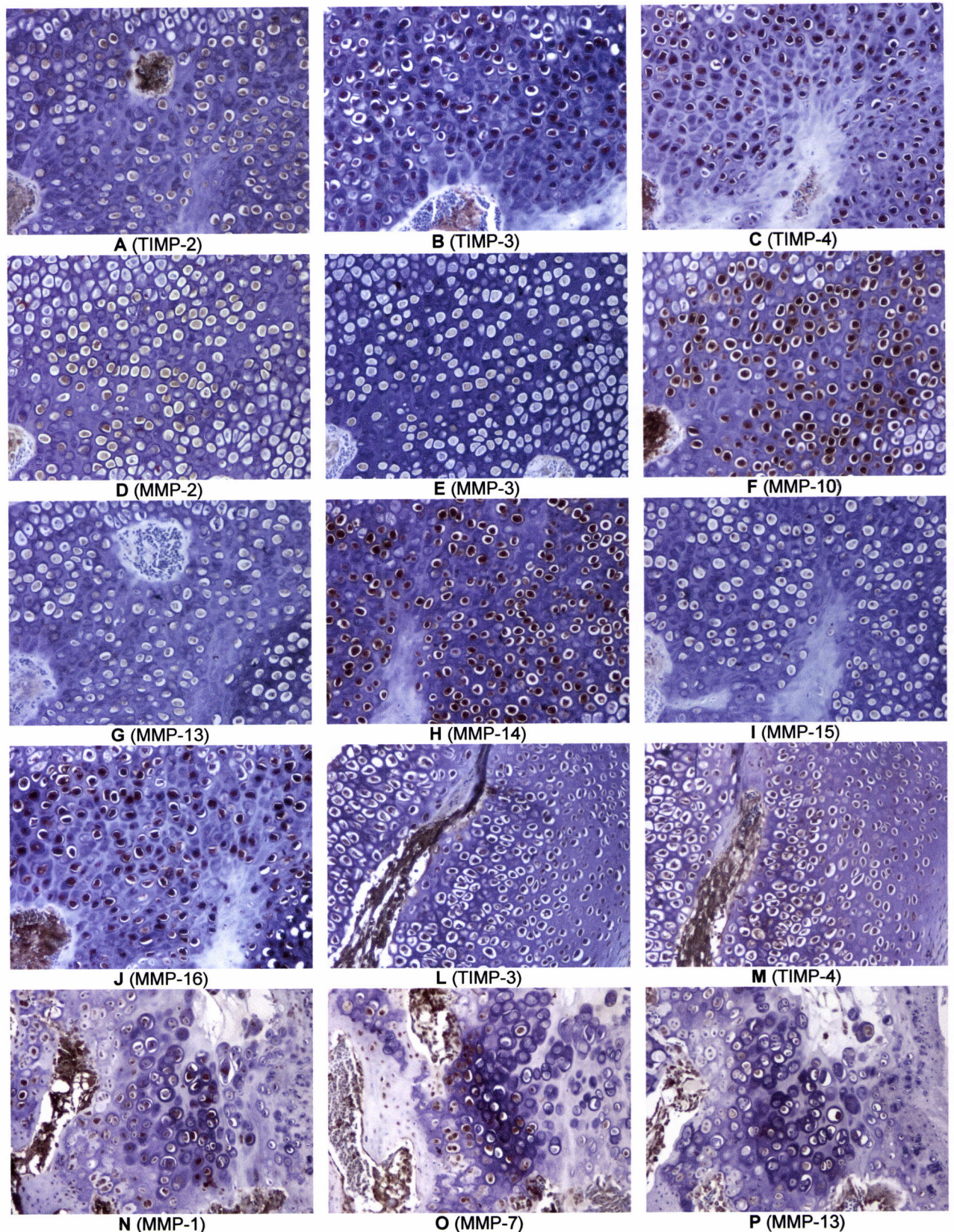
**Figura 5.25** Imunomarcção para o TIMP-3. São bem visíveis inúmeras células positivas em todas as imagens. Embora o padrão de expressão do TIMP-3 seja similar em ambos os tipos de placas de crescimento, nas imagens referentes às placas de crescimento normais (A e B) a intensidade de imunomarcção nos condrócitos hipertróficos (setas) parece ser inferior à do mesmo tipo de células (setas) nas placas de crescimento discondroplásicas (C, D, E e F). De referir ainda que os condrócitos proliferativos (CP, em A) foram negativos para o TIMP-3, e o aumento de intensidade de expressão nos condrócitos adjacentes à zonas em que existe acumulação de matriz (M) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].





**Figura 5.26** Imunomarcção para o TIMP-4. São bem visíveis inúmeras células positivas em todas as imagens. Embora o padrão de expressão do TIMP-4 seja similar em ambos os tipos de placas de crescimento, nas imagens referentes às placas de crescimento normais (A, B e C) a intensidade de imunomarcção nos condrócitos hipertróficos (setas) parece ser menos intensa que a do mesmo tipo de células (setas) nas placas de crescimento discondroplásicas (D, E e F). De referir ainda que os condrócitos proliferativos (CP, em A) foram negativos para este TIMP, e para a imunomarcção positiva de vários tipos celulares presentes nos vasos (V) [Contracoloração com Hematoxilina de Mayer].





**Figura 5.27** Imunomarcacão para as MMPs e para os TIMPs. Neste conjunto de imagens, obtidas em secoes seriadas das mesmas placas de crescimento,  possível observar que as mesmas células expressam diferentes marcadores, ainda que com graus de intensidade diferentes. As imagens A a J correspondem a uma placa de crescimento discondroplásica, as imagens L e M a uma placa de crescimento normal e as imagens N, P e O a uma outra placa de crescimento discondroplásica [X100; Contracoloraco com Hematoxilina de Mayer].





## 5.4 Discussão

Os ditiocarbamatos, como é o caso do tirame, são uma importante classe de compostos, contendo enxofre e um grupo tiol que exibem actividades químicas e biológicas complexas. Os ditiocarbamatos são largamente utilizados na agricultura como antifúngicos, herbicidas e pesticidas, quer em administração foliar directa, quer no tratamento de sementes, frutos e produtos hortícolas, e como repelente de roedores (Extonet, 2003). São igualmente utilizados em medicina humana, em quimioterapia (Scozzafava et al, 2000), no tratamento do alcoolismo (Kranzler, 2000), como antídoto em situações de intoxicação por metais (Tandon et al, 1997) e no tratamento experimental da Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida (Topping e Jones, 1988).

No que diz respeito ao tirame, a sua toxicidade está avaliada para várias espécies animais (ver Dalvi, 1988; Extonet, 2003). Alguns trabalhos sugerem que, muito provavelmente, o metabolismo do tirame desempenha um importante papel na sua toxicidade (ver Dalvi, 1988). Têm sido propostos vários mecanismos para explicar os efeitos tóxicos deste químico. A formação de quelatos com importantes elementos, como o cobre e o zinco, cofactores essenciais de inúmeras enzimas, é um dos principais mecanismos de acção dos ditiocarbamatos (Dalvi, 1988), podendo ter, em situações diferentes, efeitos anti e pro-oxidantes (Bartoli et al, 1983; Izumi et al, 1994). Por outro lado, e de acordo com Rath et al (1995), a citotoxicidade do tirame é devida, muito possivelmente, ao seu efeito na membrana celular, tornando-a susceptível à perda de componentes celulares. Estudos toxicológicos mostraram que o tirame, e outros ditiocarbamatos, são metabolizados, *in vivo*, em carbono dissulfido (Dalvi, 1988), o qual, por sua vez, pode modificar as proteínas celulares e formar produtos de aducção da lisina (DeCaprio et al, 1992), alterando, assim, as proteínas da membrana celular e causar a sua agregação. No entanto, apenas uma pequena quantidade de tirame é recuperado como carbono dissulfido, quando comparado com outros ditiocarbamatos (Edwards et al, 1991 cit por Rath et al, 1995). Embora em concentrações elevadas o tirame seja claramente citotóxico para os condrócitos, em baixas concentrações os seus efeitos parecem ser menos pronunciados. Por outro lado, e embora a susceptibilidade dos vários tipos celulares ao tirame seja variável, o efeito citotóxico parece ser inespecífico (Rath et al, 1995). De acordo com Rath et al (1995), pelo menos aparentemente, não houve agregação, ou qualquer diferença significativa na migração das proteínas celulares condrocitárias, entre os grupos controlo e de exposição ao tirame, excepto o aparecimento de uma banda de proteínas, a que correspondeu a massa molecular de ~85kD, em resposta ao químico, provavelmente relacionada com algumas proteínas de *stress*. Contudo, em doses letais, o tirame mostrou ser capaz de provocar, *in vivo*, a disrupção da integridade da membrana celular, através da peroxidação dos lípidos (Gupta et al, 1993), pelo que este, pode ser o seu principal modo de acção (Rath et al, 1995).

Embora um grande conjunto de dados descrevendo as características morfológicas e bioquímicas da discondroplasia tenha sido reunido, existe ainda pouca informação que demonstre inequívoca e directamente o mecanismo responsável pela formação das lesões discondroplásicas. Por exemplo, a disrupção física da vascularização metafisária resulta na formação de lesões muito similares às da discondroplasia (Trueta e Amato, 1960; Kleinman et al, 1991). Contudo, e embora uma das características das lesões discondroplásicas seja a ausência de vascularização, segundo Praul et al (2000) não parece que a discondroplasia esteja associada com uma interrupção traumática dos vasos sanguíneos. No entanto, alguns dados do presente trabalho sugerem que, pelo menos em parte, um mecanismo deste tipo possa estar envolvido no estabelecimento das lesões (ver adiante, em “vascularização”). Outra das características da discondroplasia é a acumulação de cartilagem, mas enquanto vários trabalhos (Lawler et al, 1985, 1988; Thorp et al, 1993) dão indicações que esta não está associada com um decréscimo de actividade dos mecanismos responsáveis pela sua reabsorção, outros (Bai et al, 1992; Rath et al, 1997) sugerem exactamente o contrário.

Quanto ao modo de acção dos ditiocarbamatos na indução da discondroplasia, os resultados, *in vitro*, de Rath et al (1995), sugerem que o tirame exerce um efeito citotóxico nos condrócitos, provocando a sua morte, provavelmente devido a danos causados ao nível da membrana. É possível que a acumulação crónica do tirame e dos seus metabolitos activos nos espaços sinoviais, possa facilitar a sua acção na cartilagem em desenvolvimento. Por outro lado, as propriedades lipofílicas do tirame podem facilitar a sua retenção nos tecidos adiposos, bem como nos espaços sinoviais, devido a uma redução na taxa de remoção, exercendo, assim, os seus efeitos citotóxicos e modificadores da membrana celular, e que resultam no aparecimento de lesões discondroplásicas. A interferência no metabolismo de alguns minerais é outra das hipóteses avançadas. Com efeito, o facto de poedeiras em postura, alimentadas com rações contaminadas com tirame porem uma elevada percentagem de ovos com deficiente calcificação da casca (Guitart et al, 1996; Capela e Silva, 2002, *dados não publicados*), o facto da diminuição nos valores dos parâmetros mecânicos do tibiotarso, nos animais a quem foi administrado tirame, darem indicações dum decréscimo geral da mineralização dos ossos (Wu et al, 1990), e ainda o facto dos níveis séricos de cálcio em codornizes, após exposição crónica a tirame (Wedig et al, 1968), fazem supor que este químico possa exercer a sua acção ao nível do metabolismo do cálcio. Edwards (1987), sugere uma eventual formação de quelatos de cálcio, diminuindo, assim, a biodisponibilidade deste ao nível do tracto gastrintestinal, podendo, esta diminuição, estar associada com o desenvolvimento da discondroplasia. Por outro lado, existem trabalhos que demonstram que dietas com níveis elevados de cobre evitam, parcial, ou totalmente, o desenvolvimento da discondroplasia induzida pelos ditiocarbamatos (Wu et al, 1990), o que não se consegue no caso da discondroplasia espontânea (Cook et al, 1994) nem na discondroplasia induzida pela cisteína (Bai et al, 1994). Deste modo, e segundo Cook et al (1994), essa acção traduzir-se-ia num decréscimo na biodisponibilidade do cobre ao nível do tracto gastrintestinal. Existem várias enzimas, distribuídas por todo o organismo, que

necessitam de cobre para levarem a cabo uma variedade de processos biológicos essenciais (Abdel-Mageed e Oehme, 1990; Prohaska, 1990; Barceloux, 1999; ExPASy, 2000), e que incluem, entre outros, a catálise de reacções de oxidação/redução e a protecção, ao nível celular, de agressões e danos oxidativos. São disso exemplo, as enzimas cobre/zinco-superóxido dismutase (Eide, 1998; Iskra e Majewski, 1999; Ciriolo et al, 2000; Takahashi et al, 2000) e a ceruloplasmina (Saenko et al, 1994). Por outro lado, a maturação dos tecidos conjuntivos, processo necessário para o adequado estabelecimento de reticulados de elastina e de colagénio, durante o desenvolvimento, a manutenção e a reparação destes tecidos, é mediada através da lisil-oxidase (Farquharson et al, 1989; Smith-Mungo e Kagan, 1998). Os resultados obtidos por alguns autores (Bridges e Harris, 1988; Woodbury et al, 1999), sugerem que a deficiência em cobre leva ao desenvolvimento da discondroplasia em mamíferos, devido à inadequada actividade da lisil-oxidase. Igualmente interessante, é o facto da actividade da ceruloplasmina ser normal nos animais com discondroplasia espontânea (Lilburn e Leach, 1980), enquanto que se verifica a sua redução nos animais com discondroplasia induzida pelo tirame (Wu et al, 1990). Existem evidências da inibição da vascularização por vários ditiocarbamatos (Yoshida et al, 1999; Marikovsky et al, 2000; Marikovsky, 2002). Marikovsky (2002) e Marikovsky et al (2000), por exemplo, sugerem que a acção do tirame e do disulfiram, respectivamente, se faz sentir ao nível da actividade da Cu/Zn superóxido-dismutase, enzima importante no processo de angiogénese. Por outro lado, Sen et al (2002) observaram um aumento da expressão do VEGF por acção do cobre, e sabe-se que o bloqueio da sinalização do VEGF (Gerber et al, 1999) resulta na indução de lesões similares às da discondroplasia. Adicionalmente, e segundo Strause et al (1987), os efeitos, a longo prazo, de uma deficiência prolongada em cobre, incluem um decréscimo na osteogénese e na actividade dos osteoclastos. Dado que os ditiocarbamatos, como se disse, são quelantes de metais pesados, por um lado, e dado que a discondroplasia se caracteriza por uma falha na vascularização e por um decréscimo na reabsorção da cartilagem, por outro, seria interessante investigar uma eventual correlação entre estes fenómenos. No entanto, a quelatação do cobre como possível mecanismo de acção dos ditiocarbamatos, é contrariada pelo facto de outros potentes quelantes de metais não induzirem a discondroplasia (Cook et al, 1994). Por outro lado, os valores dos indicadores clássicos dos níveis de cobre (actividade da superóxido-dismutase, nível de cobre no sangue ou no osso, hematócrito) não são afectados pela ingestão de ditiocarbamatos, não resultando numa situação generalizada de deficiência em cobre (Wu et al, 1990, 1993; Cook et al, 1994). Como foi referido anteriormente, os resultados de vários trabalhos fazem supor que a acção do tirame possa ser exercida ao nível do metabolismo do cálcio. Edwards (1987), sugere uma eventual formação de quelatos de cálcio, diminuindo, assim, a biodisponibilidade deste ao nível do tracto gastrintestinal, podendo, esta diminuição, estar associada com o desenvolvimento da discondroplasia. Quanto à acção do tirame gostaríamos ainda de referir os resultados obtidos por nós próprios (Capela e Silva, 2002, *dados não publicados*), num ensaio em que, utilizando óleo de milho como veículo de administração, fornecemos tirame, por intubação gástrica, durante os 21 dias do ensaio, na

dose diária de 50 mg/Kg de peso vivo. Curiosamente, dos 30 animais do grupo experimental, apenas um desenvolveu lesões discondroplásicas. Já tínhamos feito referência ao trabalho de Watkins et al (1991), os quais observaram que o óleo de soja hidrogenado, que contém ácidos gordos *trans*, fez aumentar a gravidade e a incidência de lesões discondroplásicas, aquando da substituição do óleo de soja não hidrogenado nas dietas de frangos de carne. Segundo estes autores, o modo de acção dos ácidos gordos *trans* parece estar relacionado com uma eventual inibição da biossíntese de prostaglandinas, contribuindo, assim, para a ocorrência das lesões. O modo de acção do tirame pode ser do mesmo tipo, tendo este sido contrariado por alguns dos constituintes do óleo de milho, que, como se sabe, são precursores das prostaglandinas (Watkins, 1998), e estas, por sua vez desempenham um importante papel no metabolismo dos condrócitos (O'Keefe et al, 1992). A este respeito, são interessantes os trabalhos de Barnea et al (1985), em tecido nervoso, cujos resultados sugerem que o cobre extracelular pode servir como modulador da acção da prostaglandina PGE<sub>2</sub>, e os trabalhos de Ziche et al (1982), segundo os quais, a produção da prostaglandina PGE<sub>1</sub> e a mobilização de cobre são eventos fundamentais para a ocorrência da vascularização da córnea. Todavia, fica em aberto a hipótese do óleo de milho interferir directamente no metabolismo do tirame e, por essa razão, não ser o veículo de administração mais adequado. Convém no entanto referir que, em mamíferos, o óleo de milho é utilizado com essa finalidade quando se utiliza o tiram ou outros ditiocarbamatos (Rafael et al, 2000). Ainda quanto ao efeito destes químicos, Suzuki et al (2000, 2001), induziram malformações no esqueleto cartilágneo de embriões de solha através da exposição destes a disulfiram. Estes autores sugerem que o disulfiram afecta a síntese de proteoglicanos e a maturação de colagénio, através do bloqueio da ascorbato desidrogenase, interferindo, assim, no metabolismo do ácido retinóico, o qual regula múltiplas e importantes actividades metabólicas dos condrócitos (Shapiro et al, 1991). Por outro lado, estes autores sugerem, ainda, que o disulfiram pode exercer efeitos secundários na actividade da prolil-hidroxilase, enzima que desempenha um importante papel no desenvolvimento da cartilagem e dos ossos cartilágneos (Annunen et al, 1998).

Analise agora, cada uma das imunomarcações em separado, tentando, no capítulo 6 (Discussão Geral), fazer a integração dos resultados obtidos, de modo a avaliar o modelo experimental tirame no estudo da discondroplasia.

#### **5.4.1 Proliferação celular**

##### **PCNA**

Embora seja um marcador de proliferação celular, o PCNA pode igualmente ser expresso em associação com a reparação de DNA e, também, muito possivelmente devido à sua longa semi-vida, nas células noutros estádios de diferenciação, como foi demonstrado por coloração PCNA em condrócitos hipertróficos de placas de crescimento normais de coelho (Aizawa et al,

1997). O PCNA está disponível como um índice do incremento das células e expressa-se da parte final da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Hall et al, 1990). A divisão activa das células ocorre na parte proximal da zona de proliferação e muitos condrócitos nesta zona estão na fase S (Breur et al, 1994; Wilsman et al, 1996). Contudo, Aizawa et al (1997) raramente encontraram condrócitos PCNA-positivos na parte proximal da zona de proliferação tendo sido encontrados na parte superior da zona de hipertrofia. Deste modo, alguns condrócitos na fase S podem não corar positivamente, e algumas células que não estão na parte final da fase G1 para a fase S, podem corar positivamente, pelo que esta poderá ser uma explicação para a aparente contradição encontrada pelos diferentes autores. Esta ausência de especificidade sugere que os resultados PCNA devem ser analisados com alguma precaução como um marcador definitivo de células em proliferação (Yu e Filipe, 1993).

Ainda assim, o PCNA tem sido usado em vários estudos de proliferação. Segundo Pines et al (1998), através de imunomarcagem PCNA, os primeiros eventos na discondroplasia ocorrem devido a uma alteração no controlo espacial e temporal da proliferação celular, o que pode ser devido a uma expressão anormal dos factores de crescimento. De acordo com estes autores, usando linhas para baixa e elevada incidências de discondroplasia espontânea, os primeiros eventos das lesões ocorrem em células com fenótipo proliferativo no interior da zona de hipertrofia, os quais se dividem e formam a lesão, não expressando os genes associados com a hipertrofia. A anomalia na proliferação tem início num local discreto, uma vez que na maioria dos casos as lesões foram unilaterais. Por outro lado, não foi encontrada associação entre as lesões e o centro secundário de ossificação, o que também sugere que a lesão ocorre numa localização discreta. Os resultados de Pines et al (1998) sugerem uma elevada taxa de proliferação na zona de hipertrofia, empurrando os condrócitos hipertróficos para posições proximais e distais das lesões. Resultados semelhantes foram encontrados por Ahmed et al (1995) em ratos mutantes *Tich*, que observaram uma correlação positiva entre o aparecimento das lesões com um incremento da divisão celular na região central da zona de hipertrofia. Em estudos similares, mas utilizando como marcador de proliferação o BrdU, Farquharson et al (1992) não observaram diferenças marcantes na proliferação dos condrócitos entre placas de crescimento normais e discondroplásicas moderadas. Os nossos resultados estão de acordo com os resultados destes últimos autores, não sendo significativas as diferenças encontradas, entre as percentagens de condrócitos proliferativos entre as placas de crescimento normais (21,2%), e as placas de crescimento discondroplásicas (20,7%). Estes resultados sugerem, assim, que um eventual incremento na taxa de proliferação não é o mecanismo responsável para a acumulação de cartilagem observada na discondroplasia. Em nossa opinião seria mesmo de esperar um ligeiro decréscimo na taxa de proliferação nas placas de crescimento discondroplásicas, pois a acumulação de cartilagem, muito provavelmente, impede a normal proliferação dos condrócitos. Farquharson et al (1992) observaram este efeito em placas de crescimento discondroplásicas com lesões graves.

### *c-myc*

A proteína *c-myc* é um factor de transcrição envolvido no controlo da proliferação e da diferenciação celular, na apoptose e em todos os processos básicos da embriogénese (Piedra et al, 2002). A *c-myc* está associada ao núcleo e é codificada pelo proto-oncogene *c-myc* (Farquharson et al, 1992). Nas células quiescentes existe muito pouca *c-myc* (Aizawa et al, 1999). Quando as células recebem os sinais mitogénicos e começam a proliferar, a expressão da *c-myc* é rapidamente desencadeada e a proteína pode ser observada no núcleo (Bai et al, 1994). Pelo contrário, à medida que as células se diferenciam, a expressão da *c-myc*, geralmente, começa a diminuir (Meichle et al, 1992). Deste modo, a *c-myc* parece estar ligada a estímulos mitogénicos e à proliferação celular (Farquharson e Jefferies, 2000), acelerando a passagem através da fase G1 do ciclo celular (Fuhrmann et al, 1999). Por outro lado, a expressão constitutiva induzida desta proteína previne a diferenciação terminal (Iwamoto et al, 1993; Quarto et al, 1992) e, na ausência de factores de crescimento, induz a apoptose (Evan et al, 1995; Gibson et al, 1995). Contudo, vários investigadores referem que a regulação da expressão do *c-myc* e a síntese de DNA estão desligadas e que a diferenciação de algumas linhas celulares não é acompanhada por um simples decréscimo na expressão da *c-myc* (Farquharson e Jefferies, 2000). Por outro lado, níveis elevados da proteína *c-myc* foram observados em determinado número de células em diferenciação *in vivo*, designadamente células das criptas do cólon (Stewart et al, 1986), epitélio ocular (Nath et al, 1987) e nos condrócitos da placa de crescimento (Farquharson et al, 1992). Alguns trabalhos mostraram que a *c-myc* está localizada nos condrócitos em proliferação e na parte superior da zona de hipertrofia, pelo que se acredita que a expressão desta proteína na placa de crescimento possa estar associada com a proliferação e a diferenciação celulares (Farquharson et al, 1992; Loveridge et al, 1993; Weng et al, 2002). A *c-myc* participa igualmente na diferenciação (Battaglino et al, 2002) e na regulação (Daumer et al, 2002) dos osteoclastos, é expressa pelos osteoblastos (Ren et al, 1992) e, em processos de reparação de fracturas, Oni (2000) observou a sua expressão nas células osteogénicas do perióstio, do endóstio, dos canais de Havers e nas novas trabéculas ósseas.

No presente trabalho, e ao contrário do que seria de esperar, foi observada a expressão nalguns condrócitos da zona de repouso, o que, no entanto, está de acordo com os resultados de outros trabalhos (Farquharson et al, 1992; Aizawa et al, 1999; Weng et al, 2002). Uma vez que a expressão da *c-myc* aumenta rapidamente quando as células quiescentes são estimulados a proliferarem (Farquharson et al, 1992), a sua presença nesta zona pode querer dizer que estas células receberam estímulos mitóticos. Aizawa et al (1999) observaram, em placas de crescimento de coelhos, a expressão da *c-myc* na zona de proliferação e na parte superior da zona de hipertrofia às 5 semanas de idade, enquanto às 10 semanas essa mesma expressão foi fundamentalmente observada na parte inferior da zona de hipertrofia. Enquanto os condrócitos em proliferação exibiam uma marcação nuclear, nas células hipertróficas essa

marcação era citoplasmática, embora alguns condrócitos hipertróficos terminais, por vezes, expressassem igualmente marcação nuclear. Nos animais mais novos a *c-myc* foi co-localizada com o PCNA, enquanto na zona de hipertrofia dos animais mais velhos a *c-myc* encontrava-se presente no núcleo de algumas células que apresentavam igualmente quebras de DNA, o que sugere um estado apoptótico. Estes resultados sugerem que na placa de crescimento de coelhos, a *c-myc* está associada com processos celulares diferentes, dependendo da idade dos indivíduos e do estágio de desenvolvimento dos condrócitos. Por seu lado, Wang et al (1997) observaram, em ratos, uma intensa imunomarcação nuclear nos condrócitos proliferativos. Essa marcação diminuiu nos núcleos dos condrócitos maduros e aparece no citoplasma. A imunorreacção aumentou nos condrócitos hipertróficos completamente diferenciados, mas foi baixa nos condrócitos hipertróficos no final da hipertrofia. Em cultura de células de condrócitos de embriões de galinha, as células em proliferação expressam a *c-myc* como factor de transcrição, cuja sobre-expressão previne a maturação (Iwamoto et al, 1993; Quarto et al, 1992), o que sugere que uma das funções desta proteína é manter os condrócitos num estado proliferativo. No presente trabalho, não parecem existir diferenças nos índices de células positivas para a proteína *c-myc* nos condrócitos proliferativos das placas de crescimento normais e discondroplásicas, tal como observado por Loveridge et al (1993). Pelo contrário, nas placas de crescimento discondroplásicas, o número relativo de condrócitos hipertróficos positivos é significativamente reduzido em comparação com as células de igual fenótipo nas placas de crescimento normais, resultados igualmente obtidos por Farquharson e Jefferies (2000), utilizando o modelo cálcio. Estes resultados estão de acordo com o que seria de esperar, uma vez que uma das características da discondroplasia é a falha na completa diferenciação dos condrócitos. Loveridge et al (1993) sugerem que os passos iniciais na diferenciação dos condrócitos são caracterizados por um incremento na proteína *c-myc* e estes autores propuseram uma possível ligação entre a *c-myc*, o TGF- $\beta$  e a 1,25-D no processo de diferenciação dos condrócitos (Loveridge et al, 1992). Sabe-se que a 1,25-D regula a diferenciação dos condrócitos e modula a expressão do TGF- $\beta$  e da *c-myc*, enquanto esta altera a expressão dos receptores para a vitamina D. Esta relação sugere que a *c-myc* e o TGF- $\beta$  são componentes essenciais da cascata de sinal, regulada pela 1,25-D nos condrócitos da placa de crescimento (Farquharson e Jefferies, 2000). Níveis reduzidos da proteína *c-myc* podem estar igualmente relacionados com a falha na mineralização que se verifica na discondroplasia (Farquharson e Jefferies, 2000). A mineralização da matriz da placa de crescimento é mediada pelas acções das vesículas da matriz (Anderson, 1995) que são formadas por uma série de processos, que podem incluir apoptose (Akisaka e Gay, 1985). Com efeito, a proteína *c-myc* é um potente indutor da apoptose, e um decréscimo na sua concentração pode levar a uma diminuição na síntese das vesículas da matriz e falhas na mineralização (Farquharson e Jefferies, 2000). Evidências que suportam esta hipótese foram fornecidas por Nie et al (1995), os quais demonstraram que na discondroplasia existem anomalias na formação das vesículas da matriz. Farquharson et al (1992) localizaram imunohistoquimicamente a proteína *c-myc* em todos os condrócitos da placa de crescimento

em galinha e em rato com uma marcação mais intensa nos condrócitos em proliferação e em diferenciação. Estes autores observaram ainda um paralelismo entre a expressão do *c-myc* e do BrdU, o que sugere um papel importante da *c-myc* na proliferação e o seu envolvimento na diferenciação e/ou hipertrofia dos condrócitos (Farquharson et al, 1992). Os nossos resultados estão de acordo com os resultados de Loveridge et al (1993) os quais, utilizando o modelo Ca, também observaram nas placas de crescimento discondroplásicas uma redução na expressão do *c-myc* nos condrócitos de transição. Nas áreas de reparação das lesões verificaram, tal como nós, um incremento na expressão do *c-myc*. Estes resultados sugerem que o proto-oncogene *c-myc* é um dos elementos importantes no conjunto de eventos associados à diferenciação e à hipertrofia dos condrócitos e à mineralização da matriz (Loveridge et al, 1993). Relativamente a este evento, é de salientar que Toury et al (1999) observaram imunomarcagem para a *c-myc* nas áreas de calcificação da matriz da cartilagem. A imunomarcagem ocorreu essencialmente junto das fibrilas de colagénio II, o que realmente sugere que o proto-oncogene *c-myc* pode estar implicado no processo de calcificação do colagénio deste tipo na placa de crescimento epifisária. A co-expressão da *c-myc* e do PCNA nos condrócitos em proliferação observada por Aizawa et al (1999) confirma a relação existente entre a *c-myc* e a proliferação celular. Na parte superior da zona de hipertrofia a elevada percentagem de condrócitos com marcação positiva, por um lado, e o facto de Aizawa et al (1999) terem igualmente observado a co-expressão da *c-myc* e da PCNA, sugere que nesta zona alguns dos condrócitos estão ainda em proliferação. A *c-myc* está fundamentalmente localizada no citoplasma, o que confirma os resultados de outros autores (Aizawa et al, 1999; Wang et al, 1997) contrastando, no entanto, com a localização nuclear na zona de proliferação. Enquanto a localização nuclear está de acordo com o conhecido papel da *c-myc* como factor de transcrição, o significado da marcação citoplasmática não é ainda conhecido, podendo, no entanto, estar relacionado com a diferenciação dos condrócitos (Loveridge et al, 1993; Wang et al, 1997). A imunomarcagem nos condrócitos hipertróficos terminais, junto dos canais de vascularização, pode estar associada a um eventual papel desta proteína na apoptose. A proteína *c-myc* é um potente indutor da apoptose e Evans et al (1992) referem que a indução pode acontecer nas fases G0, G1 e S do ciclo celular através, e de acordo com os resultados de Juin et al (1999, 2002), da desestabilização da integridade mitocondrial, levando à libertação do citocromo-c, em cooperação com os membros pro-apoptóticos da família Bcl-2. Por outro lado, os resultados de Aizawa et al (1999) sugerem que, pelo menos em coelhos, na placa de crescimento a *c-myc* está associada com processos celulares diferentes, dependendo da idade dos indivíduos e do estágio de desenvolvimento dos condrócitos, sendo, pois, possível que esteja envolvida na regulação da transcrição de genes associados com a apoptose. Adicionalmente, os resultados obtidos por Wang et al (1997), em ratos, sugerem que a expressão da *c-myc* observada nos condrócitos hipertróficos terminais da placa de crescimento, pode estar associada com a apoptose destes.



Em conclusão, as diferenças encontradas no presente trabalho, na imunomarcacão da *c-myc*, parecem ser mais uma consequência do que uma causa da patologia, uma vez que a menor quantidade de condrócitos hipertróficos positivos para a *c-myc* nas placas de crescimento discondroplásicas, decorre, muito provavelmente, do facto de existirem menos células neste estágio de desenvolvimento.

### Ubiquitina

A resposta celular a situações de *stress*, pode traduzir-se na síntese imediata de vários tipos de proteínas, da qual resultam a tolerância e a citoprotecção contra os danos moleculares causados por essas situações. Estas respostas celulares são induzidas por uma série de condições normais e anormais que afectam os processos homeostáticos, e incluem alterações no estado fisiológico envolvendo hormonas e factores de crescimento, condições patofisiológicas e agentes de *stress* (Morimoto et al, 1994; Schwartz e Ciechanover, 1999; Wilkinson, 1999; Layfield et al, 2001; Ciechanover e Schwartz, 2002; Fuchs, 2002; Glickman e Ciechanover, 2002). As respostas às situações de *stress* envolvem interacções moleculares cuja função é proteger e reparar as macromoléculas dos danos causados pelos agentes de *stress* e manter as integridades genética e metabólica (Sanders et al, 1996). O termo "proteínas de *stress*" (Goering, 1995), é hoje usado relativamente a um conjunto de proteínas que inclui as proteínas de choque térmico (em inglês, *heat shock proteins*, hsp), a hemoxigenase e as *multidrug-resistant gene p-glycoproteins* (Sanders e Dyer, 1994), a osteonectina (Neri et al, 1992), as metalotioneínas, a trombospondina e a ubiquitina (Neri et al, 1992; Del Razo et al, 2001).

Um incremento nos danos causados nas proteínas nativas, por situações de *stress*, induz a síntese de proteínas que participam na sua protecção e no seu *turnover* através de três vias discretas: (1) aumentando os níveis de chaperoninas, as quais, a par das suas funções de protecção e reparação, transportam as proteínas danificadas, e não reparáveis, para os apropriados locais de degradação lisossómica e citoplasmática, (2) aumentando os níveis de diversas proteases que selectivamente degradam as proteínas não nativas e, (3) aumentando os níveis de ubiquitina (Chiang et al, 1989; Leonhardt et al, 1993; Goldberg e Guillou, 1994).

A proteólise regulada desempenha um importante papel na fisiologia da célula, quer em situações normais, quer em condições patológicas. Em muitas das situações, este tipo de proteólise é levada a cabo pelo sistema ubiquitina-proteassoma (Attaix et al, 2001). A ubiquitina é uma proteína de baixo peso molecular (7kDa) envolvida na degradação não lisossómica de proteínas intracelulares (Schlesinger, 1990). Pequenas famílias multigenes codificam para as formas constitutivas expressas e indutíveis da ubiquitina. A ubiquitina é uma proteína que está presente em todas as células eucarióticas, o que, associado ao facto de ter conservado a sua estrutura, evidencia a sua importância vital no metabolismo celular. Por seu lado, a

proteassoma é uma enzima proteolítica citoplasmática, que constitui a maquinaria enzimática central deste sistema, responsável pela degradação da maior parte das proteínas intracelulares (Attaix et al, 2001; Wojcik, 2002). A degradação das proteínas através da via do complexo ubiquitina-proteassoma envolve duas etapas discretas e sucessivas: (1) marcação das proteínas-alvo por várias moléculas de ubiquitina, através de ligações covalentes, fenómeno conhecido por ubiquitinação; (2) degradação das proteínas identificadas pela ubiquitina, pelo complexo proteassoma 26S, com a libertação da ubiquitina livre e reutilizável (Glickman e Ciechanover, 2002).

A via degradativa do complexo ubiquitina-proteassoma desempenha um papel central na regulação do crescimento e da proliferação celular através do controlo de várias proteínas chave do ciclo celular (Murray et al, 1998; Yew, 2001; Clarke, 2002; Imiger, 2002; Naujokat e Hoffmann, 2002; Bashir e Pagano, 2003). Por outro lado, sabe-se que a ubiquitina é um elemento igualmente importante na regulação da síntese do RNA mensageiro (Conway et al, 2002), na regulação do citosqueleto (Archibald et al, 2003), na regulação do *turnover* da catenina-beta (Aberle et al, 1997), no controlo da transcrição (Muratani e Tansey, 2003), na adesão e na migração celular (Parakh e Kannan, 1993) e na regulação da apoptose (Orlowski, 1999; Naujokat e Hoffmann, 2002; Wojcik, 1999, 2002; Lee e Peter, 2003; Yang e Yu, 2003).

Não encontramos na bibliografia consultada referências quanto ao papel da ubiquitina no processo de ossificação endocondral. Em nossa opinião, os resultados obtidos no presente trabalho, relativamente à ubiquitina, podem ser comparados com os resultados obtidos para a *c-myc*, ou seja, a sua expressão tem a ver com o processo da ossificação endocondral, em si, e não parece estar directamente relacionada com o desenvolvimento da discondroplasia. E mesmo um possível aumento esperado na expressão a ubiquitina, em resposta à situação de *stress* bioquímico e mecânico provocado pela acumulação de matriz, não veio a verificar-se. Sabe-se que a via degradativa do complexo ubiquitina-proteassoma desempenha um papel central na regulação do crescimento e da proliferação celular através do controlo de várias proteínas chave do ciclo celular (Murray et al, 1998; Yew, 2001; Clarke, 2002; Imiger, 2002; Naujokat e Hoffmann, 2002; Bashir e Pagano, 2003). Não é de estranhar, por isso, a imunomarcagem dos condrócitos proliferativos em ambos os tipos de placas de crescimento com um padrão de expressão similar. Quanto aos condrócitos hipertróficos, células em que a imunomarcagem foi bastante evidente, a expressão da ubiquitina deve estar relacionada com a intensa actividade metabólica que se verifica nesta fase da diferenciação dos condrócitos. Com efeito, na zona de hipertrofia as células aumentam bastante de tamanho (Brighton, 1978, 1984; Iannotti, 1990), devido, pelo menos, numa primeira fase, e aparentemente, a um aumento de volume do núcleo e do citoplasma (Holtrop, 1972b; Buckwalter et al, 1986). No estágio terminal de hipertrofia, a altura e o volume médios das células aumentam cerca de 4-10 vezes, respectivamente, verificando-se igualmente um aumento, de cerca de 3 vezes, no volume médio de matriz por célula (Hunziker et al, 1987; Noonan et al, 1998; Vanky et al, 1998). Por

observação em microscopia electrónica, esses condrócitos parecem degenerados, e a última célula de cada coluna parece não viável, apresentando uma acentuada fragmentação da membrana celular e do envelope nuclear, e a perda de componentes citoplasmáticos (Brighton et al, 1973). É assim natural que os condrócitos hipertróficos apresentem uma expressão elevada da ubiquitina, dada a necessidade constante da existência duma proteólise regulada. O facto de se terem verificado diferenças significativas na percentagem de células positivas entre as placas de crescimento normais (95,4%) e as placas de crescimento discondroplásicas (89,2%), provavelmente terá a ver com as diferenças existentes no próprio processo de hipertrofia que se sabe existirem entre as placas de crescimento normais e as placas de crescimento discondroplásicas. Por outro lado, uma vez que existem evidências que os condrócitos, na parte inferior da zona de hipertrofia, evoluem para uma situação de apoptose (Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995; Zenmyo et al, 1996; Ohyama et al, 1997; Silvestrini et al, 1998), a imunomarcção de muitos dos condrócitos hipertróficos terminais, junto aos canais vasculares, sugere que a via degradativa do complexo ubiquitina-proteassoma deve desempenhar um papel importante na regulação da morte celular por apoptose, como aliás foi evidenciado por vários autores (Orlowski, 1999; Naujokat e Hoffmann, 2002; Wojcik, 1999, 2002; Lee e Peter, 2003; Yang e Yu, 2003). Finalmente, a imunomarcção positiva de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como de inúmeras células da medula, com um padrão de expressão similar nos dois tipos de placa de crescimento, provavelmente está relacionada com as suas diferentes actividades metabólicas, associadas ao processo de ossificação endocondral.

### **S100**

As proteínas S100, originalmente isoladas por Moore (1965), do cérebro de bovino, constituem uma família de proteínas citoplasmáticas de baixo peso molecular (9-13 kDa), pertencentes ao grupo das proteínas que ligam ao  $\text{Ca}^{2+}$ , caracterizadas pela denominada estrutura de tipo *EF-hand* (para revisões ver Zimmer et al, 1995; Nelson e Chazin, 1998; Heizmann et al, 2002; Donato, 1999, 2003). Algumas proteínas S100 têm igualmente a capacidade de ligação ao  $\text{Zn}^{2+}$  e ao  $\text{Cu}^{2+}$  (Heizmann e Cox, 1998). As proteínas S100 caracterizam-se, ainda, pelo elevado grau de conservação na sequência de aminoácidos mantido ao longo da evolução dos vertebrados (Donato, 2001), embora tenha sido referida uma certa micro-heterogeneidade, entre espécies, das subunidades que as constituem (Isobe et al, 1983). Esta família de proteínas compreende 21 membros, expressos exclusivamente nos vertebrados (Arcuri et al, 2002; Chowdhury e Yoshimura, 2002; Donato, 2003; Girolamo et al, 2003). As proteínas S100 não exercem actividades enzimáticas conhecidas, e fazem sentir os seus efeitos intracelulares interagindo com, e modulando, a actividade de outras proteínas, referidas como proteínas-alvo (Zimmer et al, 2003). Embora vários dados sugiram que as S100 exibem padrões de expressão muito específicos nos tecidos maduros normais, os níveis de expressão duma dada proteína S100, podem ser fortemente afectados por factores ambientais (Donato, 2003). A quantidade

de uma dada proteína S100 expressa nas células não é fixa, e alguns tipos celulares expressam níveis elevados, enquanto outros expressam níveis intermédios, baixos ou nulos. Estas variações podem reflectir o papel, ou os papéis funcionais duma dada proteína S100, o tipo celular em que ela é expressa e a co-presença de outros membros da mesma família (Donato, 2003). Considerando estes dados em conjunto, podemos ser levados a pensar que: existe um certo grau de especificidade celular para os diferentes membros da família S100; os membros desta família não são permutáveis; ou que tipos celulares específicos necessitam duma proteína S100 específica (Donato, 2003). Contudo, nalguns casos, as S100 partilham as suas proteínas-alvo e, por essa razão, regulam actividades idênticas (provavelmente em diferentes tipos celulares), e, noutros casos ainda, diferentes membros das S100 participam em conjuntos de actividades similares (Donato, 2003). A variedade de proteínas intracelulares-alvo das S100 e, nalguns casos, de apenas uma proteína S100, e a especificidade na expressão celular de certos membros da família S100, sugerem que estas proteínas devem desempenhar algum papel importante na regulação de proteínas efectoras e/ou de etapas específicas de vias de sinalização/funções celulares (Donato, 2003). Intracelularmente, as S100 estão envolvidas na regulação (ver Donato, 1999, 2003; Heizmann et al, 2002): da fosforilação de proteínas, da actividade enzimática, do crescimento e da diferenciação celulares (Hitomi et al, 1998; Sakaguchi et al, 2000), do ciclo celular (Klein et al, 198; Chano et al, 1995), da homeostase do cálcio (Baimbridge et al, 1992; Barger e Van Eldik, 1992; Arkuri et al, 2002), das morfologia e motilidade celulares e da dinâmica de certos constituintes do citosqueleto (Donato et al, 1989; Schelinfreund et al, 1990), da adesão celular (Yonemura et al, 2000) e da remodelação da matriz extracelular, influenciando a expressão das MMPs e dos TIMPs (Bjornland et al, 1999; 2001). Por outro lado, são crescentes as evidências de importantes funções extracelulares dos membros da família S100, incluindo a estimulação da proliferação e a indução da apoptose de determinados tipos celulares (Fano et al, 1995; Hu e Van Eldik, 1996; ver Donato, 2001, 2003; Yui et al, 2003), e a estimulação da angiogénese (Ambartsumian et al, 2001). As funções pleiotrópicas, intra e extracelulares, das proteínas S100, traduzem as suas distintas afinidades para o  $Ca^{2+}$ , para o  $Zn^{2+}$  e para o  $Cu^{2+}$ , a sua ligação a diferentes proteínas-alvo e diferentes modificações pos-translacionais (Heizmann, 2002). Alterações nas funções das proteínas S100 estão associadas a uma série de patologias, designadamente, cardiomiopatias, patologias neurológicas, tumores e inflamações crónicas (ver Barraclough, 1998; Donato, 1999; Heizmann, 2002; Heizmann et al, 2002; Mazzucchelli, 2002).

Inicialmente as proteínas S100 foram descritas como sendo específicas do sistema nervoso, mas foram sendo identificadas numa variedade de outros tipos celulares (ver Haimoto et al, 1987), incluindo células inflamatórias, em particular neutrófilos (Yui et al, 2003) e macrófagos (Rammes et al, 1997), condrócitos, da placa de crescimento e da cartilagem articular, e células osteoblásticas (Weiss e Dorfman, 1986; Nakamura et al, 1988; Sugimoto et al, 1991; Lombardi et al, 1992; Dascalu et al, 1996). Tajima et al (1991), observaram uma imunomarcagem positiva das S100 mais forte em condrócitos hipertróficos do que nos condrócitos proliferativos. Por seu

lado, Weiss e Dorfman (1986) observaram igualmente imunomarcção intensa nos condrócitos hipertróficos da placa de crescimento junto à zona de calcificação (Weiss e Dorfman, 1986). A intensidade da imunomarcção foi aumentando no citoplasma dos condrócitos à medida que se caminhava ao longo da zona de proliferação para a zona de hipertrofia, sendo máxima na zona de mineralização. Sugimoto et al (1991) obtiveram resultados semelhantes em cartilagem articular, observando uma imunomarcção positiva intensa nos condrócitos hipertróficos nas áreas perivasculares. A expressão das S100 está igualmente associada a várias patologias da cartilagem e do osso, designadamente, osteoartrite e artrite reumatóide (Mohr et al, 1985; Chen et al, 1990), em processos de reparação tecidual (Yoshioka et al, 1988; Wolf et al, 1992; Leonardi et al, 2000) e ao desenvolvimento de determinados tipos de tumores (Okajima et al, 1988; Chano et al, 1995). Em situações de patologias tumorais, vários autores (Okajima et al, 1988; Chano et al, 1995) obtiveram resultados similares, sendo a imunomarcção para as S100 mais intensa nos condrócitos bem diferenciados da cartilagem epifisária normal, dos encondromas, dos osteocondromas e dos condrosarcomas. Por outro lado, as áreas ocupadas pelos condroblastomas mostraram uma forte imunomarcção para as S100, na matriz junto às células da zona de deposição mineral. Adicionalmente, nos osteosarcomas foram observadas células positivas nas áreas condroblástica e osteoblástica (Okajima et al, 1988). De acordo com estes autores, as proteínas S-100 desempenham algum papel na calcificação dos tumores.

Relativamente aos resultados obtidos no presente trabalho, eles estão de acordo com os resultados de outros autores, anteriormente referidos, uma vez que foram observados condrócitos positivos fundamentalmente na zona de hipertrofia, quer nas placas de crescimento normais quer nas placas de crescimento discondroplásticas, embora algumas células proliferativas tenham exibido expressão nuclear. Por outro lado, nas placas de crescimento discondroplásticas foram observados condrócitos hipertróficos positivos no interior das lesões, o que sugere um papel reparador destas proteínas, tal como acontece noutras patologias, ou pode tratar-se duma resposta à situação de inflamação crónica derivada do *stress* bioquímico e mecânico provocado pela acumulação de matriz. De salientar ainda o facto de alguns condrócitos na fase final de hipertrofia, junto aos canais vasculares, terem mostrado uma imunomarcção intensa. Estes dados, em conjunto, sugerem que as proteínas da família S100 devem estar envolvidas na proliferação, na hipertrofia e na apoptose dos condrócitos, como evidenciado por outros autores para outros tecidos (Fano et al, 1995; Hu e Van Eldik, 1996; ver Donato, 2001, 2003; Yui et al, 2003), e na estimulação da angiogénese da placa de crescimento. Por outro lado, a imunomarcção intensa da matriz óssea e das zonas junto aos locais de mineralização, dadas as propriedades de ligação ao cálcio, e a sua participação na homeostase deste ião (Baimbridge et al, 1992; Barger e Van Eldik, 1992; Arkuri et al, 2002), sugere que a expressão destas proteínas nos condrócitos deve estar envolvida na diferenciação, no metabolismo e na mineralização da cartilagem, confirmando os resultados obtidos por outros autores (Weiss e Dorfman, 1986). Este facto, a juntar ao conhecido envolvimento das proteínas S100 na regulação da remodelação da matriz extracelular,

influenciando a expressão das MMPs e dos TIMPs (Bjornland et al, 1999; 2001), torna interessante um estudo mais aprofundado duma eventual ligação entre estas famílias de proteínas no desenvolvimento da discondroplasia.

### Tubulina

O citosqueleto é de extrema importância no controlo da forma e dos movimentos das células e do movimento dos organelos citoplasmáticos (Benjamin et al, 1994). Na maior parte das células o citosqueleto consiste em três tipos de fibras de proteínas: os microfilamentos, os microtúbulos e os filamentos intermédios. Os microtúbulos são constituídos, essencialmente, pela polimerização de um heterodímero de tubulina- $\alpha$  e tubulina- $\beta$ , proteínas globulares que nos vertebrados são codificadas por uma família de genes muito conservados durante a evolução (Plancha e David-Ferreira, 1999). Contudo, vários estudos demonstraram a existência das tubulinas  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  (Burns, 1995; Smrzka et al, 2000). Os microtúbulos têm várias funções biológicas (ver Avila, 1992; Nogales, 2000), designadamente, no transporte intracitoplasmático (Vale, 1987), na formação do fuso mitótico (Mitchison et al, 1986) e no movimento ciliar (Gibbons, 1981).

No que diz respeito aos condrócitos, uma vez que estes estão encerrados no interior de uma matriz extracelular rígida, não se conseguem mover. Eles são passivamente deformados durante a compressão (Skaggs et al, 1993) e não alteram activamente a sua forma, excepto durante a hipertrofia (Cancedda et al, 1995). Em situações de osteoartrite verifica-se igualmente uma alteração da forma nos condrócitos articulares (Weiss, 1973), em virtude das alterações que se verificam na arquitectura do citosqueleto (Kouri et al, 1998). Existem fortes evidências que sugerem que o citosqueleto é importante na condrogénese e na manutenção do fenótipo dos condrócitos, na divisão celular e na resposta das células às forças externas (Benjamin et al, 1994). Nos condrócitos, a integridade dos microtúbulos é importante para a síntese e secreção de colagénios e proteoglicanos (Benjamin et al, 1994; Jortikka et al, 2000), e para o controlo das suas diferenciação e hipertrofia (Farquharson et al, 1999). A diferenciação terminal dos condrócitos da placa de crescimento é acompanhada pelas alterações da forma (aquisição de forma esférica) e do tamanho (acentuado aumento do volume). Estas alterações devem estar associadas com um rearranjo do citosqueleto, mas a informação disponível sobre estes aspectos é escassa. O processo de hipertrofia dos condrócitos é, essencialmente, o resultado do aumento do citoplasma devido ao transporte activo de água e de electrólitos através da membrana (Brighton et al, 1982; Buckwalter et al, 1986; Hunziker et al, 1987). De acordo com os resultados obtidos por Farnum et al (2002), a acumulação intracelular de osmólitos orgânicos não é uma estratégia prioritária usada pelos condrócitos durante a hipertrofia, e o aumento das quantidades absolutas de organelos celulares, designadamente, retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e mitocôndrias, parece ter alguma importância, apenas nos primeiros estágios da hipertrofia (Breur et al, 1994).

A hipertrofia dos condrócitos é um processo altamente coordenado e a forma das células resultantes é considerada a principal determinante na regulação do crescimento longitudinal do osso (Farquharson et al, 1999). Durante o processo de hipertrofia verifica-se um aumento significativo na altura dos condrócitos (Hunziker e Schenk, 1989), mas não se sabe bem como estes regulam a sua própria forma (Benya et al, 1988).

A forma das células é mantida e modulada por componentes da matriz extracelular e pelo citosqueleto e os resultados do presente trabalho mostram claramente que a expressão da tubulina-beta é bem evidente nos condrócitos hipertróficos, ao contrário do que acontece nos condrócitos das zonas de repouso e de proliferação, em que a localização imunocitoquímica demonstrou uma expressão reduzida da tubulina-beta. Estes resultados, aliás, estão de acordo com os resultados obtidos por Farquharson et al (1999), também em condrócitos da placa de crescimento de galinha. Com efeito, estes autores observaram uma sobre-expressão da tubulina-beta nos condrócitos no final da hipertrofia, cerca de três vezes mais do que nos condrócitos das outras zonas, os quais apresentavam níveis similares de expressão. Ronot et al (1988), obtiveram resultados similares, *in vitro*, em condrócitos articulares de coelho, tendo os níveis de tubulina aumentado em função da idade das células. Os microtúbulos consistem de polímeros alfa e beta, e as funções e o significado biológico das várias isoformas de tubulina não são ainda bem claros. No entanto, parece evidente que a heterogeneidade das tubulinas, responde a necessidades reguladoras e funcionais das células (Jacobs e Stevens, 1986), e a associação aparente entre a expressão da tubulina e as alterações que se verificam na forma dos condrócitos, sugere que os microtúbulos estão envolvidos na modulação da forma destes durante a diferenciação e durante o processo de hipertrofia. Farquharson et al (1999) evidenciaram ainda o envolvimento dos microtúbulos na diferenciação e na hipertrofia dos condrócitos através da análise morfológica, *in vitro*, de explantes de placas de crescimento tratados com colchicina, tendo observado uma falha parcial na hipertrofia dos condrócitos. Sabe-se que uma das características da discondroplasia é a ausência da completa diferenciação dos condrócitos, os quais não atingem a hipertrofia completa (Thorpe et al, 1993). A diminuição da expressão da tubulina nas placas de crescimento discondroplásicas obtidas no presente trabalho sugere que, eventualmente, uma das causas da discondroplasia possa estar associada a uma inibição da polimerização dos microtúbulos, a qual se traduz na supressão da completa diferenciação dos condrócitos, com a conseqüente acumulação de matriz extracelular. A regulação da tubulina-beta pode ser necessária para aumentar a síntese dos microtúbulos durante as alterações de tamanho sofridas pelos condrócitos no processo de hipertrofia. Por outro lado, os microtúbulos podem interagir com uma diversidade de polipéptidos os quais, por sua vez, promovem a sua reunião e modulam o seu tamanho e as suas actividades funcionais (Mooney et al, 1995; Downing, 2000). Por exemplo Alexandrova et al (1995) demonstraram que a oncoproteína *c-myc* interage, *in vivo* e *in vitro*, com a tubulina-alfa e com os microtúbulos polimerizados, o que sugere um potencial papel fisiológico da

interacção *c-myc*-tubulina, pelo que seria interessante avaliar do seu envolvimento no desenvolvimento da discondroplasia.

### **pan-caderina**

As caderinas constituem uma família de glicoproteínas transmembranares de cadeia simples, que podem ligar-se fortemente a moléculas similares noutras células, através dum mecanismo dependente da presença de cálcio (Slack, 2001). As caderinas derivam o seu nome do tecido em que foram originalmente encontradas e, por isso, a caderina-E ocorre principalmente nos epitélios, e a caderina-N ocorre fundamentalmente no tecido neural (Slack, 2001). As caderinas formam uma superfamília de proteínas com, pelo menos, 6 subfamílias, baseadas na sua composição, na sua estrutura genómica e na análise filogenética das suas sequências de aminoácidos (Kister et al, 2001). Estas subfamílias compreendem as caderinas clássicas ou caderinas do tipo I (caderinas E, N, P e R), as caderinas atípicas ou caderinas do tipo II (caderinas 6 a 12), as caderinas desmossomais (*desmocollins* e *desmogleins*), as protocaderinas (protocaderinas 1 e 2, protocaderinas-OL e protocaderinas-CNR) e as caderinas *Flamingo* (Angst et al, 1966; Nollet et al, 2000; Suzuki, 2001).

As caderinas consistem num domínio de adesão extracelular, um segmento transmembranar e um domínio citoplasmático (Behrens, 1999), sendo neste que se encontra a maior homologia existente entre as diferentes caderinas (Helfrich e Horton, 1999). Os elementos das diferentes subfamílias partilham uma estrutura básica comum e as suas massas moleculares variam entre os 100 e os 130 kDa (Helfrich e Horton, 1999). O domínio extracelular é responsável pelas interacções célula-célula entre caderinas, e a sua estrutura é determinada pelos iões cálcio, cuja presença é estritamente necessária para a adesão com as caderinas das células vizinhas (Nachtigal et al, 2001). Os domínios citoplasmáticos, por seu lado, interagem com as proteínas citosólicas denominadas cateninas (Kemler, 1993; Huber et al, 1996). Foi demonstrado que existem três cateninas principais nos complexos caderinas-cateninas, que estabelecem a ligação das caderinas aos filamentos de actina do citosqueleto (Kemler, 1993; Marrs e Nelson, 1996): a catenina- $\alpha$ , a catenina- $\beta$  e a catenina- $\gamma$  (Hinck et al, 1994; Aberle et al, 1996). Existem ainda outras cateninas que podem igualmente associar-se com o domínio citoplasmático das caderinas, designadamente diferentes isoformas da denominada p120<sup>cas</sup> (Nachtigal et al, 2001) e a catenina- $\delta$  (Lu et al, 1999). Dum modo geral, as interacções dos domínios citoplasmáticos com a actina do citosqueleto, mediadas através das cateninas, aumentam significativamente a força das ligações intercelulares (Yap et al, 1998). As caderinas têm duas funções principais: são responsáveis pela adesão entre células e desempenham um papel fundamental na sinalização celular (Nachtigal et al, 2001). Estas duas propriedades não podem ser separadas, e quaisquer alterações na expressão ou função das caderinas leva ao estabelecimento ou à progressão de processos patológicos (Nachtigal et al, 2001). As moléculas da família das caderinas exibem um padrão de expressão génica espaço-temporal único (Takeichi, 1995) e



medeiam interacções homotípicas específicas (Koch et al, 1999; Shan et al, 1999). Por exemplo, as caderinas clássicas interactuam com as cateninas e com os filamentos de actina, e as caderinas desmossomais interactuam com o sistema de filamentos intermediários (Angst et al, 2001). Contudo, existem caderinas que podem estabelecer interacções heterotípicas, embora este não seja o mecanismo de adesão predominante (Petruzzelli et al, 1999).

As caderinas estão envolvidas em muitos processos biológicos importantes, designadamente: na embriogénese (Marrs e Nelson, 1996), na morfogénese (Takeichi, 1995; Tepass, 1999), na diferenciação e na sinalização celular (Shin et al, 2000), na formação e manutenção da arquitectura dos tecidos (Gumbiner, 1996; Larue et al, 1996; Vleminckx e Kemler, 1999), na angiogénese (Gory-Faure et al, 1999; Nachtigal et al, 2001), na neurotransmissão (Suzuki, 2000; Angst et al, 2001), na apoptose (Hunter et al, 2001), e em muitas patologias (Rojas e Ahmed, 1999), incluindo certas formas de cancro (Joseph-Silverstein e Silverstein, 1998; Syrigos et al, 1999; Asgeirsson et al, 2000). Alterações na expressão ou nas funções das caderinas e das suas proteínas associadas, as cateninas, são o ponto de partida de muitas patologias (Nachtigal et al, 2001). Por exemplo, a sub-regulação da caderina-E é um evento chave para os processos de invasão e de metastização de muitos tumores (Nachtigal et al, 2001). Por outro lado, a disrupção dos complexos caderinas VE (vascular endothelial)-cateninas por vários agentes inflamatórios, por células inflamatórias e por *stress* de pressão mecânica é acompanhada por um incremento na permeabilidade vascular (Nachtigal et al, 2001).

As caderinas expressam-se em muitos tipos celulares e a mesma célula pode expressar várias caderinas diferentes simultaneamente (Helfrich e Horton, 1999). No que diz respeito às células do osso e da cartilagem, a informação disponível quanto à expressão dos vários tipos das caderinas não é muito vasta e encontra-se fragmentada (Helfrich e Horton, 1999). Sabe-se que têm participação activa nos processos da condrogénese (Hickok et al, 1998; DeLise et al, 2000; ver Horton et al, 1996 e Helfrich e Horton, 1999) e da osteogénese (Marie, 2002; ver Horton et al, 1996 e Helfrich e Horton, 1999).

As caderinas são fundamentais no processo de ossificação endocondral embrionária, participando em eventos de condensação celular (Hickok et al, 1998; Woodward e Tuan, 1999; DeLise et al, 2000) e de migração celular (Simonneau et al, 1995). A caderina-N expressa-se nas células pre-condrocíticas nos membros da galinha, mas não na cartilagem madura (Oberlender e Tuan, 1994a,b; Tavella et al, 1994). Os resultados de Woodward e Tuan (1999) sugerem que a adesão celular mediada pela caderina-N é um componente dos requisitos reguladores do programa de diferenciação condrogénica. Por outro lado, a caderina-11 é expressa nas células do mesênquima que migram da crista neuroectodérmica para formar a cartilagem presuntiva, no rato em desenvolvimento (Simonneau et al, 1995). As caderinas devem estar envolvidas na apoptose (Vleminckx e Kemler, 1999), situação que é observada

com frequência aumentada na zona de hipertrofia (Roach et al, 1995; Ohyama et al, 1997). Jefferies et al (2000) sugerem que a expressão anómala da caderina-B pode estar envolvida na etiologia da discondroplasia, uma vez que encontraram a sua sobre-expressão nos condrócitos hipertróficos das lesões discondroplásticas, o que é surpreendente, já que o contacto entre condrócitos é muito reduzido devido à elevada produção de matriz (Hunziker e Schenk, 1989).

As células formadoras de osso (células da linhagem osteoblástica) estabelecem comunicações funcionais umas com as outras, com os osteócitos, com as células hematopoiéticas da cavidade medular dos ossos e com a matriz extracelular através, entre outras moléculas de adesão, das caderinas (Helfrich e Horton, 1999). Embora estas interacções sejam de extrema importância para o metabolismo ósseo, o tipo de caderinas expressas pelos osteoblastos não tem sido sistematicamente investigado (Helfrich e Horton, 1999). Contudo, a expressão de algumas delas foi observada nos osteoblastos, designadamente a caderina-N (Ferrari et al, 2000; Bennet et al, 2001; Marie, 2002), a caderina-E (Babich e Foti, 1994; Cheng et al, 1998), a caderina-4 (Cheng et al, 1998) e a caderina-11 (Kawaguchi et al, 2001). Uma nova caderina, clonada a partir dos osteoblastos, a caderina-Ob, expressa-se nos osteoblastos e noutros tecidos, mas sabe-se hoje que é muito idêntica à caderina-11 (Takeichi, 1995). A caderina-N expressa-se em vários estádios da formação do osso, embora com vários níveis de expressão (Ferrari et al, 2000). Os padrões de expressão da caderina-N nos osteoblastos durante a osteogénese, *in vivo* e *in vitro*, sugerem a participação desta molécula na proliferação (Bennet et al, 2001), na diferenciação (Ferrari et al, 2000; Bennet et al, 2001; Marie, 2002), e na sobrevivência dos osteoblastos (Hunter et al, 2001; Marie, 2002). De acordo com Hunter et al (2001), a disrupção das interacções mediadas pela caderina-N, traduz-se na indução da apoptose dos osteoblastos, na activação das caspases e na quebra da ligação com a catenina- $\beta$ . Alterações na expressão da caderina-N estão associadas com uma diferenciação anormal dos osteoblastos e com a osteogénese em situações patológicas (Marie, 2002). Os resultados de Kashima et al (1999) sugerem que a redução na caderina-N e a expressão anómala da caderina-11 humana, no osteosarcoma, estão relacionadas com a morfologia do tumor e com a sua metastização. A expressão da caderina-11, uma das caderinas clássicas, foi observada nos osteoblastos do crâneo e fémur de ratos (Kawaguchi et al, 2001). Os resultados destes autores (Kawaguchi et al, 2001), sugerem que a caderina-11 desempenha um papel importante na regulação da diferenciação dos osteoblastos e na mineralização da matriz do osteóide. Por seu lado, Mbalaviele et al (1998) observaram a expressão de várias isoformas da caderina-6 em osteoblastos. Relativamente aos osteoclastos, a informação disponível acerca da expressão de caderinas é muito escassa. Mbalaviele et al (1995) observaram a expressão da caderina-E e a ausência de expressão das caderinas N e P, em osteoclastos maduros humanos e de rato. Os resultados destes autores sugerem que, em ratos, em sistema *in vitro*, o desenvolvimento dos osteoclastos e, em particular, a fusão dos osteoclastos, necessita da expressão da caderina-E. Todavia, permanece a dúvida se isto se passa ao nível dos precursores dos osteoclastos, ou se a expressão da caderina-E é necessária noutras células,

designadamente, osteoblastos e/ou células do estroma, e que se sabe serem cruciais para a formação dos osteoclastos multinucleados. Mais recentemente, Mbalaviele et al (1998) observaram a expressão de várias isoformas da caderina-6 em osteoclastos, em simultâneo com a sua expressão em osteoblastos. Embora não haja muita informação disponível sobre o assunto, não é de surpreender que as caderinas não desempenhem um papel de importância nos osteoclastos maduros, uma vez que estes são células móveis e que não estabelecem interações célula-célula estáveis. No entanto, é possível que durante a sua formação haja a participação de vários membros da família das caderinas.

Os resultados do presente trabalho relativamente à pan-caderina, através da utilização de um anticorpo que reconhece uma variedade de caderinas, foram surpreendentes, e confirmam os resultados obtidos por Jefferies et al (2000), que observaram igualmente uma sobre-expressão, da caderina-B, nos condrócitos hipertróficos das lesões discondroplásticas. Estes resultados são de facto, surpreendentes, já que o contacto entre condrócitos é muito reduzido devido à elevada produção de matriz. Estes autores sugerem, inclusivamente, que a expressão anómala da caderina-B pode estar envolvida na etiologia da discondroplasia. No entanto, a razão aparente para a sobre-expressão verificada nas placas de crescimento discondroplásticas, não é clara. As caderinas têm duas funções principais: são responsáveis pela adesão entre células e desempenham um papel fundamental na sinalização celular (Nachtigal et al, 2001). É possível que participem na apoptose dos condrócitos, situação que é observada com frequência aumentada na zona de hipertrofia (Roach et al, 1995; Ohyama et al, 1997), e dado saber-se que estas proteínas estão envolvidas neste tipo de morte celular (Vleminckx e Kemler, 1999). Outra possibilidade para estes resultados tem a ver com os níveis reduzidos de cálcio nas lesões terem provocado a sobre-expressão da caderina (Nie et al, 1995). Embora os dados relativos aos níveis de cálcio na discondroplasia serem contraditórios (Hargest et al, 1985; Nie et al, 1995), esta hipótese deve ser avaliada, em função das observações de Babich e Foti (1994) quanto aos níveis e localização das caderinas em osteoblastos *in vitro*, em meio de cultura deficitário em cálcio. A este propósito será interessante recordar que uma das hipóteses adiantadas para o modo de acção do tirame é, justamente, a perturbação do metabolismo do cálcio. Edwards (1987), sugere mesmo uma eventual formação de quelatos de cálcio, fazendo diminuir, assim, a biodisponibilidade deste ao nível do tracto gastrintestinal, podendo, esta diminuição, estar associada com o desenvolvimento da discondroplasia. Adicionalmente, o modelo de indução mais utilizado baseia-se na alteração da relação Ca:P da dieta. Quanto ao padrão de expressão da pan-caderina nos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, bem como em inúmeras células da medula, similar em ambos os tipos de placas de crescimento, provavelmente tem a ver com a participação desta proteína na proliferação, na diferenciação e na sobrevivência destes tipos celulares, processos essenciais no normal decurso da formação de osso endocondral.

#### 5.4.2 Apoptose

A apoptose dos condrócitos está no centro, espacial, temporal e funcionalmente, dos eventos que constituem a ossificação endocondral, e que ocorrem na interface da cartilagem vascular. Com efeito, a apoptose inicia a activação e a libertação dos factores de crescimento, regula a manutenção homeostática da altura da placa de crescimento, a libertação e a acumulação de cálcio, a estimulação da invasão vascular, do recrutamento dos osteoclastos e da formação de osteóide (Gibson, 1998). No entanto, a transição de um condrócito hipertrófico para um condrócito apoptótico não está ainda devidamente caracterizada e esclarecida. A apoptose é modulada por um núcleo, ou eixo central, regulatório, para o qual convergem diferentes estímulos; esse núcleo é constituído por promotores e bloqueadores da apoptose, que interactivam entre si, e de cujo balanço resulta um estado de permissividade ou de resistência à morte celular (Sambade, 1999). Recentemente foi caracterizada uma família de proteases de cisteína, presentes nas células como pro-enzimas, as denominadas caspases, e que são responsáveis pelas alterações degradativas próprias do processo apoptótico (Gibson, 1998; Sambade, 1999). Das, pelo menos, 14 membros que constituem a família das caspases (para revisões ver Cohen, 1997; Grutter, 2000), as caspases-3 desempenham um papel central e essencial em muitas das vias apoptóticas (Kuida et al, 1996; Ishizaki et al, 1998; Janicke et al, 1998; Porter e Janicke, 1999; Nuttall et al, 2000). As caspases clivam especificamente determinados substratos, de que resultam alterações morfológicas e fragmentação do DNA características da apoptose. Entre esses substratos contam-se proteínas envolvidas na reparação do DNA, componentes de complexos proteicos envolvidos na replicação do DNA, proteínas reguladoras da progressão no ciclo celular, e, ainda, várias proteínas com funções estruturais como a actina (Vanags et al, 1996; Kothakota et al, 1997; Sambade, 1999). Não é claro neste momento, se caspases específicas são expressas em certos tipos celulares e se são necessárias para diferentes formas de apoptose, ou se cascatas específicas de caspases operam em certos tecidos e em distintos estádios de desenvolvimento (Gibson, 1998). Por exemplo, *null-mice* para a caspase-1 não mostram qualquer tipo de fenótipo facilmente atribuível a anomalias na apoptose (Li et al, 1997), o que sugere que esta caspase pode ser redundante para a cascata apoptótica. Pelo contrário, alguns trabalhos, incluindo os do *null-mice*, mostram que a caspase-3 desempenha um papel central e essencial em muitas vias apoptóticas (Ishizaki et al, 1998; Janicke et al, 1998; Kuida et al, 1996). Por outro lado, existe a família Bcl-2, constituída por mais de catorze membros, com diferentes mecanismos de participação na regulação da apoptose (Sambade, 1999). Entre os diferentes genes em questão, os mais detalhadamente estudados são os bloqueadores da apoptose, Bcl-2 e Bcl-XL, e os promotores da apoptose, Bax, Bcl-XS, Bad e Bak (Sentman et al, 1991; Yin et al, 1994; Sambade, 1999). Foi demonstrado por imunolocalização, em murganhos (Amling et al, 1997), e em ratos (Wang et al, 1997a; Chrysis et al, 2002), que a Bcl-2 está distribuída ao longo da placa de crescimento, com os níveis mais elevados nos condrócitos em divisão e na fase inicial de hipertrofia (caracterizada por uma co-localização de colagénio de tipo X), e os níveis mais

baixos na fase terminal de hipertrofia, em simultâneo com a vascularização metafisária (Gibson, 1998). As mitocôndrias ocupam uma posição de destaque na sinalização das vias intracelulares apoptóticas, uma vez que são um local privilegiado da acção da família Bcl-2 e de activação da cascata das caspases (ver revisões em Desagher e Martinou, 2000 e Bernardi et al, 2001). Foi observado que alterações no potencial de membrana da mitocôndria, na permeabilidade, no transporte de cálcio e no metabolismo energético, precedem as alterações morfológicas e a fragmentação de DNA, características da apoptose (Kroemer et al, 1995). As ligações moleculares entre as funções mitocondriais e apoptose, foram evidenciadas com a descrição do papel do citocromo-c neste processo. Na apoptose, o citocromo-c, que normalmente funciona como parte essencial na cadeia de transporte de electrões na mitocôndria, liberta-se para o citoplasma, onde promove a activação proteolítica das caspases-9 e, deste modo, inicia a cascata das caspases (Gibson, 1998). Por outro lado, as Bcl-2, e outros membros desta família, são capazes de prevenir a libertação de citocromo-c, o que sugere que este pode ser o mecanismo pelo qual a Bcl-2 previne a apoptose (Rosse et al, 1998; Zhivotovsky et al, 1998).

A invasão da cartilagem em crescimento por células vasculares é uma parte essencial no processo de ossificação endocondral. No entanto, não se sabe ainda se a apoptose dos condrócitos hipertróficos é o estímulo para o recrutamento dos vasos sanguíneos, e das células especializadas na reabsorção da matriz, ou, se pelo contrário, é a invasão dos vasos sanguíneos o sinal para a morte dos condrócitos e para os passos subsequentes, transmitindo os sinais reguladores celulares e/ou humorais adequados (Gerber et al, 1999). Já em 1987 Floyd et al sugeriam uma relação entre a vascularização da cartilagem e a apoptose dos condrócitos hipertróficos, relação essa identificada por uma evidente condensação nuclear nestas células. Mais recentemente, Bronckers et al (1996), mostraram que a invasão das lacunas, pelos vasos sanguíneos, apenas é possível após os condrócitos hipertróficos terminais entrarem em apoptose. Por outro lado, a apoptose dos condrócitos parece ser também importante no processo de reabsorção da cartilagem associado à ossificação endocondral. Várias proteínases, incluindo as MMP1, MMP13, MMP2, MMP-9 e a MMP-3, mostraram encontrar-se em elevadas concentrações nos condrócitos hipertróficos, ou na sua matriz adjacente, na interface vascular (Brown et al, 1989). A apoptose dos condrócitos, e a activação associada da cascata proteolítica das caspases, que foram detectadas em paralelo com a expressão das MMPs (Lund et al, 1996), pode ser um dos mecanismos para a activação das MMPs, enzimas fundamentais na degradação local, rápida, e quase completa, do complexo de proteínas que constituem a matriz extracelular (Gibson, 1998). Bronckers et al (2000), sugerem que a apoptose dos condrócitos funciona como um sinal para a sua remoção pelos osteoclastos e, por exemplo, Vu et al (1998) observaram um atraso na ocorrência da apoptose dos condrócitos hipertróficos, em ratos deficientes em gelatinase B (MMP-9).

No que diz respeito à discondroplasia, existem resultados contraditórios acerca da frequência de apoptose nos condrócitos das placas de crescimento discondroplásicas, tendo alguns autores (Ling et al, 1995; Praul et al, 1997; Rath et al, 1998), registado um aumento nos seus níveis, enquanto outros (Ohyama et al, 1997), pelo contrário, observaram uma diminuição. Esta aparente contradição pode ter a ver, por um lado, com o tamanho das lesões em que foram feitas as determinações, pois trabalhos recentes (Praul et al, 1997; Rath et al, 1998), referem que as lesões grandes contêm muitos condrócitos apoptóticos, enquanto que as lesões mais pequenas contêm poucos, ou nenhuns, condrócitos apoptóticos; e, por outro, com as técnicas utilizadas na detecção dos níveis de apoptose. Vários estudos examinaram a fragmentação de DNA na ossificação endocondral utilizando uma variedade de técnicas, designadamente: detecção da fragmentação de DNA *in situ* (Aizawa et al, 1997; Amling et al, 1997; Bronckers et al, 1996; Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995; Ohyama et al, 1997; Zenmyo et al, 1996); caracterização electroforética de DNA isolado (Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995; Ohyama et al, 1997), ou detecção da fragmentação do DNA por citometria de fluxo (Hatori et al, 1995). A técnica TUNEL (*Tdt mediated dUTP-biotin Nick End Labeling*) e outras técnicas relacionadas com a detecção da fragmentação do DNA *in situ*, desenvolvidas por Gavrieli et al (1992) e outros investigadores (Gold et al, 1993; Tilly e Hsueh, 1993), são frequentemente usadas para investigar a morte celular por apoptose. Usando estas técnicas, um determinado número de estudos sugere que a fragmentação do DNA ocorre aproximadamente ao mesmo tempo da condensação dos condrócitos perto da interface com a vascularização de reabsorção. Nos estudos de Gibson et al (1995), sobre morte dos condrócitos em esterno de embriões de galinha, foi demonstrado que a fragmentação do DNA ocorre em alguns condrócitos adjacentes à vascularização de invasão, na região que contém condrócitos com uma morfologia condensada. Neste trabalho, secções seriadas demonstraram que todos os condrócitos condensados eram adjacentes à interface vascular involucionada que penetra a cartilagem neste estágio de desenvolvimento do esterno (Gibson et al, 1995). A fragmentação nucleossomal característica foi detectada no DNA isolado dos centros primários de ossificação de reabsorção, mas não se verificou no DNA isolado da mesma região do esterno de embriões ligeiramente mais novos, antes da evidência de reabsorção, o que sugere que o início da fragmentação do DNA coincide com o início da invasão vascular e com a reabsorção da cartilagem (Gibson et al, 1995). Uma localização similar em condrócitos TUNEL positivos foi descrita no molde cartilágneo de reabsorção de ratinhos recém-nascidos, na placa de crescimento de animais mais velhos, e na interface cartilagem articular-osso (Bronckers et al, 1996). A avaliação da fragmentação de DNA por citometria de fluxo em condrócitos isolados da zona de hipertrofia da placa de crescimento de galinhas, mostrou apenas 9% de DNA fragmentado, consistente com a fragmentação de DNA que ocorre num pequeno número de condrócitos hipertróficos na interface vascular (Hatori et al, 1995). Noutros trabalhos (Gibson et al, 1995; Hatori et al, 1995), utilizando a técnica TUNEL, uma grande percentagem de condrócitos hipertróficos foram marcados, mais de 30% no esterno e 48% na tíbia de galinhas adultas. Estas percentagens não foram encontradas quando se utilizaram outras técnicas para

determinação do número de células apoptóticas. Por exemplo, Hatori et al (1995), utilizando citometria de fluxo, apenas contaram 8% de condrócitos apoptóticos. Estes resultados contraditórios, evidenciam os problemas da marcação TUNEL, uma vez que a detecção *in situ* da fragmentação de DNA é muito susceptível a artefactos positivos e negativos (Gibson, 1998). Com efeito, vários factores podem implicar a quebra do DNA, designadamente, a transcrição, a replicação e reparação do DNA (Eastman e Barry, 1992; Kockx et al, 1998); atraso na fixação, ou fixação inadequada ou insuficiente (Grasl-Kraupp et al, 1995); inclusão com parafina (Gibson, 1998); e pre-tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, detergentes e proteinase K (Labat-Moleur et al, 1998; Negoescu et al, 1996). Pelo contrário, condrócitos altamente condensados, sugerindo um estágio final de apoptose, mostraram ser resistentes à marcação TUNEL (Roach et al, 1995). A condensação da cromatina, uma marca característica da apoptose, em combinação com o reticulado de DNA e das proteínas, pode impedir o acesso do reagente às terminações 3' OH dos fragmentos do DNA (Gibson, 1998). Infelizmente, as técnicas necessárias para recuperar o acesso ao DNA, são, elas próprias, susceptíveis de induzir a fragmentação do DNA (Gibson, 1998). Por outro lado, os condrócitos hipertróficos parecem ser particularmente propensos a uma degradação de DNA com artefactos (Gibson, 1998). Com efeito, a digestão com a proteinase K, em concentrações que resultam numa detecção específica de células apoptóticas em íleo de rato, resulta na marcação em praticamente todas as células da cartilagem da placa de crescimento (Roach et al, 1995) e do esterno (Gibson observações não publicadas, cit. por Gibson, 1998), em embriões de galinha. Contudo, a utilização de uma concentração mais baixa resulta numa coloração de condrócitos restrita, consistente com a identificação morfológica de células em apoptose (Gibson, 1998). Deste modo, dada a possibilidade de existência de artefactos quando se utiliza a técnica TUNEL, a identificação do estágio da diferenciação terminal em que ocorre a fragmentação do DNA permanece incerta (Gibson, 1998), e daí os resultados contraditórios por vezes encontrados por diferentes autores. Ainda no que diz respeito ao processo de ossificação endocondral, deve ser referido que Ohyama et al (1997), observaram igualmente apoptose nos osteoblastos metafisários e nos fibroblastos no ligamento pericondrial. Vários osteoblastos junto da epífise apresentavam um fenótipo apoptótico e, em locais metafisários de maturação mais avançada, foram observados níveis reduzidos de morte celular, o que indica que a apoptose dos osteoblastos está atrasada e que as células estão a completar o seu ciclo de vida normal.

De acordo com Praul et al (1997), a apoptose não é a causa principal da discondroplasia mas é secundária à formação da massa cartilágnea, característica desta patologia. Pelo contrário, Rath et al (1998) referem que, dada a fraca acessibilidade da cartilagem para a fagocitose, a qual é responsável pela remoção das células apoptóticas, a cartilagem discondroplásica, inactiva e avascular, pode persistir e contribuir para a patogénese da discondroplasia. Por outro lado, Ohyama et al (1997) também são da opinião que a discondroplasia está ligada a uma falha no processo apoptótico, traduzida pelo aumento no número de células imaturas, que sobrevivem mais do que o seu tempo de vida normal. Estes autores observaram nas placas de

crescimento normais, cerca de 15% de condrócitos da zona de proliferação e 44% de condrócitos pos-mitóticos TUNEL-positivos, enquanto nas placas de crescimento discondroplásicas de galinhas, de 3 e 11%, respectivamente. Os nossos resultados não são conclusivos quanto à participação da apoptose na discondroplasia. No entanto, é de salientar o facto do maior número de condrócitos positivos para a caspase-3 ter sido observado na zona de hipertrofia, em particular junto aos canais vasculares, tanto nas placas de crescimento normais como nas placas de crescimento discondroplásicas, um pouco mais nestas últimas, locais de reconhecida ocorrência de apoptose. Os condrócitos positivos observados nos locais de mineralização confirmam que um dos processos associados à mineralização é a apoptose (Akisaka e Gay, 1985). Quanto aos osteoblastos e aos osteoclastos, a forte expressão da caspase-3 sugere que estas proteínas, para além de participarem na apoptose, desempenham igualmente outras funções biológicas no metabolismo daquelas células (ver Chang e Yang, 2000; Philchenkov, 2003), pois não é de admitir que todas as células positivas sejam apoptóticas. Por outro lado, ainda, não é de excluir uma eventual falta de especificidade do anticorpo utilizado.

Quanto à Bcl-2, e ao contrário do que seria de esperar, em função dos dados de outros autores, apenas foram observados alguns condrócitos hipertróficos positivos, junto aos canais vasculares nas placas de crescimento normais. Com efeito, foi demonstrado por imunolocalização, em murganhos (Amling et al, 1997) e em ratos (Wang et al, 1997a; Chrysis et al, 2002), que a Bcl-2 está distribuída ao longo da placa de crescimento, com os níveis mais elevados nos condrócitos em divisão e na fase inicial de hipertrofia, e os níveis mais baixos na fase terminal de hipertrofia, em simultâneo com a vascularização metafisária (Gibson, 1998), o que está de acordo com o efeito bloqueador da Bcl-2 sobre o processo apoptótico. Não é de excluir uma eventual falta de especificidade do anticorpo utilizado. No entanto, nas placas de crescimento normais os osteoblastos apareceram intensamente marcados, bem como as estruturas vasculares. Os resultados de Fontanini et al (1998) sugerem que a Bcl-2 regula a actividade do VEGF, o que pode justificar a imunomarcagem destas estruturas. O facto de nas placas de crescimento discondroplásicas a intensidade de imunomarcagem ser menor, não nos parece que tenha a ver com alguma ligação entre a expressão da Bcl-2 e a discondroplasia. Por outro lado, o facto de algumas células hematopoiéticas positivas para a Bcl-2, estarem em pleno decurso da mitose, em particular na metafase e na anafase, sugere a participação desta proteína neste evento celular.

### **5.4.3 Vascularização**

Os mecanismos moleculares que regulam a angiogénese, nos locais de ossificação endocondral na placa de crescimento, ou nos locais de reparação de fracturas, não estão ainda devidamente elucidados. Com efeito, e embora a invasão dos vasos sanguíneos seja necessária para o normal desenvolvimento do processo de ossificação endocondral, não se



sabe ainda se é a apoptose dos condrócitos hipertróficos o estímulo para o recrutamento desses vasos, e das células especializadas na reabsorção da matriz da cartilagem, ou, se pelo contrário, é a invasão dos vasos sanguíneos o sinal para a morte dos condrócitos e para os passos subsequentes, transmitindo os sinais reguladores celulares e/ou humorais adequados (Gibson et al, 1995, 1997; Roach et al, 1998; Gerber et al, 1999). Contudo, sabe-se que os condrócitos produzem uma variedade de factores que regulam positiva e negativamente a angiogénese (ver Cancedda et al, 1995; Alini et al, 1996; Henderson et al, 1996; Lee et al, 1996; Weir et al, 1996; Horner et al, 1996, 1999; Hiraki et al, 1997; Carlevaro et al, 1997, 2000; Gerber et al, 1999; Klagsbrun e Moses, 1999).

Dado que a cartilagem é um tecido avascular, é de supor que seja rica em factores anti-angiogénicos. Com efeito, a cartilagem é resistente à vascularização devido a inibidores angiogénicos intrínsecos. Contudo, durante a ossificação endocondral, a cartilagem calcificada que se forma permite a invasão vascular, iniciando-se a substituição da cartilagem por osso. A transição da cartilagem dum estado angio-resistente para um estado angiogénico desempenha, assim, um papel fundamental na formação do osso. A base molecular para esta importante alteração fenotípica é, no entanto, ainda desconhecida. Hanahan e Folkman (1996) propõem a hipótese segundo a qual a angiogénese é regulada pelo balanço entre inibidores e indutores da proliferação e da migração das células endoteliais, pelo que o sinal angiogénico pode ser activado, ou por um aumento dos níveis dos indutores, ou por uma redução dos níveis dos inibidores. São exemplos de inibidores da angiogénese o TIMP-1 (Moses et al, 1990; 1992; ver Klagsbrun e Moses, 1999), o TIMP-2 (Ohba et al, 1995), a troponina-I (Moses et al, 1999) e a condromodulina I (Hiraki et al, 1997).

A síntese dos inibidores e dos promotores da angiogénese, depende do estado de diferenciação dos condrócitos. A cartilagem em repouso e em proliferação apresenta fortes efeitos anti-angiogénicos (Moses et al, 1990, 1992; Pepper et al, 1991). Pelo contrário, os condrócitos hipertróficos expressam uma série de factores promotores da vascularização, designadamente, FGF (*fibroblast growth factor*, Baron et al, 1994), PDGF (*platelet-derived growth factor*, Horner et al, 1996), IGF-I (*insulin growth factor*, Joyce et al, 1991; Ren et al, 1997), EGF (*epidermal growth factor*, Tajima et al, 1994; Ren et al, 1997), membros da família do TGF (*transforming growth factor*, Carrington et al, 1988; Ren et al, 1997; Horner et al, 1998), transferrina (Carlevaro et al, 1997), ESAF (*endothelial cell stimulating angiogenic factor*, McFarland et al, 1990; Brown e McFarland, 1992), VEGF (*vascular endothelial growth factor*, Gerber et al, 1999; Horner et al, 1999; Carlevaro et al, 2000; Ichigatani et al, 2001) e a MMP-9/gelatinase B (Vu et al 1998). Nos ossos longos de embriões de aves e de mamíferos, imediatamente antes da invasão vascular, por exemplo, o VEGF, apenas é observado nos condrócitos hipertróficos da placa de crescimento, não sendo, pelo contrário, observado nas zonas de repouso e de proliferação (Carlevaro et al, 2000). No entanto, de modo a produzirem actividade angiogénica, os condrócitos hipertróficos necessitam dum microambiente na matriz

extracelular adequado. De acordo com Cancedda et al (1995), condrócitos hipertróficos individuais em suspensão têm efeitos inibitórios na migração e na invasão de células endoteliais; quando suplementados com ácido ascórbico, condição que permite a organização de uma matriz extracelular similar à cartilagem *in vivo*, os condrócitos hipertróficos desencadeiam actividades angiogénicas no meio condicionado, e iniciam a síntese de transferrina, a qual foi identificada como um dos maiores factores angiogénicos neste tecido (Carlevaro et al, 1997).

### VEGF

O VEGF é um regulador chave na angiogénese fisiológica durante a embriogénese e a vida *post natal*, estando ainda implicado nos processos angiogénicos associados a várias patologias (ver Zachary e Gliki, 2001; Carmeliet, 2003; Ferrara et al, 2003). No que diz respeito ao crescimento do esqueleto, a invasão capilar mediada pelo VEGF é um sinal essencial na regulação da morfogénese da placa de crescimento, desempenhando um papel fundamental na apoptose dos condrócitos, nas funções dos condroclastos, na remodelação da matriz extracelular e na formação de osso (Gerber et al, 1999; Suda et al, 1999; Deckers et al, 2000). Em ratos, a inibição sistémica do VEGF durante períodos de rápido crescimento leva, não só a uma inibição da angiogénese, mas também a um decréscimo nos níveis de condroclastos e osteoblastos nas placas de crescimento (Gerber et al, 1999). De acordo com estes autores, a inibição da actividade do VEGF leva não só a um decréscimo na quantidade de células endoteliais, mas também a um decréscimo no número de condroclastos e osteoblastos na junção cartilagem-osso. Zelzer et al (2002) observaram, em murganhos que apenas expressam a isoforma VEGF<sub>120</sub> [existem, para além desta, mais duas outras isoformas do VEGF nos murganhos: o VEGF<sub>164</sub> e VEGF<sub>188</sub>], um atraso na invasão vascular do pericôndrio e do centro primário de ossificação, o que evidencia um papel importante do VEGF nas fases precoces e mais avançadas da vascularização da cartilagem. Estes autores sugerem, ainda, um possível papel do VEGF na maturação dos condrócitos e na regulação da actividade dos osteoblastos. Outros autores (Maes et al, 2002), observaram igualmente em murganhos VEGF<sub>120/120</sub>, que os ossos longos dos recém-nascidos apresentavam uma desregulação no padrão vascular, em simultâneo com um decréscimo de cerca de 35% no volume do osso trabecular, uma redução no crescimento ósseo e um aumento de cerca de 34% na altura da zona de hipertrofia. Por outro lado, os níveis de expressão dos genes marcadores da diferenciação dos osteoblastos e dos condrócitos hipertróficos foram significativamente mais baixos e houve um atraso na invasão inicial dos osteoclastos e das células endoteliais, associado com um decréscimo na expressão MMP-9, nos ossos dos animais VEGF<sub>120/120</sub>. Os resultados de Maes et al (2002), indicam que a expressão do VEGF<sub>164</sub> e/ou do VEGF<sub>188</sub> é fundamental para o normal desenvolvimento do osso endocondral, através da mediação da vascularização e da normal diferenciação dos condrócitos hipertróficos, dos osteoblastos, das células endoteliais e dos osteoclastos. Adicionalmente, os resultados de Deckers et al (2000) sugerem que o padrão de

expressão dos VEGFs e dos seus receptores desempenham um importante papel regulador na remodelação do osso, atraindo as células endoteliais e os osteoclastos e estimulando a diferenciação dos osteoblastos. Outros trabalhos (Niida et al, 1999; Engsig et al, 2000) evidenciaram que a invasão da cartilagem pelos osteoclastos é mediada pelo VEGF.

Está bem estabelecido que a hipoxia é um dos principais estímulos para a expressão do VEGF (Steinbrech et al, 1999). Uma vez que os condrócitos hipertróficos são avasculares, estas células são, assim, uma fonte potencial de VEGF na placa de crescimento (Gerber et al, 1999). Com efeito, Horner et al (1999) e Tatsuyama et al (2000) demonstraram que os condrócitos hipertróficos expressam o VEGF, pelo que este deve desempenhar um papel importante na regulação da invasão vascular da placa de crescimento. Segundo Ichigatani et al (2001), a presença de VEGF nas zonas de proliferação e de hipertrofia nas placas de crescimento, sugere funções importantes do VEGF na regulação da formação vascular nos ossos em crescimento. Para além dos condrócitos, o VEGF é ainda produzido por outros tipos celulares, incluindo os osteoblastos (Goad et al, 1996; Saadeh et al, 1999; Spector et al, 2001; Ichigatani et al 2001), os osteoclastos (Ichigatani et al 2001), no perióstio, no pericôndrio e na matriz da cartilagem (Ichigatani et al 2001). Estes resultados sugerem que o VEGF produzido nos osteoblastos e nos osteoclastos deve desempenhar um papel importante na formação das microveias na metáfise. Por outro lado, a sua existência no perióstio e no pericôndrio sugere que o VEGF tem uma relação estreita com a angiogénese nestas duas regiões do osso. As células osteoblásticas expressam também ambos os receptores de VEGF, pelo que o decréscimo no número de condroclastos e de osteoclastos na placa de crescimento de ratos tratados com anti-VEGF pode reflectir anomalias na sinalização do VEGFR, levando a falhas no recrutamento e/ou diferenciação destes tipos celulares (Gerber e Ferrara, 2000). Deste modo, a acumulação de condrócitos hipertróficos na placa de crescimento, em resposta a um tratamento anti-VEGF, pode ser causada pela perda dum factor derivado das células endoteliais, indutor da apoptose dos condrócitos, ou pela interferência na diferenciação dos tipos celulares especializados na reabsorção da matriz extracelular (Gerber e Ferrara, 2000). Com efeito, as enzimas degradativas, são responsáveis pela clivagem e subsequente remoção dos componentes da matriz extracelular, nomeadamente dos proteoglicanos e do colagénio (Leach e Lilburn, 1992). Assim, anomalias na actividade osteoclástica traduzem-se na disrupção da vascularização da placa de crescimento e podem dar origem a lesões similares às discondroplásicas. Por exemplo, ratos transgénicos com falhas na síntese da TRAP, a qual é um dos marcadores da actividade osteoclástica, apresentam uma zona de hipertrofia expandida, não vascularizada que se estende até à metáfise (Hayman et al, 1996). Por outro lado, ratos *knockout* para a MMP-9 apresentam igualmente uma zona de hipertrofia expandida não vascularizada (Vu et al, 1998). Áreas de células apoptóticas aparecem no centro desta zona de hipertrofia expandida como acontece na discondroplasia. A importância dos osteoclastos no normal desenvolvimento do processo de ossificação endocondral, é

evidenciada pelo facto dos osteoclastos de ratos normais expressarem a MMP-9 e um transplante de medula óssea dum animal normal recuperar o fenótipo nulo (Vu et al, 1998).

No desenvolvimento e na regeneração do osso, a angiogénese e a reabsorção de osso/cartilagem são processos essenciais e estão intimamente relacionados um com o outro, o que sugere a participação de um mediador comum para estes dois eventos biológicos (Nakagawa et al, 2000). Vários factores de crescimento são expressos, com distintos padrões temporais e espaciais, durante a reparação de fracturas, dos quais o VEGF, é particularmente importante dada a sua capacidade para induzir a neovascularização (Nissen et al, 1998). Com efeito, o VEGF desempenha um importante papel na reparação óssea, promovendo a angiogénese e estimulando os vários tipos de células do esqueleto, condrócitos, osteoblastos e osteoclastos. De acordo com Steinbrech et al (1999), os osteoblastos, através da expressão do VEGF, podem ser, em parte, responsáveis pela angiogénese e pelo incremento de fluxo sanguíneo nos segmentos de osso fracturado. O tratamento de ratos com agente neutralizante do receptor do VEGF fez decrescer a angiogénese, a formação de osso e a mineralização do *callus* em fracturas do fémur (Street et al, 2002). A inibição do VEGF traduziu-se, ainda, e de forma acentuada, na inibição da cicatrização de fracturas no córtex da tíbia, o que está de acordo com um papel autócrino directo do VEGF na diferenciação dos osteoblastos (Street et al, 2002). Para além do VEGF, nas fases finais do processo de cicatrização, coincidindo com o início da vascularização do *callus* e subsequente ossificação, foi igualmente observada a expressão da MMP13 (Ferguson et al, 1999). Tarkka et al (2003) demonstraram que o efeito do VEGF é evidenciado, em primeiro lugar, com um incremento no número de vasos sanguíneos positivos para o *FVIII-related antigen* nos locais de fractura. Por outro lado, a área proporcional de tecido reparativo remanescente foi significativamente reduzida nos animais tratados com VEGF após a indução da fractura, o que sugere efeitos favoráveis do VEGF na cicatrização do osso fracturado (Tarkka et al, 2003). Estes autores observaram, ainda, um incremento de cartilagem perióstica nas fases iniciais da cicatrização, o que sugere a existência de um processo de ossificação endocondral.

No que diz respeito aos resultados do presente trabalho, o número de condrócitos hipertróficos positivos para o VEGF, foi significativamente inferior nas placas de crescimento discondroplásicas (72,6%) relativamente às placas de crescimento normais (88,0%). Somos levados a pensar que este facto se deve à existência dum menor número de células com este fenótipo, fazendo com que, muito provavelmente, diminuam os níveis de VEGF presentes na placa de crescimento, necessários a uma perfeita angiogénese. No entanto, pensamos que a diminuição destes níveis será uma consequência da ausência da total hipertrofia dos condrócitos, que, por sua vez pode acentuar as falhas verificadas na vascularização, situação característica da discondroplasia. Por outro lado, o facto do VEGF ser um agente importante nos processos de reparação de microfracturas, situação que se verifica nas placas de

crescimento discondroplásicas, pode igualmente explicar alguma da expressão deste factor de crescimento nestas placas de crescimento.

### **Factor VIII related antigen/von Willebrand factor**

O factor Von Willebrand (ou *Factor VIII related antigen*) é uma glicoproteína plasmática de adesão, sintetizada pelas células vasculares endoteliais (Jafe et al, 1974; Sussman e Rand, 1982; Ruggeri, 2001; Denis, 2002) e pelos megacariócitos (Nachman et al, 1977; Sporn et al, 1985; Ruggeri, 2001; Denis, 2002), podendo ser encontrada no plasma e/ou no sub-endotélio vascular (Denis, 2002; Sugimoto e Miyata, 2002). Esta proteína desempenha um papel fundamental na hemostase e nas trombozes intravasculares patológicas, contribuindo para a adesão/agregação das plaquetas às paredes dos vasos com lesões e para a coagulação do sangue, através das suas múltiplas funções adesivas para os receptores de membrana das plaquetas, para o complexo Ib-IX-V, para a integrina alfa-IIb-beta3, para a heparina, para vários tipos de colagénio e para o factor de coagulação VIII (Ruggeri, 2001; Denis, 2002; Sugimoto e Miyata, 2002). O papel do factor von Willebrand no bloqueio das hemorragias tem a ver com a sua capacidade de actuar como molécula de adesão nos locais das lesões vasculares, estabelecendo a ponte entre as plaquetas e os componentes da matriz extracelular ou outras plaquetas (Sadler, 1991; Ruggeri, 2001; Varughese et al, 2002). Com efeito, nos locais das lesões vasculares, o factor von Willebrand liga-se de imediato aos colagénios expostos, facilitando, assim, a adesão das plaquetas (de Groot, 2002). A expressão do factor von Willebrand pode ser regulada a vários níveis por uma série de factores genéticos e ambientais (Denis, 2001), designadamente, inflamação, necrose, reparação de tecidos e crescimento neoplásico (Pottinger et al 1989). Deste modo, os níveis plasmáticos do factor von Willebrand são um bom indicador da existência de lesões no endotélio vascular (Boneu et al, 1975; Corda et al, 1979; Jones et al, 1988; Blann e McCollun, 1994; Mannucci, 1998). A oclusão venosa é igualmente acompanhada por um incremento nos níveis plasmáticos do factor von Willebrand (Paleolog et al, 1990). Deve ser referido, no entanto, que no decurso de algumas patologias vasculares crónicas, as propriedades reparadoras do factor von Willebrand, podem transformar-se na causa da formação de trombos patológicos e, eles próprios, levarem à oclusão dos vasos (Varughese et al, 2002). Lewinson et al (2001) observaram durante o processo de regeneração óssea, num sistema de alongamento ósseo membranoso, que os pre-osteoblastos e os osteoblastos adjacentes às novas trabéculas, ou já embebidos por osteóide, expressavam imunomarcacção positiva para o *factor VIII-related antigen*. Em simultâneo estes autores preveniram a proliferação das células osteoprogenitoras através da aplicação de forças mecânicas, situação que pode, de certo modo ser comparável ao *stress* mecânico que a matriz não degradada exerce nos condrócitos da placa de crescimento, como acontece na discondroplasia.

Relativamente aos resultados para este marcador, o facto de não ter sido observada imunomarcação nas placas de crescimento normais, por um lado, mas ter sido registada imunomarcação positiva nas placas de crescimento discondroplásicas, por outro, evidencia a existência de lesões vasculares, indutoras da síntese deste factor. Como foi referido uma das características da discondroplasia, é a incapacidade dos vasos metafisários penetrarem a matriz. Esta falha na vascularização pode ser devida a um defeito nos vasos metafisários e a expressão do vWF pode traduzir essas anomalias ou, pelo contrário ser a consequência de lesões provocadas pelo desenvolvimento desorganizado dos condrócitos e, numa outra fase das próprias trabéculas ósseas.

### **Laminina-1**

As lamininas são uma família de glicoproteínas da matriz extracelular localizadas na membrana basal, que separa as células epiteliais do estroma circundante; podem igualmente ser encontradas na membrana basal que circunda o tecido adiposo, o tecido muscular e as células nervosas periféricas (Malinda e Kleinman, 1996). Adicionalmente, as lamininas separam e ligam diferentes tecidos, o parênquima e os tecidos conjuntivos intersticiais (Aumailley e Smyth, 1998). As lamininas consistem de cadeias alfa, beta e gama com massas moleculares de 140-400 kDa, secretadas e incorporadas nas células associadas às matrizes extracelulares (Cognato e Yurchenco, 2000). Até ao momento são conhecidas oito cadeias geneticamente distintas (alfa 1, alfa 2, alfa 3, beta 1, beta 2, beta 3, gama 1, gama 2) e sete diferentes formas de ligação (laminina-1 a -7) (Timpl e Brown, 1994). As lamininas possuem sítios de ligação para vários componentes da matriz extracelular e para, pelo menos, seis diferentes receptores de integrinas, pelo que estão envolvidas em muitos tipos de interacções células-matriz (Tanzer et al, 1993; Timpl e Brown, 1994). Estas interacções mostraram ser de extrema importância no desenvolvimento embrionário e nas remodelações e homeostases tecidulares. Embora a sua principal função seja a ligação células-matriz, muitas outras funções biológicas importantes foram evidenciadas, designadamente, crescimento, diferenciação e migração celulares, crescimento de tumores e metástases, regeneração nervosa, cicatrização e angiogénese (Kleinman et al, 1985, 1993; Campbell e Terranova, 1988; Hunt, 1989; Grant et al, 1990, 1994; Cognato e Yurchenco, 2000).

O endotélio vascular é mantido, normalmente, num estado de repouso, o que reflecte a estabilidade e a integridade da parede vascular, mas, sob determinadas condições, é induzido a produzir alterações acentuadas no seu comportamento e a formar novas estruturas vasculares (Schnaper et al, 1993). As células que formam o endotélio vascular formam complexos células-células e secretam uma membrana basal (Risau e Lemmon, 1988). Esta homeostase é alterada quando se verificam agressões dos vasos, como acontece em determinados traumatismos físicos (Schwartz e Benditt, 1977), ou em situações inflamatórias (Pober e Cotran, 1990). Os sinais e os mecanismos moleculares que regulam a formação dos

vasos sanguíneos são objecto de profunda investigação, mas sabe-se já que a laminina exerce acentuados efeitos angiogénicos, participando no reconhecimento e na diferenciação das células endoteliais (Schnaper et al, 1993; Grant et al, 1994; Ponce et al, 1999). Durr et al (1996) observaram, na epífise fetal humana, a imunomarcação para a laminina mais evidente nos condrócitos maduros no centro secundário de ossificação, em particular na vizinhança dos locais de invasão vascular. Nos condrócitos das zonas de proliferação e de hipertrofia da placa de crescimento e no pericôndrio a imunomarcação foi negativa. Estes resultados sugerem um papel da laminina na cartilagem em desenvolvimento. Kai et al (1992) observaram nas epífises distais dos fêmures de ratos, imunomarcação para a laminina no citoplasma das células fibroblásticas do mesênquima e na sua matriz pericelular bem como na lamina basal dos capilares. Estes resultados sugerem que a laminina sintetizada por estas células deve participar na migração e no crescimento das células endoteliais na formação dos canais de cartilagem. Ganey et al (1995) obtiveram resultados idênticos, observando imunomarcação para a laminina na interface do endotélio e da matriz hialina.

Os resultados obtidos no presente trabalho, em que foi observada imunomarcação intensa ao longo dos canais vasculares nas placas de crescimento normais, situação que não se verificou nas placas de crescimento discondroplásicas, nas quais a imunomarcação foi rara e, quando apareceu, de fraca intensidade, evidencia um papel importante da laminina no processo de ossificação endocondral. Em nossa opinião, as diferenças no padrão de expressão verificadas entre os dois tipos de placas de crescimento são, eventualmente, uma consequência nas anomalias verificadas na vascularização, no caso da discondroplasia. No entanto, há outros dados interessantes acerca do papel da laminina no processo de ossificação e que justificam uma análise mais aprofundada. Com efeito, o recrutamento das células progenitoras dos osteoblastos envolve a sua migração e adesão aos locais de formação de osso através de interacções com proteínas da matriz (Roche et al, 1999b). Roche et al (1999a) observaram, *in vitro*, que a maior taxa de recrutamento de células osteoprogenitoras foi levada a cabo pela lamina, através dum efeito de adesão celular. Outros trabalhos (Roche et al, 1999b) *in vitro*, em células de calvária de rato deram, igualmente, indicações que a laminina-1 se ligou especificamente às células osteoprogenitoras e, Majeska et al (1993), observaram que células osteoblásticas e não-osteoblásticas se ligaram à laminina de um modo dependente do tempo de exposição e da concentração de células. Vários autores demonstraram a presença de células progenitoras dos osteoclastos na medula óssea (Burger et al, 1982, 1984). Estas células podem igualmente ser encontradas na corrente sanguínea (Helfrich et al, 1989) e diferenciarem-se em precursores dos osteoclastos sob o controlo do microambiente ósseo (Ejiri, 1983; Chambers, 1985). Uma vez que os osteoclastos apenas são observados nas superfícies das matrizes ósseas, devem existir factores de indução para a diferenciação dos osteoclastos neste tecido; pelo contrário, devem existir factores que permitam prevenir a osteoclastogénese noutros tecidos. Por outro lado, dado que os vasos sanguíneos são compostos de células endoteliais revestidas pela membrana basal, alguns componentes desta,

devem funcionar como reguladores negativos da diferenciação dos osteoclastos. Os resultados de Kukita et al (1998a), obtidos num sistema *in vitro* de células da medula óssea de rato, indicam que a laminina dos vasos sanguíneos funciona como inibidor da diferenciação dos osteoclastos, através da inibição do processo de formação dos pre-osteoclastos a partir das células progenitoras da medula óssea. O facto desta acção inibidora ter sido bloqueada através da adição do fragmento YIGSR da laminina ao sistema, sugere que o efeito regulador da laminina é mediado via receptores da laminina (Kukita et al, 1998a). Provavelmente, *in vivo*, a laminina da membrana basal dos vasos sanguíneos exerce a sua acção inibidora quando as células progenitoras dos osteoclastos contactam com ela durante a passagem pelos capilares. As células progenitoras dos osteoclastos apenas se diferenciam em pre-osteoclastos após a exposição ao microambiente ósseo propício à osteoclastogénese. Uma vez que a laminina também é encontrada nos sinusóides encontrados na medula óssea, é possível que a formação dos precursores dos osteoclastos seja regulada negativamente no tecido ósseo de modo a prevenir um excesso de formação de osteoclastos. De acordo com Kukita et al (1998a) é suposto este mecanismo auto-regulador mediado pela laminina, estar presente nas cavidades medulares, sendo o seu perfeito funcionamento fundamental para regulação do número de osteoclastos no tecido ósseo. Por outro lado, Vukicevic et al (1990) referem que a laminina tem a capacidade de promover a diferenciação dos osteoblastos em osteócitos. Estes autores sugerem que o cometimento das células indiferenciadas do mesênquima, situadas junto da membrana basal dos vasos sanguíneos, está igualmente envolvido neste processo. A laminina pode ter assim propriedades bifuncionais no metabolismo ósseo: por um lado a diferenciação das células da linha osteoblástica em osteócitos, por outro, prevenir a diferenciação dos osteoclastos. Deste modo seria interessante aprofundar a existência, ou não, de possíveis anomalias na expressão da laminina na discondroplasia

### Actina

Os microfilamentos constituintes do citosqueleto são estruturas que se observam no citoplasma das células eucarióticas sob a forma de feixes de filamentos paralelos ou de redes de filamentos anastomosados (Plancha e David-Ferreira, 1999). São constituídos fundamentalmente pela polimerização de uma proteína globular denominada actina G, que é uma das proteínas mais abundantes nas células eucarióticas, originando filamentos de actina F (Plancha e David-Ferreira, 1999). Estudos de sequenciação dos aminoácidos de actinas de diferentes origens permitem identificar seis actinas: as quatro actinas A, dos tecidos musculares, e as actinas B e G, provenientes de células musculares e não musculares (Plancha e David-Ferreira, 1999). Estas várias isoformas de actina são codificadas por uma grande família de genes. Apesar do grande número de diferentes isoformas, globalmente a actina é uma das proteínas que apresenta maior homologia estrutural ao longo da divergência das espécies (Plancha e David-Ferreira, 1999). Os microfilamentos fornecem rigidez mecânica à superfície celular, permitem às células movimentarem-se e alterarem a sua forma, e



desempenham um papel importante no transporte intracelular (Alberts et al, 1989 cit por Benjamin et al, 1994). Por outro lado, os microfilamentos de actina são cruciais para o normal desenvolvimento da angiogénese, para a permeabilidade vascular e nos processos de reparação endotelial, enfim, para a manutenção da integridade estrutural do endotélio (Wong e Gotlieb, 1990; Ingber et al, 1995; Lee e Gotlieb, 2002; ver Lee e Gotlieb, 2003).

A actina-alfa do músculo liso, é uma proteína específica deste tecido e foi descrita nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos que estão revestidos por camadas de músculo liso (Vicario et al, 2002). Todos os vasos sanguíneos têm o seu lúmen revestido por endotélio e, com excepção dos capilares, estão rodeados por uma, ou mais, camadas de células musculares lisas (DeRuiter et al, 1997). A formação da parede dos vasos sanguíneos depende, assim, do recrutamento, da proliferação, e da diferenciação dos precursores das células musculares lisas (Lee et al, 1997). O microambiente hematopoiético desempenha um papel crucial no recrutamento e na regulação do crescimento das células precursoras das células musculares lisas, quer em situações fisiológicas, quer em situações patológicas (Clark e Keating, 1995). Os resultados de vários trabalhos sugerem que as células musculares lisas da neo-íntima dos vasos sanguíneos podem ter origem nas populações celulares da medula óssea, o que fornece evidências indirectas acerca da circulação de células progenitoras das células musculares lisas neste ambiente (Peled et al, 1991; Arakawa et, 2000; Simper et al, 2002; Tamiolakis et al, 2002; Vicario et al, 2002). Os resultados de Religa et al (2002), obtidos em ratos, em modelos experimentais de transplantação de segmentos de artérias e de indução de lesões endoteliais, indicam que as células positivas para a actina-alfa encontradas na reparação da camada íntima são, em parte, originárias das células do estroma circulantes, dos hospedeiros. Pelletier et al (2000), descreveram um modelo *in vitro* para o estudo da angiogénese na medula óssea humana, no qual os pericitos e a matriz da membrana basal estão associados com as células endoteliais, e com a formação e organização dos capilares. Estes autores observaram que os pericitos que expressavam a actina-alfa, estavam espacialmente associados com os capilares e que existia um elevada correlação entre o número de capilares e os pericitos. Por outro lado, e embora neste modelo a angiogénese basal encontrada fosse dependente do VEGF, a presença de pericitos positivos para a actina-alfa, no revestimento dos tubos endoteliais, preveniu, parcialmente, a regressão destes quando o VEGF foi neutralizado. Adicionalmente, os resultados de outros autores (Campbell et al, 2001; Han et al, 2001) sugerem que em situações de lesões endoteliais o recrutamento de células derivadas da medula óssea, funciona como mecanismo complementar de reparação dos vasos. Todos estes resultados evidenciam o potencial angiogénico das populações celulares da medula óssea e a importância dos microfilamentos de actina no processo da vascularização.

De acordo com o que foi dito, julgamos que os resultados por nós obtidos relativamente à actina, são bastante interessantes. Recordemos que nas placas de crescimento normais foi

possível observar imunomarcção intensa ao longo dos canais vasculares, situação que não se verificou nas placas de crescimento discondroplásicas, nas quais a imunomarcção foi rara, dispersa e, quando apareceu, pouco intensa. No caso da actina julgamos poder estar em presença duma causa, provavelmente não a única, das anomalias verificadas na vascularização nas placas de crescimento discondroplásicas. Curiosamente, Varet et al (2003) observaram, *in vivo e in vitro*, que o fenofibrato, um agente normolipidémico, entre outros efeitos, inibe a migração das células endoteliais para a formação dos tubos capilares, devido a provocar a desorganização dos microfilamentos de actina do citosqueleto. No caso do nosso modelo, é natural que o tirame exerça um efeito semelhante, traduzido na dificuldade dos vasos penetrarem a matriz para a sua subsequente remoção. De acordo com Wise e Jennings, (1972) e Riddell (1977), a falha na vascularização, que se verifica na discondroplasia, pode ser devida a um defeito nos vasos metafisários. Deste modo, parece-nos interessante uma análise mais aprofundada, com recurso a outras técnicas, sobre as alterações observadas na expressão da actina e o seu envolvimento no desenvolvimento da discondroplasia.

A discondroplasia caracteriza-se, histologicamente, pelo aparecimento de uma massa cartilágnea avascular opaca que se estende até à metafise, numa zona em que, normalmente, existe osso trabecular (Leach e Lilburn, 1992; Rath et al, 1994). Durante o processo de ossificação endocondral, a invasão dos vasos sanguíneos, a partir da metafise, coincide com a apoptose dos condrócitos hipertróficos, com a degradação da matriz extracelular, com a mineralização da matriz extracelular, e com a formação de osso. Existem vários trabalhos que sugerem que a discondroplasia é o resultado de uma falha na completa diferenciação dos condrócitos (Hargest et al, 1985; Farquharson et al, 1992; Loveridge et al, 1993; Thorp et al, 1993), embora não seja adiantada a causa, ou causas, para esse facto. No entanto, outros trabalhos sugerem que a eventual causa para a formação das lesões discondroplásicas é uma falha na vascularização das placas de crescimento (Nie et al, 1995). Estes autores demonstraram que a falha de calcificação da matriz, nas lesões discondroplásicas, é devida a uma falha na formação de vesículas da matriz funcionais, tendo sugerido que tal facto se deve a uma disponibilidade reduzida em iões minerais, causada por um suprimento sanguíneo inadequado. Por outro lado, Hargest et al (1985) observaram que a zona de calcificação estava ausente na zona de hipertrofia abaixo da lesão. Uma vez que Shapiro et al (1988) demonstraram que a quebra na mineralização da cartilagem ocorre em associação com um incremento da vascularização e da capacidade oxidativa das células cartilágneas normais, a falha na vascularização pode contribuir para o decréscimo da mineralização na zona de hipertrofia abaixo da lesão. A falha na vascularização, que se verifica na discondroplasia, pode também ser devida a um defeito nos vasos metafisários (Wise e Jennings, 1972; Riddell, 1977), ou a uma ausência dos necessários sinais angiogénicos para que ocorra a invasão vascular (Leach e Nesheim, 1965; Poulos, 1978). Se a penetração vascular da zona de hipertrofia não ocorre, então as células vão acumular-se. À medida que o tamanho da lesão aumenta, a difusão de nutrientes para as células decresce, levando, eventualmente à morte celular

(Haynes e Walser, 1986). A questão chave que se coloca é, então, a seguinte: o que impede a penetração vascular na placa de crescimento? São as células na zona de hipertrofia que não adquirem os sinais quimioestáticos adequados, ou o defeito está nos próprios vasos sanguíneos? Riddell (1977) refere que o desenvolvimento das lesões é devido a um decréscimo no número de túneis vasculares na zona de hipertrofia. Contudo, Reiland et al (1978) e Poulos (1978) não concordam com esta hipótese. Nos seus estudos de morfologia, estes autores compararam frangos de carne (*broilers*) com poedeiras, as quais não desenvolveram a patologia. As placas de crescimento das poedeiras apresentavam um arranjo colunar mais ordenado e uma penetração vascular também mais ordenada. Nos *broilers* observaram um espessamento focal das células de transição, o que os levou à conclusão de que as propriedades da cartilagem são a razão da falta de penetração vascular. Neste contexto, é interessante notar que a produção de factores angiogénicos na placa de crescimento está fundamentalmente localizada na zona de hipertrofia (Alini et al, 1996; Gerber et al, 1999; Horner et al, 1999; Nakanishi et al, 2000), como os nossos próprios resultados sugerem, pelo menos relativamente ao VEGF – e é justamente a zona de hipertrofia que contém as células que estão ausentes nas lesões. Ren et al (1977) observaram que o IGF-I tem a sua primeira expressão em associação com os pequenos vasos na placa de crescimento com lesões discondroplásticas. Twal et al (1996), por seu lado, sugerem que o decréscimo nos níveis de bFGF, um potente angiogénico, nas lesões discondroplásticas pode ser responsável para a sua fraca e, por vezes, ausente vascularização. Loveridge et al (1993), por outro lado, observaram níveis reduzidos de TGF-beta nos condrócitos de transição das lesões discondroplásticas. Contudo, pequenas áreas de reparação nos limites das lesões tornam-se vascularizadas e as células na vizinhança dos vasos sanguíneos coram positivamente para o TGF-beta. Este factor de crescimento está implicado na indução da angiogénese (Carrington et al, 1988) e a sua presença nestas áreas das lesões sugere que é necessário para a vascularização da cartilagem. Adicionalmente, e de acordo com Ren et al (1997), o TGF-alfa é um importante modulador da angiogénese durante a ossificação endocondral, ainda que não seja de excluir a hipótese de que a expressão deste factor represente uma resposta secundária à oclusão dos canais vasculares epifisários ou um trauma dos vasos metafisários. O facto de termos observado uma expressão elevada do VEGF nas placas de crescimento discondroplásticas deve ser, provavelmente, uma resposta deste tipo. Com efeito, as elevadas concentrações de VEGF junto aos canais de cartilagem colapsados sugerem que este factor, provavelmente, desempenha alguma função na reparação dos vasos danificados e também na angiogénese, direccionando a invasão dos vasos sanguíneos metafisários pela cartilagem hipertrófica. Por outro lado, o aumento de volume dos condrócitos hipertróficos, e a matriz não reabsorvida, causam compressão vascular, o que faz aumentar a situação de *stress* nos vasos. A imunomarcção positiva do factor von Willebrand nas placas de crescimento discondroplásticas, em particular nas zonas das lesões é um indicador da existência de lesões no endotélio vascular, as quais, tanto podem ser a causa da falha na vascularização das placas de crescimento discondroplásticas, como podem ser a consequência do *stress* mecânico

provocado pela matriz acumulada e não reabsorvida. Em nossa opinião pensamos tratar-se da segunda hipótese.

Durante a formação da placa de crescimento dos ossos longos, existe uma estreita interacção dinâmica, e mutuamente exclusiva, entre as estruturas vasculares em desenvolvimento e a cartilagem, que é um dos tecidos menos vascularizado do organismo (Gerber e Ferrara, 2000). A invasão vascular da cartilagem está associada com a apoptose dos condrócitos hipertróficos, com a mineralização da matriz extracelular, com a sua degradação e com a formação de osso e, por conseguinte, a inibição da angiogénese na placa de crescimento atrasa a morte dos condrócitos, resultando na expansão e, eventualmente, na acumulação de células hipertróficas (Gerber e Ferrara, 2000). A anormal vascularização provavelmente contribui para o estabelecimento da discondroplasia e pode até ser a principal causa (Riddell, 1977; Jefferies et al, 2000). Provavelmente, os condrócitos e a matriz que circunda as lesões não estabelecem os sinais angiogénicos apropriados para estimular a normal vascularização da placa de crescimento (Praul et al, 2000). Mas não é de excluir que as alterações na placa de crescimento reflectam eventos secundários devidos à ausência de um sistema vascular condutor, e que se traduzem num decréscimo da acessibilidade dos condrócitos aos factores endócrinos e aos tipos celulares especializados na degradação da matriz. Por outro lado, alguns trabalhos (Trueta e Amato, 1970; Kleinman et al, 1991) referem que a disrupção física da vascularização metafisária resulta na formação de lesões, que podem, em nossa opinião, ser comparadas a lesões do tipo da discondroplasia. Adicionalmente, Gerber et al (1999) demonstraram que a inibição do VEGF, através da administração sistémica de uma proteína quimérica receptora em ratos, resultou em anomalias na vascularização da placa de crescimento traduzidas por uma zona de hipertrofia mais extensa e na inibição da formação de osso metafisário. Morfologicamente, as placas de crescimento destes animais apresentam características muito semelhantes às placas de crescimento com lesões discondroplásicas. Deve ainda ser referido que a invasão vascular pode ser modulada pela activação ou pela inibição das proteínases envolvidas na reabsorção da cartilagem (Moses, 1997; Vu et al, 1998; Engsig et al, 2000; Zhou et al, 2000), uma vez que a angiogénese envolve a degradação local da membrana basal que envolve o endotélio (Folkman e Shing, 1992).

#### **5.4.4 Reabsorção da cartilagem**

O *turnover* da cartilagem da placa de crescimento pode alterar-se por dois mecanismos: por um incremento da taxa proliferação dos condrócitos e da produção de matriz extracelular, sem alterações na taxa de ossificação endocondral, ou por um decréscimo na taxa de reabsorção dessa matriz, ainda que a taxa de proliferação de condrócitos seja "normal" (Cook et al, 1994). No processo de ossificação endocondral, a reabsorção da cartilagem é essencialmente levada a cabo pelos condroclastos/osteoclastos, os quais, em condições normais, estão presentes em número adequado, devidamente diferenciados e activos (Gay e Weber, 2000). No entanto,

alguns trabalhos (Dean et al, 1985; 1989; Sakiyama et al, 1994; Fuller e Chambers, 1995; Gack et al, 1995) referem que os condrócitos hipertróficos desempenham igualmente um papel importante nessa actividade, através da acção de um conjunto de proteases responsáveis pela degradação da matriz orgânica. Entre as proteinases que participam na reabsorção da cartilagem, as metaloproteinases da matriz (MMPs) têm um papel de destaque pois são capazes de degradar os vários componentes essenciais da matriz extracelular (ver Murphy e Reynolds, 2002).

Numa primeira análise, e que servirá de base a toda a discussão deste sub-capítulo, os resultados do presente trabalho sugerem, efectivamente, que os condrócitos hipertróficos desempenham um importante papel na degradação da cartilagem da placa de crescimento, dada a evidente expressão de várias MMPs nestas células e, no caso das placas de crescimento discondroplásicas, nos condrócitos junto das lesões. Convém aqui lembrar que as MMPs são produzidas como precursores inactivos sendo processadas proteoliticamente às suas formas activas no ambiente extracelular (Llano et al, 1997; Benbow e Brinckerhoff, 1997; Murphy e Knäuper, 1997), e que a sua actividade é especificamente inibida pelos TIMPs (Matrisian, 1992; Gomez et al, 1997; Clark e Murphy, 1999; Brew et al, 2000; Dew et al, 2002; Baker et al, 2002; Nagase e Brew, 2002; Woessner, 2002; Whittaker e Ayscough, 2003). Deste modo, desequilíbrios no balanço entre as actividades das MMPs e dos TIMPs, seja pela diminuição/inibição da actividade das primeiras seja por um aumento da regulação dos segundos, podem dar origem a situações patológicas caracterizadas por falhas no processo de reabsorção e na conseqüente acumulação de matriz extracelular (Gomez et al, 1997; Bord et al, 1997; 1999; Kahari et al, 1999; Huang et al, 2002; Murphy e Reynolds, 2002; Watanabe et al, 2002).

A expressão de algumas MMPs, e dos seus inibidores, foi estudada em placas de crescimento normais (Brown et al, 1989; Blavier e Delaissé, 1995; Lee et al, 1999) e nos condrócitos hipertróficos nos processos de recuperação de fracturas (Yamagiwa et al, 1999; Uusitalo et al, 2000) e algumas patologias (Hembry et al, 2001; Huang et al 2002). Brown et al (1989), por seu lado, observaram elevadas concentrações, nos condrócitos hipertróficos, ou na sua matriz adjacente e na interface vascular, de várias MMPs, incluindo a MMP1, a MMP13, a MMP2, a MMP-9 e a MMP-3. No presente trabalho foi igualmente observada a expressão destas MMPs, tanto nas placas de crescimento normais, como nas placas crescimento discondroplásicas, em particular nos condrócitos hipertróficos. Gack et al (1995) determinaram imunohistoquimicamente a expressão da MMP-1, durante o desenvolvimento embrionário em ratos, e observaram marcação positiva nos condrócitos hipertróficos e nas células osteoblásticas localizadas ao longo das trabéculas ósseas, não tendo obtido resultados positivos nos osteoclastos. Estes autores concluíram que a expressão específica da MMP-1 e a sua capacidade exclusiva para digerir colagénios dos tipos I, II, III, e X, os principais constituintes do osso, da cartilagem, e tendões, sugere um importante papel e uma função

específica desta enzima no desenvolvimento e remodelação do osso. Bord et al (1997) observaram que nos condrócitos os níveis de expressão da MMP-1 e da MMP-3 ao longo das zonas de proliferação e de hipertrofia, foram variáveis, e a MMP-3 mostrou imunomarcação positiva nas células e na matriz extracelular. Blavier e Delaisse (1995) e Nagai e Aoki (2002), revelaram a expressão da MMP-13 nos condrócitos hipertóxicos de ratos controlo e, estes últimos autores, nas regiões em que o processo de ossificação endocondral foi perturbado pela acção do *Fibroblast Growth Factor-2* a expressão da MMP-13 diminuiu significativamente. A estromalisina-1 (MMP-3) é considerada uma das principais enzimas envolvidas na degradação dos proteoglicanos e a concentração da sua actividade nas zona inferior de hipertrofia e na zona de calcificação sugere que deve ser particularmente importante no processo de mineralização (Armstrong et al, 2002). Tal como estes autores, também nós obtivemos imunomarcação para a MMP-3, nos condrócitos hipertróficos e junto aos locais de deposição de matriz óssea. Para além desta, e das outras MMPs referidas anteriormente, observámos ainda expressão nos condrócitos hipertróficos para as MMPs -7, -10, -11, -14, -15 e -16. Por outro lado, Sasano et al (1998) referem que nos condrócitos da placa de crescimento expressam a MMP-8.

Como já tínhamos referido, embora as MMPs secretadas tenham diferentes padrões de expressão, parece, no entanto, haver uma considerável redundância e sobreposição no que diz respeito às suas funções. Com efeito, murganhos deficientes em MMP-2 (Itoh et al, 1997), MMP-3 (Mudgett et al, 1998), MMP-7 (Wilson et al, 1997), MMP-9 (Vu et al, 1998), MMP-10 (Masson et al, 1998) ou MMP-12 (Hautamaki et al, 1997), todos eles são viáveis. Destes, apenas os animais deficientes em MMP-9 mostraram anomalias no desenvolvimento, envolvendo a placa de crescimento e o processo de ossificação endocondral (Vu et al, 1998; Engsig et al, 2000). No entanto, a expressão de várias MMPs nos vários tipos celulares envolvidos no desenvolvimento do esqueleto, ainda que fonte de alguma controvérsia (Uusitalo et al, 2000), sugere a sua importância nos processos de ossificação. Os resultados de Edwards et al (1996) em humanos, confirmam o papel das metaloproteinases e dos seus inibidores, em particular a colagenase (MMP-1), as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), a estromalisina (MMP-3) e o TIMP-1, nos processos de remodelação da cartilagem e da formação da cavidade medular. Outros autores observaram, em ratos, anomalias na função osteoclástica que deram origem a lesões similares às da discondroplasia. Por exemplo, ratos *knockout* para a MMP-9 apresentaram uma zona de hipertrofia estendida, não vascularizada e áreas de células apoptóticas no centro desta zona (Vu et al, 1998), tal como acontece na discondroplasia. Murganhos deficientes em MT1-MMP, mostram acentuadas falhas no processo de ossificação endocondral, traduzidas em graves anomalias esqueléticas (Holmbeck et al, 1999; Zhou et al 2000), e na invasão vascular da placa de crescimento (Zhou et al, 2000).

Os mecanismos responsáveis pela activação extracelular das pro-MMPs são complexos. Com efeito, diferentes MMPs partilham os mesmos substratos, as formas latentes de algumas delas

são, elas próprias, substratos de outras MMPs e embora possam existir os mesmos promotores, os diferentes tipos celulares que exprimem as MMPs podem ter respostas diferentes e, por vezes, contrárias a estes diferentes estímulos (Beaudeau et al, 2003). O activador fisiológico principal das MMPs é a plasmina (Murphy et al, 1999; Beaudeau et al, 2003). Uma vez fixada no seu receptor celular, a *urokinase-type plasminogen activator* (uPA), permite a activação do plasminogénio em plasmina à superfície da célula e deste modo uma activação rápida das pro-MMPs (Kirchheimer e Remold, 1989). A uPa é expressa por vários tipos celulares implicados na remodelação tissular e a sua inibição *in vitro*, reduz significativamente a degradação da matriz (Estreicher et al, 1989). O inibidor do activador do plasminogénio, o PAI-1, tem um efeito inibidor sobre a uPA e constitui, por isso, o contrapeso da cascata de activação das MMPs pela plasmina e, portanto, da actividade metaloproteásica matricial (Beaudeau et al, 2003). Os níveis seguintes de activação das MMPs constituem um ciclo de retrocontrolo, no decurso do qual a activação duma MMP conduz à activação duma outra que, por sua vez, leva à activação duma terceira, etc (Beaudeau et al, 2003). Deste modo, a plasmina activa as pro-MMP-1, pro-MMP-3 e a pro-MMP-9 nas suas formas activas respectivas, em seguida a MMP-3 activa a pro-MMP-1 na MMP-1, a qual também é capaz de activar a pro-MMP-9 (Beaudeau et al, 2003). As MT-MMP são igualmente activadoras das MMPs, em particular da MMP-2 (Hernandez-Barrantes et al, 2002), e, por outro lado, as gelatinases MMP-2 e MMP-9, podem ser activadas no seio da própria matriz extracelular através duma produção importante de radicais livres de oxigénio produzidos pelos macrófagos activados, aumentando assim a actividade metaloproteolítica local (Ohara et al, 1993). A activação coordenada de um certo número de proteinases em estado latente pode explicar, assim, degradação local, rápida e quase completa, do complexo de proteínas que constituem a matriz extracelular (Gibson, 1998). É, pois, fácil concluir que qualquer alteração nos equilíbrios existentes entre os elementos constituintes desta cascata de activação e de degradação da matriz extracelular pode dar origem a situações patológicas caracterizadas por falhas no processo de reabsorção e na conseqüente acumulação de matriz extracelular.

Do ponto de vista histológico, a discondroplasia caracteriza-se por um lado, pela acumulação de grandes quantidade de matriz extracelular, que não é reabsorvida e, por outro, pela falha na vascularização da placa de crescimento. Não foram realizados muitos trabalhos que tenham avaliado uma eventual diminuição na reabsorção da cartilagem da placa de crescimento como sendo a causa para o aparecimento de lesões discondroplásicas. Rath et al (1997), observaram uma diminuição da actividade de MMPs em lesões discondroplásicas espontâneas, sugerindo que esta redução pode ser, em parte, uma das razões para a acumulação de matriz extracelular na discondroplasia. Bai et al (1992), utilizando o modelo-cisteína, obtiveram resultados que sugerem que a cisteína pode induzir o aparecimento de lesões discondroplásicas porque interfere com o processo de reabsorção da cartilagem. Através da imunomarcação para a colagenase, enquanto nas placas de crescimento normais observaram imunomarcação positiva para a colagenase em toda a zona de hipertrofia, e na

região de transição condro-óssea, nas placas de crescimento discondroplásico observaram mostraram uma imunomarcagem similar ao tecido normal apenas na zona pre-hipertrofica e na parte superior da zona de hipertrofia, mas uma marcação bastante reduzida na parte inferior da zona de hipertrofia e na região de transição condro-óssea. Convém aqui referir que os condrócitos hipertrofos são as principais células da placa de crescimento secretoras de colagenase (Dean et al, 1985; 1989). Dado que na discondroplasia os condrócitos não atingem a hipertrofia completa, a redução da actividade da colagenase verificada por Cook e Bai (1994) nas placas de crescimento discondroplásicas, pode ser explicada, pelo menos em parte pela incapacidade em serem produzidas as quantidades necessárias à normal reabsorção da matriz. Quanto à MMP-1 (colagenase-1), utilizando um anticorpo que reage com a forma activa da enzima, recordemos que observámos condrócitos positivos em todas as zonas da placa de crescimento, com uma maior expressão, no entanto, na zona de hipertrofia, tanto nas placas de crescimento normais como nas placas da crescimento discondroplásicas e, nestas, junto às zonas de acumulação de matriz. Relativamente à MMP-13 (colagenase-3), nas placas de crescimento normais, a imunomarcagem dos condrócitos hipertrofos não foi muito evidente, ao contrário do que aconteceu com as placas de crescimento discondroplásicas em que a imunomarcagem foi por vezes, bastante intensa, em particular nas zonas em que se verificou acumulação de matriz. O facto de termos encontrado maior expressão nas placas de crescimento discondroplásicas, pode ser explicado pelo facto da matriz, embora envie os sinais necessários à síntese das enzimas, por qualquer razão esta não é activada, como pode ser o caso da MMP-13 e, uma vez que o anticorpo utilizado reage com as formas latente e activa, ficamos sem saber para qual das formas da enzima os condrócitos são positivos. Pelo contrário, no caso da MMP-1, os condrócitos expressaram a forma activa da enzima mas, por outra razão qualquer não houve degradação da matriz. Sabe-se que na discondroplasia há uma diminuição nos níveis de colagénio de tipo X (Wardale e Duance, 1996). Linsenmayer et al (1986) sugerem que este tipo de colagénio desempenha um papel importante na estimulação dos osteoclastos para a reabsorção da cartilagem da placa de crescimento. Deste modo, e se esta função existe, a diminuição de colagénio do tipo X na matriz das lesões discondroplásicas pode explicar a acumulação de condrócitos pré-hipertrofos, embora isto seja contrário ao que os nossos resultados sugerem. Pode ser que alterações na composição, ou na relação entre os diferentes constituintes da matriz podem alterar os sistemas de sinalização e estimulação da síntese e activação das colagenases.

Os resultados obtidos para as outras MMPs seguiram o mesmo padrão de expressão, ou seja, duma maneira geral, a percentagem de condrócitos positivos foi quase sempre superior, e em muitos casos, significativamente, nas placas de crescimento discondroplásicas. No caso das MMPs-3 e -10, em que os anticorpos utilizados reagem com as formas latente e activa da enzima, acontece o mesmo do que para a MMP-13 ou seja, com as técnicas utilizadas não é possível saber para qual das formas das enzimas os condrócitos são positivos. No caso da MMP-2, dado o anticorpo utilizado apenas reagir com a proMMP-2, podemos estar em



presença duma situação em que houve falha na activação da enzima, não sendo por isso possível a degradação da matriz. Refira-se a este propósito que Wardale et al (1996) observaram uma diminuição na actividade de gelatinase nas amostras das placas de crescimento com lesões. Quanto às MMPs-7, -9, -11, -14, -15 e -16, os anticorpos utilizados reagem com a forma activa das enzimas pelo que a imunexpressão observada dá indicações da síntese e da activação das enzimas. No entanto, exceptuando a MMP-9, para todas elas a expressão é duma maneira geral superior nas placas de crescimento discondroplásicas. Pensamos que acontece o mesmo do que o já referido, ou seja, a matriz envia os sinais para a síntese das enzimas e o facto de, na maior parte dos casos observar-se uma sobre-expressão nos condrócitos junto às lesões, sugere um mecanismo desse tipo. Por outro lado, como foi anteriormente referido os resultados de vários trabalhos sugerem, por exemplo, murganhos deficientes em MMP-2 (Itoh et al, 1997), MMP-3 (Mudgett et al, 1998), MMP-7 (Wilson et al, 1997), MMP-10 (Masson et al, 1998) ou MMP-12 (Hautamaki et al, 1997), todos eles são viáveis, pelo que a actividade destas MMPs pode não ser preponderante no processo de ossificação endocondral.

Pelo contrário, os resultados por nós obtidos quanto à MMP-9, são muito interessantes, dado esta enzima desempenhar um papel de destaque no processo de ossificação endocondral, pois vários trabalhos (Vu et al, 1998; Engsig et al, 2000) confirmam que os animais deficientes em MMP-9 mostram anomalias no desenvolvimento envolvendo a placa de crescimento. No presente trabalho a percentagem de condrócitos positivos (90,7%) nas placas de crescimento normais, foi significativamente mais elevada do que a percentagem de células positivas (87,3%) nas placas de crescimento discondroplásicas. Também para esta enzima foi evidente a sua expressão nos condrócitos situados junto às lesões. Estes resultados sugerem que, tal como verificado por outros autores (Bai et al, 1992; Rath et al, 1997), uma eventual diminuição na actividade de MMP-9 pode ser, pelo menos em parte, uma das razões para a acumulação de matriz extracelular na discondroplasia.

Por outro lado, os resultados por nós obtidos relativamente à expressão dos TIMPs foram igualmente interessantes, uma vez que para qualquer um deles a percentagem de condrócitos positivos foi significativamente superior nas placas de crescimento discondroplásicas. E se no caso dos TIMPs-3 e -4 pode colocar-se a questão duma eventual contagem de falsos positivos, no caso do TIMP-2 as diferenças são tão acentuadas que não nos parece que tenha acontecido este artefacto. Deste modo, a maior expressão dos TIMPs nas placas de crescimento discondroplásicas pode ser, pelo menos em parte, responsável pela inibição das MMPs, em particular da MMP-9. Como já referimos no Capítulo 2, a capacidade de inibição dos TIMPs é variável e, enquanto as formas activas das MMPs podem ser inibidas por qualquer dos TIMPs (Bord et al, 1999; Hayakawa, 2002), as pro-MMP-2 e -9, apenas são inibidas pelos TIMPs-1 e -2 (Hayakawa, 2002). Por outro lado, o TIMP-1 é mais efectivo do que o TIMP-2 na inibição da MMP-1 (Howard et al, 1991; Ward et al, 1991) e da MMP-3 (Nguyen et al, 1994).

Contudo, o TIMP-2 é mais efectivo do que o TIMP-1 na inibição da MMP-9, e foram evidenciados resultados contraditórios entre estes dois TIMPs relativamente à sua acção sobre a MMP-2 (Ward et al, 1991; Nguyen et al, 1994). Por outro lado, não existem diferenças significativas entre o TIMP-1 e o TIMP-3 na inibição da actividade das MMPs -1, -2, -3 e -9 (Apte et al, 1995) e, estes mesmos TIMPs, são cerca de 5 vezes mais efectivos do que o TIMP-2 na inibição da MMP-13 (Knauper et al, 1996). Curiosamente, a MT1-MMP é inibida pelos TIMPs-2 e -3, mas não parece ser afectada pelo TIMP-1 (Kinoshita et al, 1996; Will et al, 1996).

Convém ainda recordar que, para além da sua função de remodelação da matriz extracelular, as MMPs podem igualmente participar em muitos outros processos biológicos (ver: Vu e Werb, 2000; McCawley e Matrisian, 2001; Ortega et al, 2003; Visse e Nagase, 2003), designadamente, regulação da função imune (Opdenakker et al, 2001a,b), migração celular, proliferação celular, angiogénese (Vu et al, 1998; Zhou et al, 2000; Nguyen et al, 2001; Pepper, 2001; Jackson, 2001; Sounni et al, 2003) e apoptose (Shi et al, 1998; Vu et al, 1998; Karsdal et al, 2002), pelo que a expressão apresentada por algumas células pode estar relacionada com algum destes eventos biológicos e não com a degradação da matriz. No que diz respeito à vascularização, sabe-se que a invasão da cartilagem pelos vasos sanguíneos metafisários é um passo necessário para que se complete o processo de ossificação endocondral. Não se sabe, contudo, se é a apoptose dos condrócitos hipertróficos o estímulo para o recrutamento dos vasos sanguíneos, e das células especializadas para a degradação da matriz extracelular, ou se, pelo contrário, é a invasão dos vasos sanguíneos, o sinal para a morte dos condrócitos, e para os passos subsequentes, transmitindo os sinais reguladores celulares e/ou humorais adequados (Gibson et al, 1995, 1997; Gerber et al, 1999). Por exemplo, a vascularização incompleta em ratos deficientes em MMP-9 (Maes et al, 2002), é atribuída a uma redução na apoptose dos condrócitos hipertróficos (Vu et al, 1998) e, durante a involução da glândula mamária, a degradação da matriz extracelular pelas MMPs é necessária para que se verifique a apoptose (Lund et al, 1996; Furth, 1999). Mecanismos e interacções similares podem estar envolvidos no desenvolvimento da discondroplasia. Por outro lado é interessante notar que o TIMP-2 é um inibidor da angiogénese (Ohba et al, 1995) o que, considerando os resultados por nós obtidos, permite especular acerca duma possível ligação entre a sobre-expressão do TIMP-2 e as falhas verificadas na vascularização das placas de crescimento discondroplásicas.

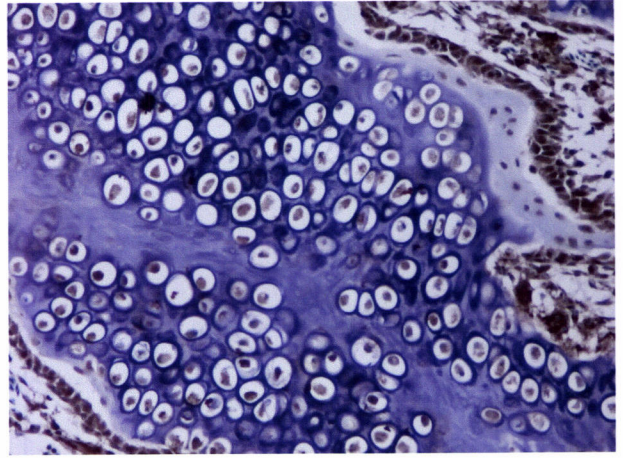
Para além dos condrócitos, e como já foi referido, as MMPs são produzidas por uma variedade de células, designadamente fibroblastos, macrófagos, osteoclastos, osteoblastos e células endoteliais e condrócitos (Delaisse et al, 1993; Gack et al, 1995; Delany e Canalis, 1998; Hayakawa, 2002; Herold, 2002; Murphy e Reynolds, 2002; Beaudoux et al, 2003). Para todas as MMPs analisadas, bem como para os TIMPs, observámos expressão nestes tipos celulares. Para além da participação directa destas células na reabsorção da cartilagem, através da síntese das MMPs, os padrões de expressão por nós observados suscitam uma outra questão e que tem a ver com uma possível interacção entre as MMPs e os TIMPs sintetizados por

diferentes tipos celulares. Com efeito, os diferentes tipos celulares que exprimem as MMPs podem ter respostas diferentes e, por vezes, contrárias a diferentes estímulos diferentes. Por exemplo, Cermelli et al (2000) referem que durante o processo de ossificação endocondral a produção de gelatinase pode ser uma resposta a situações inflamatórias locais, situação que acontece na discondroplasia, e que pode explicar a expressão de algumas MMPs por nós obtida. A existência de dois diferentes níveis de actuação de diferentes ou das mesmas MMPs, na degradação da cartilagem da placa de crescimento pode explicar os resultados contraditórios encontrados por diferentes autores. Num primeiro nível de actuação, interviriam os condrócitos hipertróficos, sintetizando as adequadas MMPs que permitiriam a invasão dos vasos e das populações de condroclastos/osteoclastos, associadas ao segundo nível de degradação da cartilagem.

Para além da eventual diminuição da actividade da MMP-9 e o aumento da actividade dos TIMPs poderem ser, pelo menos em parte, responsáveis pelo decréscimo na degradação da matriz verificado na discondroplasia, outro dado interessante do ponto de vista da biologia das interacções células-matriz, e independente do objectivo inicial do trabalho, é o facto de se ter observado um aumento de expressão das várias MMPs e TIMPs nos condrócitos junto às lesões. Estes resultados sugerem a existência de fenómenos de sinalização que justificam, em nossa opinião, um estudo mais aprofundado, com o recurso a outras técnicas. Por outro lado será importante saber se a expressão verificada, e nos caso em que isso não foi possível avaliar, diz respeito à forma latente e/ou à forma activa das enzimas.



## 6. DISCUSSÃO GERAL





## 6. DISCUSSÃO GERAL

O processo normal de ossificação endocondral envolve uma sequência ordenada e equilibrada de fenómenos desde a proliferação dos condrócitos, passando pela sua completa diferenciação, até à sua morte por apoptose, e, em condições normais, a síntese de cartilagem nas placas de crescimento está em equilíbrio perfeito com a calcificação da cartilagem, com a degradação desta e com a sua substituição por osso trabecular. Alterações nos factores que contribuem para a manutenção das homeostases mineral e celular no processo de ossificação endocondral, podem traduzir-se, assim, em anomalias, mais ou menos graves, no desenvolvimento do esqueleto (Leach e Gay, 1987; Whitehead, 1992; Sullivan, 1994; Leterrier et al, 1998; Capela e Silva et al, 1999; Capela e Silva, 2000).

A discondroplasia da tibia é uma anomalia espontânea, ou induzida, das placas de crescimento epifisárias, caracterizada pelo aparecimento de uma massa cartilagínea avascular opaca, não calcificada, que se estende até à metafise, numa zona em que, normalmente, existe osso trabecular (Leach e Lilburn, 1992; Orth e Cook, 1994; Rath et al, 1994; Whitehead, 1997). A maior parte da investigação que tem sido feita sobre a fisiologia da placa de crescimento e a discondroplasia tem-se centrado na proliferação e na diferenciação dos condrócitos, bem como nas proteínas que estes secretam para a formação da matriz extracelular. Do ponto de vista celular, as lesões discondroplásicas contêm predominantemente condrócitos pre-hipertrofos com a ausência de células completamente hipertrofiadas (Hargest et al, 1985; Thorp et al, 1993). Por outro lado, genes que em condições normais se expressam durante a hipertrofia dos condrócitos, tendem a mostrar um reduzido nível de expressão na discondroplasia, designadamente: (i) *parathyroid hormone-related peptide* (Farquharson et al, 2001), (ii) *parathyroid receptor gene* (Ben-Bassat et al, 1999), (iii) receptores da vitamina D (Berry et al, 1996), (iv) osteopontina (Knopov et al, 1995; Pines et al, 1998), (v) fosfatase alcalina e outras enzimas (Farquharson et al, 1992b, 1995; Knopov et al, 1997; Zhang et al, 1997), (vi) colagénios dos tipos II e X (Tselepis et al, 1996; Wardale e Duance, 1996; Reginato et al, 1998), (viii) sialoproteína óssea (Pines et al, 1998), (ix) *basic fibroblast growth factor* (Tsal et al, 1996), (x) proteoglicanos (Ling et al, 1996; Tselepis et al, 1996, 2000), (xi) *c-myc* (Farquharson et al, 1992a; Loveridge et al, 1993; Thorp et al, 1993), (xii) osteonectina (Wu et al, 1996), (xiii) *transforming growth factor-β* (Loveridge et al, 1993; Law et al, 1996), (xiv) *transforming growth factor-α* (Ren et al, 1997), (xv) *epidermal growth factor* (Ren et al, 1997), e, (xvi) *insulin growth factor-I* (Ren et al, 1997). Estes dados permitem concluir que a discondroplasia da tibia envolve a incapacidade dos condrócitos em atingirem o estágio terminal de hipertrofia completa (Hargest et al, 1985; Farquharson et al, 1992; Loveridge et al, 1993; Thorp et al, 1993), embora não seja ainda conhecida a causa, ou causas, para esse facto. Trabalhos mais recentes (Jefferies et al, 2000), referem que o fenótipo dos condrócitos na discondroplasia pode não reflectir apenas a ausência duma completa hipertrofia, mas estarem envolvidos mecanismos

mais complexos do que inicialmente se supunha. Outros trabalhos sugerem que a eventual causa para a formação de lesões discondroplásicas é a falha na vascularização das placas de crescimento (Nie et al, 1995). Estes autores demonstraram que a falha de calcificação da cartilagem nas lesões discondroplásicas é devida a uma falha na formação de vesículas da matriz funcionais, tendo sugerido que tal facto se deve a uma disponibilidade reduzida em iões minerais, causada por um suprimento sanguíneo inadequado. Esta falha na vascularização pode ser devida a um defeito nos vasos metafisários (Wise e Jennings, 1972; Riddell, 1975, 1977), ou devida a uma ausência dos necessários sinais angiogénicos para que ocorra a invasão vascular (Leach e Nesheim, 1965; Poulos, 1978) e, deste modo, não se verificar a reabsorção da cartilagem pelas células especializadas para esse objectivo (Bai et al, 1992; Rath et al, 1997). Neste contexto, é interessante notar que a produção de factores angiogénicos na placa de crescimento está fundamentalmente localizada na zona de hipertrofia (Alini et al, 1996; Gerber et al, 1999; Horner et al, 1999; Nakanishi et al, 2000), a qual contém justamente estas células que estão ausentes nas lesões. Para outros autores (Ohyama et al, 1997; Rath et al, 1998), o desenvolvimento de lesões discondroplásicas, pode estar relacionado com falhas no processo de apoptose dos condrócitos hipertróficos.

Pelo que foi dito, e pese embora todo o trabalho realizado ao longo de vários anos, continuam a permanecer muitas dúvidas quanto à verdadeira causa, ou causas, da discondroplasia. Para esta situação não é alheio o facto de vários factores, designadamente, nutricionais, micotoxinas e alguns ditiocarbamatos, afectarem a incidência e a gravidade das lesões discondroplásicas (Leach e Gay, 1987; Orth e Cook, 1994). A utilização destes factores como agentes indutores da discondroplasia experimental, e o conhecimento do seu modo de acção, podem ajudar a compreender melhor esta patologia e a estabelecer os seus mecanismos de indução. No entanto, a quantidade de modelos de indução tão diversos faz supor que a discondroplasia tem uma origem multifactorial, pois não é crível que os mecanismos de acção dos diferentes agentes indutores sejam exactamente o mesmos.

Embora alguns autores tenham especulado acerca do mecanismo de indução poder estar relacionado com uma interferência na conversão renal da 25-hidroxicolecalciferol para a forma biologicamente activa 1,25-dihidroxicolecalciferol [ $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ ; Sauveur e Mongin, 1978], o  $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$  apenas se mostra efectivo em situações de deficiência de cálcio (Orth e Cook, 1994). Edwards (1984), usou uma dieta com níveis baixos de Ca de modo a induzir a discondroplasia, e para testar a hipótese do metabolismo da vitamina D estar envolvido na etiologia da discondroplasia. Quando este autor administrou aos animais diariamente 1,25- ou 24,25-dihidroxicolecalciferol, a  $1,25\text{-OH D}_3$  fez decrescer a incidência de discondroplasia quando comparado com o tratamento controlo (num de três ensaios), enquanto nos outros dois fez reduzir a gravidade das lesões. Pelo contrário, o metabolito 24,25-OH não apresentou qualquer efeito quando comparado com o tratamento controlo. Noutro trabalho, Edwards (1989) observou que 1100 IUC/Kg de vitamina  $\text{D}_3$  incrementaram o crescimento mas fizeram diminuir



a incidência (73 *versus* 92%) e a gravidade das lesões discondroplásicas quando comparada com a dieta basal de controlo, sem vitamina D<sub>3</sub> adicionada.

Quanto à importância da homeostase mineral no desenvolvimento da discondroplasia, os resultados são contraditórios. Um dos modelos experimentais mais utilizado é, como se disse, a utilização de dietas desequilibradas na relação Ca/P (Rennie et al, 1993; Farquharson et al, 1995; Tselepis et al, 1996; Jefferies et al, 2000). Por outro lado, o facto de poedeiras em postura, alimentadas com rações contaminadas com tirame, terem uma elevada percentagem de ovos com deficiente calcificação da casca (Guitart et al, 1996), o facto da diminuição nos valores dos parâmetros mecânicos do tibiotarso, nos animais a quem foi administrado tirame, darem indicações dum decréscimo geral da mineralização dos ossos (Wu et al, 1990), e, ainda, o facto dos níveis séricos de cálcio em codornizes, após exposição crónica a tirame (Wedig et al, 1968), fazem supor que este químico possa exercer a sua acção ao nível do metabolismo do cálcio. Edwards (1987), sugere uma eventual formação de quelatos de cálcio, diminuindo, assim, a biodisponibilidade deste ao nível do tracto gastrintestinal, podendo, esta diminuição, estar associada com o desenvolvimento da discondroplasia. No entanto, vários trabalhos permitiram concluir que não houve efeitos dos tratamentos nos níveis plásmicos de Ca, P e Mg entre os animais afectados e não afectados, mesmo quando foram encontradas diferenças significativas na incidência de lesões (Edwards, 1985, 1987). O incremento de vários macrominerais (Ca, P e Mg) não produziu efeitos, e a suplementação com oligoelementos (Fe, Cu, Zn e Se) também não teve efeitos na incidência da patologia, embora a suplementação com F (0,04%) tenha incrementado a gravidade das lesões num dos ensaios. As cinzas do osso foram similares nos animais afectados e não afectados, e estes resultados estão de acordo com os de outros autores (Riddell, 1975; Edwards e Veltman, 1983). No entanto, nos modelos tirame e *Fusarium*, a suplementação com cobre ou com zinco fez diminuir a incidência de lesões (Wu et al, 1990; 1993). Por outro lado, estes autores encontraram igualmente uma diminuição nos níveis de Ca, P, Mg, Mn e Zn e um aumento nos níveis de S e Na na cartilagem discondroplásica quando comparada com a cartilagem normal, o que indica, claramente um menor mineralização daquela. Adicionalmente, Edwards (1987) observou uma diminuição na incidência da discondroplasia espontânea, em resultado da suplementação da dieta com vários oligoelementos, os quais não tiveram a mesma acção quando foi utilizado o modelo tiram/disulfiram.

Relativamente ao modelo *Fusarium*, Haynes e Walser (1986) sugerem uma provável diminuição da produção dos factores reguladores do processo de reabsorção, ou da actividade das próprias células dele responsáveis, mas cujos mecanismos não são bem claros. No que diz respeito ao mecanismo de acção da cisteína, parece estar relacionado com uma possível quelação do cobre e/ou, com a diminuição da degradação da cartilagem, muito em particular com um decréscimo na produção e na actividade da colagenase (Orth et al, 1991, 1992; Bai et al, 1994; Bai e Cook, 1994). O mesmo mecanismo de acção é proposto para a histidina (Cook

et al, 1994). Por seu lado, Leach e Nesheim (1972) e Sauver e Mongin (1978) apresentaram dados que sugerem que o efeito da manipulação dos electrólitos na incidência da discondroplasia é mediado através de trocas no balanço metabólico ácido-base. Sauver et al (1977), sugerem que a acidose metabólica pode interferir com o metabolismo renal da vitamina D em animais raquíticos e Sauver e Mongin (1978) referem este facto, como um potencial mecanismo envolvido na etiologia da discondroplasia.

Quanto ao modo de acção dos ditiocarbamatos, os resultados, *in vitro*, de Rath et al (1995), sugerem que o tirame exerce um efeito citotóxico nos condrócitos, provocando a sua morte, provavelmente devido a danos causados ao nível da membrana. Por outro lado, a formação de quelatos de cobre por estes químicos é outra das hipóteses avançadas para explicar o mecanismo de indução da discondroplasia (Cook et al, 1994), dado que dietas deficientes neste elemento provocam lesões histologicamente similares às da discondroplasia espontânea (Carlton e Henderson, 1964; Cook et al, 1994; Rosselot et al, 1994). Adicionalmente, e como já referimos anteriormente, existem trabalhos que demonstram que dietas com níveis elevados de cobre evitam, parcial, ou totalmente, o desenvolvimento da discondroplasia induzida pelos ditiocarbamatos (Wu et al, 1990), o que não se consegue no caso da discondroplasia espontânea (Cook et al, 1994). Deste modo, e segundo Cook et al (1994), essa acção traduzir-se-ia num decréscimo na biodisponibilidade do cobre ao nível do tracto gastrintestinal, com implicações directas na actividade das várias enzimas, distribuídas por todo o organismo, que necessitam de cobre para levarem a cabo processos biológicos essenciais (Bridges e Harris, 1988; Farquharson et al, 1989; Saenko et al, 1994; Abdel-Mageed e Oeheme, 1990; Prohaska, 1990; Eide, 1998; Smith-Mungo e Kagan, 1998; Barceloux, 1999; Iskra e Majewski, 1999; Woodbury et al, 1999; Ciriolo et al, 2000; ExPASy, 2000; Marikovsky et al, 2000; Takahashi et al, 2000; Marikovsky et al, 2000). Convém referir, no entanto, que a formação de quelatos de cobre como possível mecanismo de acção dos ditiocarbamatos é contrariada pelo facto de outros potentes quelantes de metais não induzirem a discondroplasia (Cook et al, 1994). Por outro lado, os valores dos indicadores clássicos dos níveis de cobre (actividade da superóxido-dismutase, nível de cobre no sangue ou no osso, hematócrito) não são afectados pela ingestão de ditiocarbamatos, não resultando numa situação generalizada de deficiência em cobre (Wu et al, 1990, 1993; Cook et al, 1994). Adicionalmente os níveis séricos de ceruloplasmina e de cobre do osso, são normais na discondroplasia espontânea (Lilburn e Leach, 1980). A acção do tirame poderá estar, igualmente, relacionada com uma eventual inibição da biossíntese de prostaglandinas (Watkins et al, 1991) e, uma vez que estas desempenham um importante papel no metabolismo dos condrócitos (O'Keefe et al, 1992), esta inibição contribuiria, assim, para a ocorrência das lesões. Segundo outros autores (Suzuki et al, 2000, 2001), a acção dos ditiocarbamatos pode ser exercida ao nível da síntese de proteoglicanos e da maturação de colagénio, através do bloqueio da ascorbato desidrogenase, interferindo, assim, no metabolismo do ácido retinóico, o qual regula múltiplas e importantes actividades metabólicas dos condrócitos (Shapiro et al, 1991). Estes autores sugerem ainda, que o disulfiram pode

exercer efeitos secundários na actividade da prolil-hidroxilase, enzima que desempenha um importante papel no desenvolvimento da cartilagem e dos ossos cartilagíneos (Annunen et al, 1998).

A citotoxicidade dos compostos referidos depende das suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e da susceptibilidade dos diferentes tecidos à sua acção. A reduzida vascularização da cartilagem pode, por outro lado, contribuir para um maior tempo de permanência destes compostos, e dos seus metabolitos no tecido e, assim, prolongar os seus efeitos. No caso dos ditiocarbamatos, por exemplo, a indução de lesões discondroplásicas, não é acompanhada de malformações ou de alterações histopatológicas de outros órgãos (Wu et al, 1990), inclusivamente da cartilagem articular e da cartilagem do esterno. Por estas razões, e por tudo o que se disse, é muito provável que a indução da discondroplasia, utilizando alguns dos modelos referidos não represente a etiologia biológica, real, da discondroplasia espontânea, já que: (i) o cobre consegue prevenir a discondroplasia induzida pelo tirame (Wu et al, 1990), e pela micotoxina de *Fusarium* (Wu et al, 1988), mas não tem o mesmo efeito na discondroplasia induzida pela cisteína, sendo esta, no entanto, prevenida por acção do molibdénio (Bai et al, 1994); (ii) pelo contrário, a prevenção da discondroplasia espontânea pelo cobre (Wu et al, 1990), ou pelo molibdénio (Bai et al, 1994), não foi ainda demonstrada; (iii) a formação de quelatos de cobre como possível mecanismo de acção dos ditiocarbamatos na indução da discondroplasia, contraria o facto de outros potentes quelantes de metais não induzirem esta patologia; (iv) a incapacidade da metionina em induzir a discondroplasia, quando comparada com a homocisteína, pode ter a ver com o facto desta, tal como os ditiocarbamatos e a cisteína, apresentarem um grupo terminal tiol (HS-CH<sub>2</sub>), ao contrário da metionina. No entanto, outros compostos com este grupo tiol são incapazes de provocar a discondroplasia. Por outro lado, a falta de relação entre compostos com o grupo tiol e sem o grupo tiol que induzem a discondroplasia, sugere que existe mais do que um mecanismo de indução da patologia; (v) Veltmann et al (1985), Veltmann e Linton (1986) e nós próprios (Capela e Silva e Bento, 2003, *dados não publicados*), utilizando o modelo tirame e Bai e Cook (1994), utilizando o modelo cisteína, conseguiram induzir a discondroplasia em animais de crescimento lento o que contraria o facto destas estirpes não apresentarem a patologia espontânea nem induzida por outros modelos; (vi) no modelo utilizado no presente trabalho, verificou-se a indução de lesões discondroplásicas em todos os ossos longos, em particular, e indistintamente, na tíbia e no fémur, o que contraria o facto da discondroplasia espontânea aparecer quase exclusivamente na tíbia e muito raramente nos outros ossos longos. Refira-se, a este propósito, que nos trabalhos consultados, muito raramente se encontrou referência aos diferentes ossos longos, tendo sido apenas, e quase sempre, avaliada a tíbia, inclusivamente naqueles em que foi utilizado o modelo tirame; (vii) no modelo utilizado, as primeiras lesões aparecem logo aos 4-5 dias, resultados igualmente observados por Vargas et al (1983). Por seu lado, Lawler et al (1985), utilizando o modelo *Fusarium*, observaram um incidência da ordem dos 70%, em animais com 7 dias, enquanto Bai e Cook (1994), utilizando o modelo

cisteína, observaram as primeiras lesões em animais com 10 dias. Pelo contrário, Ling et al (1995), apenas observaram lesões macroscopicamente visíveis e alterações ultra-estruturais dos condrócitos aos 21 dias de idade, em animais de linhas seleccionadas para elevada incidência de discondroplasia (69%), enquanto aos 2, 7 e 14 dias, para além de não serem visíveis lesões, a ultra-estrutura das placas de crescimento dos animais desta linha e duma linha de baixa incidência de discondroplasia (0,21%) era similar. A este propósito, convém referir que as lesões discondroplásicas não são um remanescente da cartilagem embrionária, uma vez que Bai et al (1992) referem que, aos 7 dias todo este tecido está reabsorvido. Por outro lado, Wu et al (1990), utilizando o modelo tirame, verificaram que, induzindo a patologia durante apenas os primeiros 3 e 7 dias após a eclosão, a incidência foi de 15 e 25%, respectivamente; (viii) Haynes e Walser (1986) observaram, no modelo *Fusarium*, inúmeros vacúolos de autofagia nos condrócitos hipertróficos das placas de crescimento normais, e a sua diminuição nos condrócitos das placas de crescimento afectadas, enquanto Hargest et al (1985), na discondroplasia espontânea apenas observaram este tipo de vacúolos nas placas de crescimento com lesões, estando ausentes nas placas de crescimento normais; (ix) a actividade da ceruloplasmina nos animais com discondroplasia induzida pelo tirame (Wu et al, 1990) é reduzida, enquanto é normal nos animais com discondroplasia espontânea (Lilburn e Leach, 1980); (x) nem todas as estirpes de *Fusarium* induzem a discondroplasia (Wu et al, 1991); (xi) ao contrário dos resultados de outros autores (Trueta e Trias, 1961; Thorp, 1992), que referem que as lesões estão confinadas às extremidades proximais do tibiotarso e do tarsometatarso e desenvolverem-se focalmente no lado medial das articulações, no presente trabalho foram encontradas lesões que ocupavam toda a epífise.

A discondroplasia parece, pois, ter uma origem multifactorial, pelo que as suas causas exactas permanecem ainda um enigma. Por outro lado, a investigação sobre a sua etiologia, está condicionada pelo facto das alterações que ocorrem no início das lesões, poderem ser mascaradas pelos efeitos de alterações degenerativas progressivas que se verificam na cartilagem retida, e pelos efeitos de patologias subsequentes. Com efeito, e de acordo com alguns autores (Haynes et al, 1985; Haynes e Walser, 1986), as alterações celulares que se verificam na discondroplasia, desenvolvem-se apenas após a acumulação da cartilagem, pelo que são sequelas devidas, possivelmente, a uma deplecção em nutrientes, já que os condrócitos se encontram a uma maior distância das veias epifisárias, as suas fontes de nutrientes. Estes autores observaram ainda, que as alterações estruturais apenas ocorreram nas placas de crescimento com lesões de grande tamanho e não em lesões de pequeno tamanho. A este propósito, deve ser referido que Rosselot et al (1994), ainda que *in vitro*, concluíram, igualmente, que o tamanho das lesões é, de facto, um importante factor em toda a modulação da biologia dos condrócitos nas placas de crescimento discondroplásicas. Adicionalmente, há ainda a considerar a forte componente genética desta patologia, que levou, inclusivamente, ao estabelecimento de linhas experimentais de indivíduos seleccionados para baixas e elevadas incidências de lesões (Sheridan et al, 1978; Thorp et al, 1993). Estas linhas

funcionam como modelos, de modo a permitir identificar os genes envolvidos no desenvolvimento da discondroplasia e mapear os genes candidatos, uma vez que o seu papel no início da patologia tenha sido estabelecido (Farquharson e Jefferies, 2000). A caracterização dos genes candidatos da discondroplasia tem-se concentrado nos genes conhecidos como estando associados à diferenciação e à hipertrofia dos condrócitos. Alguns deles são marcadores da hipertrofia, como sejam o colagénio de tipo X (Farquharson et al, 1995; Tselepis et al, 1996), o agrecano (Farquharson et al, 1994; Tselepis et al, 1996), a osteopontina, e a osteonectina (Wu et al, 1996; Pines et al, 1998), os quais, como anteriormente referido, aparecem desregulados na discondroplasia. Embora muitos estudos tenham identificado uma expressão diferencial dos genes, ou dos seus produtos, fornecendo, assim, pistas importantes para se perceber da natureza da patologia, muitos deles parecem estar mais associados com as anomalias macroscópicas da lesão, do que com as verdadeiras causas da doença. Uma vez que a discondroplasia envolve uma falha na diferenciação dos condrócitos, pode não ser muito adequado comparar padrões de expressão génica nas células isoladas das lesões discondroplásicas e de tecidos sãos directamente. Alguns fenótipos dos condrócitos podem estar ausentes da lesão, enquanto outros podem ser alterados. Esta falha de especificidade, pode levar a alterações predominantemente secundárias associadas com a patologia e não terem a ver, necessariamente, com a etiologia da discondroplasia. Utilizando a técnica de separação por gradientes Percoll, a qual permite fraccionar as placas de crescimento normais em fracções de condrócitos com maturação diferenciada, e assim, comparar células próximas e afastadas da lesão, Jefferies et al (1998) identificaram uma série de genes como prováveis responsáveis pela discondroplasia (Tabela 6.1).

**Tabela 6.1** Genes candidatos a responsáveis pela discondroplasia, avaliados pelos níveis de expressão em condrócitos fraccionados pela técnica Percoll (Jefferies et al, 1998)

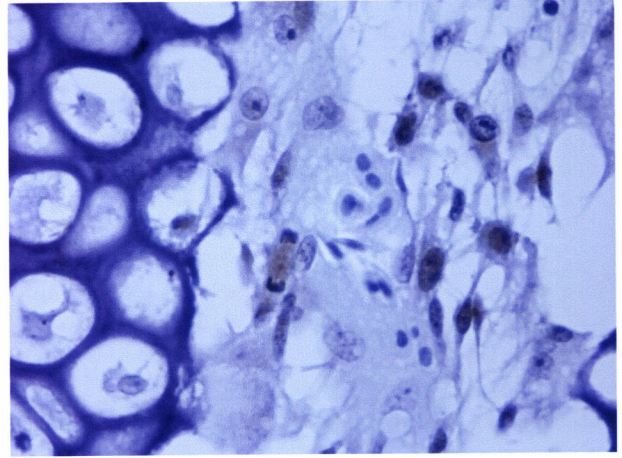
Colagénio de tipo X	Receptor da vitamina D
TGF- $\beta$ 1, $\beta$ 2 e $\beta$ 3	Receptor PTH-PTHrP
BMP- 2, 4, 5, 6 e 7	Ex-FABP
BMP receptor cinase- 1, 2 e 3	HT7
PTHrP	Caderina-B

De acordo com os resultados do presente trabalho, somos de opinião que para além destes, outros genes podem estar envolvidos na etiologia da discondroplasia, designadamente os TIMPs e algumas metaloproteinases. Os resultados relativos à actina, à laminina e à tubulina-beta são igualmente interessantes e justificam um análise mais aprofundada, com recurso a outras técnicas mais sofisticadas.

Por todas as razões apresentadas, é inequívoca a necessidade de mais investigação em que se comparem, nos mais variados aspectos, bioquímicos e morfológicos, as lesões discondroplásicas, em diferentes espécies, de situações espontâneas e induzidas, e utilizando, para cada situação, as mesmas técnicas de análise. Por outro lado, e de acordo com Praul et al (2000), seria interessante examinar em paralelo outras patologias da ossificação endocondral, com etiologia conhecida e, quando possível, recorrer ao estudo de modelos transgénicos que produzam lesões similares. Adicionalmente, e ara além do interesse directo na avaliação das causas da discondroplasia, esta patologia pode ainda ser interessante no estudo de outros fenómenos biológicos relacionados com a situação de *stress*, mecânico e bioquímico, criada pela acumulação de matriz e com fenómenos de sinalização celular influenciados por essa mesma matriz acumulada em excesso.

Em conclusão, a variedade de factores nutricionais que podem influenciar a formação de lesões, a sua natureza focal, quando espontânea e a dificuldade em mapear os componentes genéticos desta patologia, por um lado, e os efeitos na expressão das proteínas de *stress* e moléculas de adesão, por outro, - **fazem da investigação da discondroplasia um desafio excitante, e um modelo interessante para o estudo geral da discondroplasia/osteocondrose e da biologia dos mecanismos associados à ossificação endocondral.**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS







## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Mageed A. e Oeheme F.W. (1990) A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron: II Copper. *Vet Hum Toxicol*, **32**: 230-234.
- Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A. e Kemler R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, **16**: 3797-3804.
- Aberle H., Schwartz H. e Kemler R. (1966) Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem*, **61**: 514-523.
- Acar N., Moran E.T., Jr. e Mulvaney D.R. (1993) Breast muscle development of commercial broilers from hatching to twelve weeks of age. *Poult Sci*, **72**: 317-325.
- Aceitero J., Gaytan F., Banz F.B. e Ribes R. (1988) Heterogeneity of the cartilage marrow interface during uncalcified cartilage resorption in the chick embryo tibia. *J Anat*, **160**: 39-50.
- Aeschlimann D., Wetterwald A., Fleisch H. e Paulsson M. (1993) Expression of tissue transglutaminase in skeletal tissues correlates with events of terminal differentiation of chondrocytes. *J Cell Biol*, **120**: 1461-1470.
- Ahmed Z., Archer J.R. e Brown R.A. (1995) Cell proliferation within the growth plate of the tich mouse. *Bone*, **16**: 305S-310S.
- Aizawa T., Kokubun S., Kawamata T., Tanaka Y. e Roach H.I. (1999) c-myc protein in the rabbit growth plate. Changes in immunolocalisation with age and possible roles from proliferation to apoptosis. *J Bone Joint Surg Br*, **81**: 921-925.
- Aizawa T., Kokubun S. e Tanaka Y. (1997) Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. *J Bone Joint Surg [Br]*, **79-B**: 483-486.
- Akisaka T. e Gay C. (1985) The plasma membrane and matrix vesicles of mouse growth plate chondrocytes during differentiation as revealed in freeze fracture replicas. *Amer J Anat*, **173**: 269-286.
- Alberty A. (1993) The effects of physéal distraction and compression on the growth plate: an experimental study on rabbits. PhD Thesis. The Orthopaedic Hospital of the Invalid Foundation, Helsinki, Finland.
- Albrecht H., Tschopp J. e Jongeneel C.V. (1994) Bcl-2 protects from oxidative damage and apoptotic cell death without interfering with activation of NFkappaB by TNF. *FEBS Lett*, **351**: 45-48.
- Alexandrova N., Niklinski J., Bliskovsky V., Otterson G.A., Blake M., Kaye F.J. e Zajac-Kaye M. (1995) The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, **15**: 5188-5195.
- Ali S.Y. (1992) Matrix formation and mineralisation in bone. In Whitehead C.C. (ed.) Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. *Poult Sci Symp*, **23**: 19-38.
- Alini M., Marriott A., Chen T., Abe S. e Poole A.R. (1996) A novel angiogenic molecule produced at the time of chondrocyte hypertrophy during endochondral bone formation. *Dev Biol*, **176**: 124-132.

- Alini M., Matsui Y., Dodge G.R. e Poole A.R. (1992) The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: changes in composition and degradation of type II collagen. *Calcif Tissue Int*, **50**: 327-335.
- Allander E. (1994) Kashin-Beck disease. An analysis of research and public health activities based on a bibliography 1849-1992. *Scand J Rheumatol Suppl*, **99**: 1-36.
- Allen D.L., Teitelbaum D.H. e Kurachi K. (2003) Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**: C805-C815.
- Allen R.T., Hunter J. e Agrawal D.K. (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **37**: 215-228.
- Amano M., Messier B. e Leblond C.P (1959) Specificity of labelled thymidine as a deoxyribonucleic acid precursor in radioautography. *J Histochem*, **7**: 153-155.
- Ambartsumian N., Klingelhofer J., Grigorian M., Christensen C., Kriajevska M., Tulchinsky E., Georgiev G., Berezin V., Bock E., Rygaard J., Cao R., Cao Y. e Lukanidin E. (2001) The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*, **20**: 4685-4695.
- Amling M., Neff L., Tanaka S., Inoue D., Kuida K., Weir E., Philbrick W.M., Broadus A.E. e Baron R. (1997) Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol*, **136**: 205-213.
- Anderson C.E. e Parker J. (1966) Invasion and resorption in endochondral ossification: an electron microscopic study. *J Bone Joint Surg*, **48A**: 899-914.
- Andersson G., Lindunger A. e Ek-Rylander B. (1989) Isolation and characterization of skeletal acid ATPase - a new osteoclast marker? *Connect Tissue Res*, **20**: 151-158.
- Anderson H.C. (1989) Mechanisms of mineral formation in bone. *Lab Invest*, **60**: 320-330.
- Anderson H.C. (1995) Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop*, **314**: 266-280.
- Andrews L.D., Nelsom G.S., Harris G.C., Jr. e Goodwin T.L. (1975) Performance of five strains of broilers in a four-tier cage system with plastic mat floors. *Poult Sci*, **54**: 54-58.
- Andrews P.D., Orth M.W. e Cook M.E. (1989) Disulfiram and histidine induces tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *Poult Sci*, **68** (Suppl 1): 4 (Abstr).
- Angst B.D., Marozzi C. e Magee A.I. (2001) The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*, **114**: 629-641.
- Annunen P., Autio-Harmainen H. e Kivirikko K.I. (1998) The novel type II prolyl 4-hydroxylase is the main enzyme form in chondrocytes and capillary endothelial cells, whereas the type I enzyme predominates in most cells. *J Biol Chem*, **273**: 5989-5992.
- Applegate T.J. e Lilburn M.S. (2002) Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line. *Poult Sci*, **81**: 1289-1294.
- Apte S.S. (1988) Application of monoclonal antibody to bromodeoxyuridine to detect chondrocyte proliferation in growth plate cartilage in vivo. *Med Sci Res*, **16**: 405-406.

- Apte S.S. (1990) Validation of bromodeoxyuridine immunohistochemistry for localization of S-phase cells in decalcified tissues. A comparative study with tritiated thymidine autoradiography. *Histochem J*, **22**: 401-408.
- Apte S.S., Olsen B.R. e Murphy G. (1995) The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem*, **270**: 14313-14318.
- Arakawa E., Hasegawa K., Yanai N., Obinata M. e Matsuda Y. (2000) A mouse bone marrow stromal cell line, TBR-B, shows inducible expression of smooth muscle-specific genes. *FEBS Lett*, **481**: 193-196.
- Archibald J.M., Teh E.M. e Keeling P.J. (2003) Novel ubiquitin fusion proteins: ribosomal protein P1 and actin. *J Mol Biol*, **328**: 771-778.
- Arcuri C., Giambanco I., Bianchi R. e Donato R. (2002) Subcellular localization of S100A11 (S100C, calgizzarin) in developing and adult avian skeletal muscles *Biochim Biophys Acta*, **1600**: 84-94.
- Asgeirsson K.S., Jonasson J.G., Tryggvadottir L. Olafsdottir K., Sigurgeirsdottir JR., Ingvarsson S. e Ogmundsdottir (2000) Altered expression of E-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer*, **36**: 1098-1106.
- Athanasou N.A. (1996) Cellular biology of bone-resorbing cells. *J Bone Joint Surg Am*, **78**: 1096-1112.
- Athanasou N.A., Puddle B., Quinn J. e Woods C.G. (1991) Use of monoclonal antibodies to recognise osteoclasts in routinely processed bone biopsy specimens. *J Clin Pathol*, **44**: 664-666.
- Attaix D., Combaret L., Pouch M.N. e Taillandier D. (2001) Regulation of proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **4**: 45-49.
- Aumailley M., Mann K., von der Mark H. e Timpl R. (1989) Cell attachment properties of collagen type VI and Arg-Gly-Asp dependant binding to its  $\alpha 2(VI)$  and  $\alpha 3(VI)$  chains. *Exp Cell Res*, **181**: 463-474.
- Aumailley M. e Smyth N. (1998) The role of laminins in basement membrane function. *J Anat*, **193**: 1-21.
- Avila J. (1992) Microtubule functions. *Life Sci*, **50**: 327-334.
- Babich M. e Foti L.R. (1994) E-cadherins identified in osteoblastic cells: effects of parathyroid hormone and extracellular calcium on localization. *Life Sci*, **54**: PL201-208.
- Baeza E., Marché G. e Wacrenier N. (1999) Effect of sex on muscular development of the Muscovy ducks. *Reprod Nutr Dev*, **39**: 675-682.
- Baeza E., Salichon M. R., Marche G. e Juin H. (1998) Effect of sex on growth, technological and organoleptic characteristics of the Muscovy duck breast muscle. *Poult Sci*, **39**: 398-403.
- Bai M.K., Costopoulos J.S., Christoforidou B.P. e Papadimitrou C.S. (1994) Immunohistochemical detection of the c-myc oncogene product in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium. *Oncol*, **51**: 314-319.

- Bai Y. e Cook M.E. (1994) Histological study of tibial dyschondroplasia-like lesion from light-type chicks fed cysteine-supplemented diets. *Avian Dis*, **38**: 557-562.
- Bai Y., Sunde M.L., Benevenga N.J. e Cook M.E. (1992) Cysteine inhibits cartilage degradation- a possible mechanism of tibial dyschondroplasia formation. *Poult Sci*, **71 (Suppl 1)**: 6 (abs).
- Bai Y., Sunde M.L. e Cook M.E. (1993) Cysteine inhibits the adherent ability of macrophage-like cells isolated from chick tibiae. *Poult Sci*, **72 (Suppl 1)**: 58 (Abstr).
- Bai Y., Sunde M.L. e Cook M.E. (1994) Molybdenum but not copper counteracts cysteine-induced tibial dyschondroplasia in broiler chicks. *J Nutr*, **124**: 588-593.
- Baillón-Plaza A., Lee A.O., Veson E.C., Farnum C.E. e van der Meulen M.C.H. (1999) BMP-5 Deficiency alters chondrocytic activity in the mouse proximal tibial growth plate. *Bone*, **24**: 211-216.
- Baimbridge K.G., Celio M.R. e Rogers J.H. (1992) Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*, **15**: 303-308.
- Baker A.H., Edwards D.R. e Murphy G. (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci*, **115**: 3719-3727.
- Barceloux D.G. (1999) Copper. *Clinical Toxicol*, **37**: 217-230.
- Barger S.W. e Van Eldik L.J. (1992) S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem*, **267**: 9689-9694.
- Barnea A., Cho G. e Colombani-Vidal M. (1985) A role of extracellular copper in modulating prostaglandin E2 (PGE2) action: facilitation of PGE2 stimulation of the release of gonadotropin-releasing hormone (LHRH) from medium eminence explants. *Endocrinol*, **117**: 415-417.
- Baron J., Klein K.O., Yanovski J.A., Novosad J.A., Bacher J.D., Bolander M.E. e Cutler G.B Jr. (1994) Induction of growth plate cartilage ossification by basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*, **135**: 2790-2793.
- Barracough R. (1998) Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1448**: 190-199.
- Barreto C. e Wilsman N.J. (1994) Hypertrophic chondrocyte volume and growth rates in avian growth plates. *Res Vet Sci*, **56**: 53-61.
- Bartels J.E., McDaniel G.R. e Hoerr F.J. (1989) Radiographic diagnosis of tibial dyschondroplasia in broilers: a field selection technique. *Avian Dis*, **33**: 254-257.
- Bartoli G.M., Muller A., Cadenas E. e Sies H. (1983) Antioxidant effect of diethyldithiocarbamate on microsomal lipid peroxidation assessed by low level chemiluminescence and alkane production. *FEBS Lett*, **164**: 371-374.
- Bashir T. e Pagano M. (2003) Aberrant ubiquitin-mediated proteolysis of cell cycle regulatory proteins and oncogenesis. *Adv Cancer Res*, **88**: 101-144.
- Battaglino R., Kim D., Fu J., Vaage B., Fu X.Y. e Stashenko P. (2002) c-myc is required for osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res*, **17**: 763-773.

- Beaudeau J.-L., Giral P., Bruckert E., Foglietti M.-J. e Chapman M.J. (2003) Métalloprotéases matricielles et athérosclérose. Perspectives thérapeutiques. *Ann Biol Clin*, **61**: 147-158.
- Behrens J. (1999) Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, **18**: 15-30.
- Ben-Bassat S., Genina O., Lavelin I., Leach R.M. e Pines M. (1999) Parathyroid receptor gene expression by epiphyseal growth plates in rickets and tibial dyschondroplasia. *Mol Cell Endocrinol*, **149**: 185-195.
- Benjamin M., Archer C.W. e Ralphs J.R. (1994) Cytoskeleton of cartilage cells. *Microscopy Reserch and Technique*, **28**: 372-377.
- Bennett J.H., Moffatt S. e Horton M. (2001) Cell adhesion molecules in human osteoblasts: structure and function. *Histol Histopathol*, **16**: 603-611.
- Benya P.D., Brown P.D. e Padilla S.R. (1988) Microfilament modification by dihydrocytochalasin-b causes retinoic acid-modulated chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape. *J Cell Biol*, **106**: 161-170.
- Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F. e Forte M. (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*, **26**: 112-117.
- Berry J.L., Farquharson C., Whitehead C.C. e Mawer E.B. (1996) Growth plate chondrocyte vitamin D receptor number and affinity are reduced in avian tibial dyschondroplastic lesions, *Bone*, **19**: 197-203.
- Bio-Óptica Milano (2002) <http://www.bio-optica.it>
- Bjornland K., Bratland A., Rugnes E., Pettersen S., Johansen H.T., Aasen A.O., Fodstad O., Ree A.H. e Maelandsmo G.M. (2001) Expression of matrix metalloproteinases and the metastasis-associated gene S100A4 in human neuroblastoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Pediatr Surg*, **36**: 1040-1044.
- Bjornland K., Winberg J.O., Odegaard O.T., Hovig E., Loennechen T., Aasen A.O., Fodstad O. e Maelandsmo G.M. (1999) S100A4 involvement in metastasis: deregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in osteosarcoma cells transfected with an anti-S100A4 ribozyme. *Cancer Res*, **59**: 4702-4708.
- Blair C., Zaidi M. e Schlesinger P.H. (2002) Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J*, **364**: 329-341.
- Blair H.C. (1998) How the osteoclast degrades bone. *BioEssays*, **20**: 837-846.
- Blair H.C., Dean D.D., Howell D.S., Teitelbaum S.L. e Jeffrey J.J. (1989) Hypertrophic chondrocytes produce immunoreactive collagenase in vivo. *Connect Tissue Res*, **23**: 65-73.
- Blair H.C., Teitelbaum S.L., Ghiselli R. e Glick S. (1989) Osteoblastic bone resorption by a polarised vacuolar proton pump. *Science*, **245**: 855-857.
- Blann A.D. e McCollum C.N. (1994) Von Willebrand factor, endothelial cell damage and atherosclerosis. *Eur J Vasc Surg*, **8**: 10-15.

- Blavier L. e Delaissé J.M. (1995) Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J Cell Sci*, **108**: 3649-3659.
- Bonaldo P., Russo V., Bucciotti F., Doliana R. e Columbatti A. (1990) Structural and functional features of the  $\alpha 3$  chain indicate a bridging role for chicken collagen type VI in connective tissues. *Biochem*, **29**: 1245-1254.
- Bond P.L., Sullivan TW., Douglas J.H. e Robeson L.G. (1991) Influence of age, sex, and method of rearing on tibia length and mineral deposition in broilers. *Poult Sci*, **70**: 1936-1942.
- Boneu B., Abbal M., Plante J. e Bierme R. (1975) Factor VIII complex and endothelial damage. *Lancet*, **1**: 1430. Letter.
- Bonkhoff H., Fixemer T., Hunsicker I. e Remberger K. (1999) Simultaneous detection of DNA fragmentation (apoptosis), cell proliferation (MIB-1), and phenotype markers in routinely processed tissue sections. *Virchows Arch*, **434**: 71-73.
- Bord S., Horner A., Beeton C.A., Hembry R.M. e Compston J.E. (1999) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1): Distribution in normal and pathological human bone. *Bone*, **24**: 229-235.
- Bord S., Horner A., Hembry R.M. e Compston J.E. (1998) Stromelysin-1 (MMP-3) and Stromelysin-2 (MMP-10) expression in developing human bone: potential roles in skeletal development. *Bone*, **23**: 7-12.
- Bord S., Horner A., Hembry R.M., Reynolds J.J. e Compston J.E. (1997) Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J Anat*, **191**: 39-48.
- Boskey A.L. (1981) Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin Orthop*, **157**: 225-257.
- Boskey A.L. (1992) Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop*, **281**: 244-274.
- Boskey A.L., Boyan B.D. e Schwartz Z. (1997) Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel. *Calcif Tissue Int*, **60**: 309-315.
- Boskey A.L., Stiner D., Binderman I. e Doly S.B. (2000) Type I collagen influences cartilage calcification: an immunoblocking study in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell cultures. *J Cell Biochem*, **79**: 89-102.
- Bouletreau P.J., Warren S.M., Spector J.A., Steinbrech D.S., Mehrara B.J., Longaker M.T. (2002) Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg*, **110**: 139-148.
- Boyde A. e Shapiro I.M. (1987) Morphological observations concerning the pattern of mineralization of the normal and the rachitic chick growth cartilage. *Anat Embryol*, **175**: 457-466.
- Bradham D.M., Passaniti A. e Horton W.E. Jr. (1994) Mesenchymal cell chondrogenesis is stimulated by basement membrane matrix and inhibited by age-associated factors. *Matrix Biol*, **14**: 561-571.

- Breur G.J., Lapierre M.D., Kazmierczak K., Stechuchak K.M. e McCabe G.P. (1997) The domain of hypertrophic chondrocytes in growth plates growing at different rates. *Calcif Tissue Int*, **61**: 418-425.
- Breur G.J., Turgai J., Vanenkevort B.A., Farnum C.E. e Wilsman N.J. (1994) Stereological and serial section analysis of chondrocytic enlargement in the proximal tibial growth plate of the rat. *Anat Rec*, **239**: 255-268.
- Breur G.J., Van Enkevort B.A., Farnum C.E. e Wilsman N.J. (1991) Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res*, **9**: 348-359.
- Brew K., Dinakarpanadian D. e Nagase H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta*, **1477**: 267-283.
- Bridges C.H e Harris E.D. (1988) Experimentally induced cartilaginous fractures (*osteocondritis dissecans*) in foals fed low-copper diets. *J Am Vet Med Assoc*, **193**: 215-221.
- Brighton C.T. (1978) Structure and function of the growth plate. *Clin Orthop*, **136**: 22-32.
- Brighton C.T. (1984) The growth plate. *Clin Orthop Clin N Am*, **15**: 571-595.
- Brighton C.T. e Heppenstall R.B (1971) Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. An *in vitro* and *in vivo* study in rats and rabbits. *J Bone Joint Surg Am*, **53**: 719-728.
- Brighton C.T. e Hunt R.M. (1978) The role of mitochondria in growth plate calcification as demonstrated in a rachitic model. *J Bone Joint Surg Am*, **60**: 630-639.
- Brighton C.T., Sugioka Y. e Hunt R. (1973) Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes. Quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with special reference to the fate of hypertrophic cells. *J Bone Joint Surg Am*, **55**: 771-784.
- Brighton C.T., Sugioka Y. e Hunt R. (1982) Quantitative zonal analysis of cytoplasmic structures of growth plate chondrocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Bone Joint Surg Am*, **64**: 1336-1349.
- Bronckers, A.L.J.J., Goei W., Luo G., Karsenty G., Dsouza R.N., Lyaruu D.M. e Burger E.H. (1996) DNA fragmentation during bone formation in neonatal rodents assessed by transferase-mediated end labeling. *J Bone Miner Res*, **11**: 1281-1291.
- Bronckers, A.L.J.J., Goei W., van Heerde W.L., Dumont E.A.W.J., Reutelingsperger C.P.M. e van den Eijnde S.M. (2000) Phagocytosis of dying chondrocytes by osteoclasts in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labelling. *Cell Tissue Res*, **301**: 267-272.
- Brown C.C., Hembry R.M. e Reynolds J.J. (1989) Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J Bone Joint Surg*, **71**: 580-593.
- Brown J.C. e Timpl R. (1995) The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol*, **107**: 484-490.
- Brown R.A. e McFarland C.D. (1992) Regulation of growth plate cartilage degradation *in vitro*: effects of calcification and a low molecular mass angiogenic factor (ESAF). *Bone*, **17**: 49-57.

- Buckwalter J.A. (1983) Proteoglycan structure in calcifying cartilage. *Clin Orthop*, **172**: 207-232.
- Buckwalter J.A., Mower D., Ungar R., Schaeffer J. e Ginsberg B. (1986) Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am*, **68**: 243-255.
- Buffington D.E., Kleven S.H. e Jordan K.A. (1975) The incidences of leg and foot abnormalities in Wrolstad white turkeys. *Poult Sci*, **54**: 457-461.
- Burger E.H., Van der Meer J.W., van de Gevel J.S., Gribnau J.C., Thesingh G.W. e van Furth R. (1982) In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, **156**: 1604-1614.
- Burger E.H., van der Meer J.W. e Nijweide P.J. (1984) Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells. *J Cell Biol*, **99**: 1901-1906.
- Burkitt M.J., Bishop H.S., Milne L., Tsang S.Y., Provan G.J., Nobel C.S., Orrenius S. e Slater A.F. (1998) Dithiocarbamate toxicity toward thymocytes involves their copper-catalyzed conversion to thiuram disulfides, which oxidize glutathione in a redox cycle without the release of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys*, **353**: 73-84.
- Burns R.G. (1995) Analysis of the  $\gamma$ -tubulin sequences: implications for the functional properties of  $\gamma$ -tubulin. *J Cell Sci*, **108**: 2123-2130.
- Burton R.W., Sheridam A.K. e Howlett C.R. (1981) The incidence and importance of tibial dyschondroplasia to the commercial broilers industry in Australia. *Br Poult Sci*, **22**: 153-160.
- Cahaner A. e Leenstra F. (1992) Effects of high temperature on growth and efficiency of male and female broilers from lines selected for high weight gain, favorable feed conversion, and high or low fat content. *Poult Sci*, **71**: 1237-1250.
- Campbell J.H., Han C.L. e Campbell G.R. (2001) Neointimal formation by circulating bone marrow cells. *Ann N Y Acad Sci*, **947**: 18-24; discussion 24-25.
- Campbell J.H. e Terranova V.P. (1988) Laminin: molecular organization and biological function. *J Oral Pathol*, **17**: 309-323.
- Campo R.D e Romano J.E. (1986) Changes in cartilage proteoglycans associated with calcification. *Calci Tissue Int*, **39**: 175-184.
- Cancedda R., Cancedda F.D. e Castagnola P. (1995) Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol*, **169**: 265-358.
- Cancedda R., Castagnola P., Cancedda F.D., Dozin B. e Quarto R. (2000) Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol*, **44**: 707-714.
- Capela e Silva F. (2000) Rotação do tibiotarso em avestruzes (*Struthio camelus*). *Rev Port Zootecnia*, **1**: 164-166.
- Capela e Silva F., Cabrita A.S., Pinelas A. e França B. (1999a) A light microscopic study of the growth plates of the leg bones in ostrich (*Struthio camelus*) with tibiotarsal rotation. *IV International Symposium on Experimental Techniques*. 29-30 January, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal
- Capela e Silva F., Cabrita, A.M.S., Pinelas, A. e França, M.B. (1999b) Histology of the growth plates of the leg bones in ostrich (*Struthio camelus*) with tibiotarsal rotation. *Poultry*



- Science Association, 88th Annual Meeting, Springdale, Arkansas. *Poultry Sci*, **Poscal 78** (supplement 1): 29.
- Capela e Silva F., Cabrita A.S., Rafael A., Carvalho M., Conceição J., Pinelas A. e França B. (1999b) Effects of tetramethylthiuram disulfide (thiram) on endochondral ossification in rats Wistar. *IV International Symposium on Experimental Techniques*. 29-30 January. Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.
- Capela e Silva F., Pimentel S., Lamy E., Rafael A. e Cabrita A.S. (2002) Histological effects of lead on growth plate in growing chickens *VII International Symposium on Experimental Techniques*, 16-17 December, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Capps S.C. (1998) Effect of tibial dyschondroplasia on broiler growth and cancellous bone mechanical properties. *Avian Dis*, **42**: 162-167.
- Carlevaro M.F., Albini A., Ribatti D., Gentili C., Benelli R., Cermelli S., Cancedda R. e Cancedda F.D. (1997) Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization. *J Cell Biol*, **136**: 1375-1384.
- Carlevaro M.F., Cermelli S., Cancedda R. e Cancedda F.D. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci*, **113**: 59-69.
- Carmeliet P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature Med*, **9**: 653-660.
- Carmeliet P., Moons L. e Collen D. (1998) Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res*, **39**: 8-33.
- Cancedda F.D., Cancedda R. e Castagnola P. (1995) Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol*, **169**: 265-358.
- Cancedda F.D., Melchiori A., Benelli R., Gentili R., Masiello L., Campanile G., Cancedda R. e Albini A. (1995) Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth plate chondrocytes during in-vitro differentiation: dependence on extracellular-matrix assembly. *European J Cell Biol*, **66**: 60-68.
- Carlevaro M.F., Albini A., Ribatti D., Gentili C., Benelli R., Cermelli S., Cancedda R. e Cancedda F.D. (1997) Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization. *J Cell Biol*, **136**: 1375-1384.
- Carlevaro M.F., Cermelli S., Cancedda R. e Cancedda F.D. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci*, **113**: 59-69.
- Carlton W.W. e Henserson W. (1964) Skeletal lesions in experimental copper-deficiency in chickens. *Avian Dis*, **8**: 48-55.
- Carrington J.L., Roberts A.B., Flanders K.C., Roche N.S. e Reddi A.H. (1988) Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor beta during endochondral bone development. *J Cell Biol*, **107**: 1969-1975.
- Carrino D.A., Sorrell J.M. e Caplan A.I. (1999) Dynamic expression of proteoglycans during chicken skeletal muscle development and maturation. *Poult Sci*, **78**: 769-777.

- Castanet J., Grandin A., Abourachid A. e Ricqlès A. (1996) Expression de la dynamique de croissance dans la structure de l'os périostique chez *Anas platyrhynchos*. *C R Acad Sci Paris, (Sciences de la Vie, Biologie et pathologie animales)*, **319**: 301-308.
- Cermelli S., Zerega B., Carlevaro M., Gentili C., Thorp B., Farquharson C., Cancedda R. e Cancedda F.D. (2000) Extracellular fatty acid binding protein (Ex-FABP) modulation by inflammatory agents: "physiological" acute phase response in endochondral bone formation. *Eur J Cell Biol*, **79**: 155-164.
- Chambers T.J. (1985) The pathobiology of the osteoclast. *J Clin Pathol*, **38**: 241-252.
- Chambers T.J., Owens J.M., Hattersley G., Jat P.S. e Noble MD. (1993) Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the H-2KbtsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 5578-5582.
- Chan D. e Jacenko O. (1998) Phenotypic and biochemical consequences of collagen X mutations in mice and humans. *Matrix Biol*, **17**: 1169-1184.
- Chang C. e Werb Z. (2001) The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, **11**: S37-S43.
- Chang H.Y. e Yang X. (2000) Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**: 821-846.
- Chano T., Ishizawa M., Matsumoto K., Morimoto S., Hukuda S. e Okabe H. (1995) The identity of proliferating cells in bone tumors with cartilaginous components: evaluation by double-immunohistochemical staining using proliferating cell nuclear antigen and S-100 protein. *Eur J Histochem*, **39**: 21-30.
- Chen F., Kerner M.B., Dorfman H.D., Hamerman D. (1990) The distribution of S-100 protein in articular cartilage from osteoarthritic joints. *J Rheumatol*, **17**: 1676-1681.
- Chen Q., Fitch J.M., Linsenmayer C. e Linsenmayer T.F. (1992) Type X collagen: covalent crosslinking to hypertrophic cartilage-collagen fibrils. *Bone Miner*, **17**: 223-227.
- Cheng S.L., Lecanda F., Davidson M.K., Warlow P.M., Zhang S.F., Zhang L., Suzuki S., St. John T. e Civitelli R. (1998) Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res*, **13**: 633-644.
- Cherel Y., Beaumont C., Wyers M., Fleury R. e Delavigne M. (1991) Estimation of incidence and heritability of tibial dyschondroplasia in turkeys. *Avian Pathol*, **20**: 387-401.
- Cheung W.H., Lee K.M., Fung K.P. e Leung K.S. (2001) Growth plate chondrocytes inhibit neo-angiogenesis – a possible mechanism for tumour control. *Cancer Lett*, **163**: 25-32.
- Chiang H.L., Terlecky S.R., Plant C.P. e Dice J.F. (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, **246**: 382-385.
- Chin J.E., Elaine E.M., Kemick M.S. e Wuthier R.E. (1986) Effect of synthetic human parathyroid hormone on the levels of alkaline phosphatase activity and formation of alkaline-rich matrix vesicles by primary cultures of chicken epiphyseal growth plate chondrocytes. *Bone Miner*, **1**: 421-436.
- Chowdhury V.S. e Yoshimura Y. (2002) Changes in the population of immunoreactive S-100-positive folliculo-stellate cells in hens during induced molting. *Poult Sci*, **81**: 556-560.

- Chrysis D., Nilsson O., Ritzen E.M. e Savendahl L. (2002) Apoptosis is developmentally regulated in rat growth plate. *Endocrine*, **18**: 271-278.
- Chu Q., Wu W., Cook M.E. e Smalley E.B. (1995) Induction of tibial dyschondroplasia and supression of cell-mediated immunity in chickens by *Fusarium oxysporum* grown on sterile corn. *Avian Dis*, **39**: 100-107.
- Chu Q., Wu W., Cook M.E. e Smalley E.B. (1996) Elevated plasma glycosaminoglycans in chickens with tibial dyschondroplasia induced by a *Fusarium oxysporum* isolate. *Avian Dis*, **40**: 715-719.
- Church L.E. e Johnson L.C. (1964) Growth of long bones in the chicken. Rates of growth in lenght and diameter of the humerus, tibia, and metatarsus. *Am J Anat*, **114**: 521-538.
- Cidadão A.J e Rodrigo F.G. (1999) Matriz Extracelular. In Azevedo C. (Coord) *Biologia Celular*. LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa. pp. 65-81.
- Ciechanover A. e Schwartz A.L. (2002) Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins in health and disease. *Hepatology*, **35**: 3-6.
- Ciriolo M.R., De Martino A., Lafavia E., Rossi L., Carri M.T. e Rotilio G. (2000) Cu/Zn-Superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells. *J Biol Chem*, **275**: 5065-5072.
- Clark B.R. e Keating A. (1995) Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci*, **770**: 70-78.
- Clark I.M. e Murphy G. (1999) Matrix Proteinases. In Seibel M.J., Robins S.P. e Bilezikian J.P. (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Academic Press, San Diego. pp: 137-150.
- Clarke D.J. (2002) Proteolysis and the cell cycle. *Cell Cycle*, **1**: 233-234.
- Cohen (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **326**: 1-16.
- Cognato H. e Yurchenco P.D. (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, **218**: 213-234.
- Compton M.M. (1992) A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev*, **11**: 105-119.
- Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*, **296**: 1254-1258.
- Cook M.E., Bai Y. e Orth M.W. (1994) Factors influencing growth plate cartilage turnover. *Poult Sci*, **73**: 889-896.
- Cook M.E., Patterson P.H. e Sunde M.L. (1984) Leg deformities: Inability to increase severity by increasing body weight of chicks and poults. *Poult Sci*, **63**: 620-627.
- Corda R., Alberti M., Caocci L., Putzolu G. e Mannucci P.M. (1979) An increased factor VIII antigen as an indicator of endothelial damage in measles. *Thromb Res*, **14**: 805-810.
- Cowell H.R., Hunziker E.B. e Rosenberg L. (1987) The role of hypertrophic chondrocytes in endochondral ossification and in the development of secondary centers of ossification. *J Bone Joint Surg Am*, **69**: 159-161.

- Crespo R., Stover S.M., Taylor K.T., Chin R.P. e Shivaprasad H.L. (2000) Morphometric and mechanical properties of femora in young adult male turkeys with and without femoral fractures. *Poult Sci*, **79**: 602-608.
- Croucher P.I. e Russel R.G. (1999) Growth factors. In Seibel M.J., Robins S.P. e Bilezikian J.P. (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Academic Press, San Diego. pp: 83-95.
- Dalvi, R.R. (1988) Toxicology of thiram (tetramethylthiuram disulfide): a review. *Vet Hum Toxicol*, **30**: 480-482.
- D'Angelo M., Billings P.C., Pacifici M., Leboy P.S. e Kirsch T. (2001) Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP): a role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, **276**: 11347-11353.
- Dascalu A., Korenstein R., Oron Y. e Nevo Z. (1996) A hyperosmotic stimulus regulates intracellular pH, calcium, and S-100 protein levels in avian chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **227**: 368-373.
- Daumer K.M., Taparowsky E.J., Hall D.J. e Steinbeck M.J. (2002) Transcription from the tartrate-resistant acid phosphatase promoter is negatively regulated by the Myc oncoprotein. *J Bone Miner Res*, **17**: 1701-1709.
- Davies I.H. e Munro R. (1999) Osteochondrosis in bull beef cattle following lack of dietary mineral and vitamin supplementation. *Vet Rec*, **145**: 232-233.
- Dean D.D., Muniz O.E., Berman I., Pita J.C., Carreno M.R., Woessner J.F. e Howell D.S. (1985) Localization of collagenase in the growth plate of rachitic rats. *J Clin Invest*, **76**: 716-722.
- Dean D.D., Muniz O.E, Woessner J.F. Jr e Howell D.S. (1990) Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by rat growth plates in culture. *Matrix*, **10**: 320-330.
- Dean D.D., Muniz O.E. e Howell D.S. (1989) Association of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) with hypertrophic cell enlargement in the growth plate *Matrix*, **9**: 366-375.
- DeCaprio A.P., Spink D.C., Chen X., Fowke J.H., Zhu M. e Banks S. (1992) Characterization of isothiocyanates, thioureas, and other lysine adduction products in carbon disulfide-treated peptides and proteins. *Chem Res Toxicol*, **5**: 496-504.
- Deckers M.M., Karperien M., van der Bent C., Yamashita T., Papapoulos S.E., Lowik C.W. (2000) Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*, **141**: 1667-1674.
- de Groot P.G. (2002) The role of von Willebrand factor in platelet function. *Semin Thromb Hemost*, **28**: 133-138.
- Delaisse J.M., Eeckhout Y., Neff L., Francois-Gillet C., Henriet P., Su Y., Vaes G. e Baron R. (1993) (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J Cell Sci*, **106**: 1071-1082.
- Delany A.M. e Canalis E. (1998) Dual regulation of stromalysin-3 by fibroblast growth factor-2 in murine osteoblasts. *J Biol Chem*, **273**: 16595-16600.

- DeLise A.M., Fischer L. e Tuan R.S. (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, **8**: 309-334.
- Del Razo L.M., Quintanilla-Vega B., Brambila-Colombres E., Caldéron-Aranda E.S., Manno M. e Albores A. (2001) Stress Proteins Induced by Arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*, **177**: 132-148.
- Denis C.V. (2002) Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol*, **75**: 3-8.
- DeRuiter M.C., Poelmann R.E., VanMunsteren J.C., Mironov V., Markwald R.R. e Gittenberger-de Groot A.C. (1997) Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res*, **80**: 444-451.
- Desagher S. e Martinou J.-C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, **10**: 369-377.
- Descalzi-Cancedda F.D., Melchiori A., Benelli R., Gentili R., Masiello L., Campanile G., Cancedda R. e Albini A. (1995) Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth plate chondrocytes during in-vitro differentiation: dependence on extracellular-matrix assembly. *European J Cell Biol*, **66**: 60-68.
- Dew G., Murphy G., Stanton H., Vallon R., Angel P., Reynolds J.J e Hembry RM. (2000) Localisation of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone. *Cell Tissue Res*, **299**: 385-394.
- Dingle J.T. (1973) The role of lysosomal enzymes in skeletal tissues *J Bone Joint Surg Br*, **55**: 87-95.
- Doherty M.L., McAllister H., Rackard S., Skelly C. e Bassett H.F. (1996) Osteochondrosis in a pedigree Suffolk ram. *Vet Rec*, **138**: 137-138.
- Domon T. e Wakita M. (1991) Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear osteoclast of the mouse. *Am J Anat*, **192**: 35-44.
- Domon T., Sugaya K., Yawaka Y., Osanai M., Hanaizumi Y., Takahashi S. e Wakita M. (1994) Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear odontoclast of the human. *Anat Rec*, **240**: 42-51.
- Domon T., Osanai M., Yasuda M., Seki E., Takahashi S., Yamamoto T. e Wakita M. (1997) Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: the distribution of nuclei in human odontoclasts. *Anat Rec*, **249**: 449-457.
- Domon T., Yasuda M., Osanai M., Suzuki R., Takahashi S., Yamamoto T. e Wakita M. (1998) Increase in odontoclast nuclei number by cell fusion: a three-dimensional reconstruction of cell fusion of human odontoclasts. *Anat Rec*, **252**: 462-471.
- Donato R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochem Biophys Acta*, **1450**: 191-231.
- Donato R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**: 637-668.
- Donato R. (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsp Res Tech*, **60**: 540-551.

- Donato R., Giambanco I. e Aisa M.C. (1989) Molecular interaction of S-100 proteins with microtubule proteins in vitro. *J Neurochem*, **53**: 566-571.
- Downing K.H. (2000) Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**: 89-111.
- Dreier R., Wallace S., Fuchs S., Bruckner P. e Grassel S. (2001) Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). *J Cell Sci*, **114**: 3813-3822.
- Ducy P. e Karsenty G. (1998) Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **10**: 614-619.
- Durr J., Lammi P., Goodman S.L., Aigner T. e von der Mark K. (1996) Identification and immunolocalisation of laminin in cartilage. *Exp Cell Res*, **222**: 225-233.
- Duffy M.J., Maguire T.M., Hill A., McDermott E. e O'Higgins N. (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*, **2**: 252-257.
- Dziewaitkowski D.D. e Majznerski L.L. (1985) Role of proteoglycans in endochondral ossification: inhibition of calcification. *Calcif Tissue Int*, **37**: 560-564.
- Eastman A. e Barry M.A. (1992) The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest*, **10**: 229-240.
- Edwards H.M. Jr. (1984) Studies on the etiology of tibial dyschondroplasia in chickens. *J Nutr*, **114**: 1001-1013.
- Edwards H.M. Jr. (1985) Effects of different soybean meals on the incidence of tibial dyschondroplasia. *J Nutr*, **115**: 1005-1015.
- Edwards H.M. Jr. (1987) Effects of thiuram, disulfiram and a trace element mixture on the incidence of tibial dyschondroplasia in chickens. *J Nutr*, **117**: 964-969.
- Edwards H.M. Jr. (1989) The effect of dietary cholecalciferol, 25-hydroxycholecalciferol and 1,25-dihydroxycholecalciferol on the development of tibial dyschondroplasia in broiler chickens in the absence and presence of disulfiram. *J Nutr*, **119**: 647-652.
- Edwards H.M. Jr, Denmam F., Abou-Ashour A. e Nugara D. (1973) Influences of age, sex and type of dietary fat supplementation on total carcass and fatty acid composition. *Poult Sci*, **52**: 934-948.
- Edwards H.M. Jr. e Sorensen P. (1987) Effect of short fasts on the development of tibial dyschondroplasia in chickens. *J Nutr*, **117**: 194-200.
- Edwards H.M. Jr. e Veltman J.R. Jr. (1983) The role of calcium and phosphorus in the etiology of tibial dyschondroplasia in young chickens. *J Nutr*, **113**: 1568-1575.
- Edwards J.C., Wilkinson L.S., Soothill P., Hembry R.M., Murphy G. e Reynolds J.J. (1996) Matrix metalloproteinases in the formation of human synovial joint cavities. *J Anat*, **188**: 355-360.
- Eide D.J. (1998) The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Rev Nutr*, **18**: 441-469.

- Ejiri S. (1983) The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast: ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. *Arch Histol Jpn*, **46**: 533-557.
- Ekman S. e Carlson C.S. (1998) The pathophysiology of osteochondrosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **28**: 17-32.
- Emmerson D.A., Anthony N.B., Nestor, K.E. e Saif Y.M. (1991) Genetic association of selection for increased leg muscle and increased shank diameter with body composition and walking ability. *Poult Sci*, **70**: 739-745.
- Engsig M.T., Chen Q.-J., Vu T.H., Pedersen A.-C., Therkidsen B., Lund L.R., Henriksen K., Lenhard T., Foged N.T., Werb Z. e Delaissé J.-M. (2000) Matrix metalloproteinase 9 and Vascular Endothelial Growth Factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol*, **151**: 879-889.
- Enomoto A., Harada T., Maita K. e Shirasu Y. (1989) Epiphyseal lesions of the femur and tibia in rats following oral chronic administration of zinc dimethyldithiocarbamate (ziram). *Toxicology*, **54**: 45-58.
- Estreicher A., Wohlwend A., Belin D., Schleuning W.D. e Vassalli J.D. (1989) Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, **264**: 1180-1189.
- Evan G.I., Brown L., Whyte M. e Harrington E. (1995) Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, **7**: 825-834.
- Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z. e Hancock D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, **69**: 119-128.
- Everts V., Delaisse J.M., Korper W. e Beertsen W. (1998) Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. *J Bone Miner Res*, **13**: 1420-1430.
- Everts V., Delaisse J.M., Korper W., Niehof A., Vaes G. e Beertsen W. (1992) Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol*, **150**: 221-231.
- Everts V., Korper W., Jansen D.C., Steinfort J., Lammerse I., Heera S., Docherty A.J.P. e Beertsen W. (1999) Functional heterogeneity of osteoclasts: matrix metalloproteinases participate in osteoclastic resorption of calvaria bone but not in resorption of long bone. *FASEB J*, **13**: 1219-1230.
- EXPASy (2003) Access to enzyme by cofactor. <http://www.expasy.ch/cgi-bin/enzyme-search-cf>
- Exposito J.-Y., Cluzel C., Garrone R. e Lethias C. (2002) Evolution of collagens. *Anat Rec*, **268**: 302-316.
- EXTONET (2003) <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/ghindex.html>
- Fano G., Biocca S., Fulle S., Mariggio M.A., Belia S. e Calissano P. (1995) The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol*, **46**: 71-82.

- Farnum C.E., Lee R., O'Hara K. e Urban J.P. (2002) Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: the contribution of organic osmolytes. *Bone*, **30**: 574-581.
- Farnum C.E. e Wilsman N.J. (1987) Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *Anat Rec*, **219**: 221-232.
- Farnum C.E. e Wilsman N.J. (1989) Cellular turnover at the chondro-osseous junction of growth plate cartilage: analysis by serial sections at the light microscopic level. *J Orthop Res*, **7**: 654-666.
- Farquharson C., Berry J.L., Mawer E.B., Seawright E. e Whitehead C.C. (1995) Regulators of chondrocyte differentiation in tibial dyschondroplasia: an *in vivo* and *in vitro* study. *Bone*, **17**: 279-286.
- Farquharson C., Duncan A. e Robins S.P. (1989) The effects of copper deficiency on the pyridinium crosslinks of mature collagen in the rat skeleton and cardiovascular system. *Proc Soc Exp Biol Med*, **192**: 166-171.
- Farquharson C., Duncan A., Seawright E., Whitehead C.C e Robins S.P. (1996) Distribution and quantification of pyridinium cross-links of collagen within the different maturational zones of the chick growth plate. *Biochem Biophys Acta*, **1290**: 250-256.
- Farquharson C., Hesketh J.E. e Loveridge N. (1992a) The proto-oncogene c-myc is involved in cell differentiation as well as cell proliferation: studies on growth plate chondrocytes *in situ*. *J Cell Physiol*, **152**: 135-144.
- Farquharson C. e Jefferies D. (2000) Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **79**: 994-1004.
- Farquharson C., Lester D., Seawright E., Jefferies D. e Houston B. (1999) Microtubules are potential regulators of growth-plate chondrocyte differentiation and hypertrophy. *Bone*, **25**: 405-412.
- Farquharson C. e Loveridge N. (1990) Cell proliferation within the growth plate of long bones assessed by bromodeoxyuridine uptake and its relationship to glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. *Bone Miner*, **10**: 121-130.
- Farquharson C., Seawright E. e Jefferies D. (2001) Parathyroid hormone-related peptide expression in tibial dyschondroplasia. *Avian Pathol*, **30**: 327-335.
- Farquharson C., Whitehead C.C. e Loveridge N. (1994) Alterations in glycosaminoglycan concentration and sulfation during chondrocyte maturation. *Calcif Tissue Int*, **54**: 296-303.
- Farquharson C., Whitehead C.C., Rennie J.S., Thorp B.H. e Loveridge N. (1992b) Cell proliferation and enzymes activities associated with the development of tibial dyschondroplasia: an *in situ* biochemical study. *Bone*, **13**: 59-67.
- Faucheux C., Nesbitt S.A., Horton M.A. e Price J.S. (2001) Cells in regeneration deer antler cartilage provide a microenvironment that supports osteoclast differentiation. *J Exp Biol*, **204**: 443-455.
- Ferguson C., Alpern E., Miclau T. e Helms J.A. (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev*, **87**: 57-66.



- Ferrara N., Gerber H.P. e LeCouter J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med*, **9**: 669-676.
- Ferrari S.L., Traianedes K., Thome M., Lafage-Proust M.H., Genever P., Cecchini M.G., Behar V., Bisello A., Chorev M., Rosenblatt M. e Suva L.J. (2000) A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J Bone Miner Res*, **15**: 198-208.
- Filanti C., Dickson G.R., Di Martino D., Ulivi V., Sanguineti C., Romano P., Palermo C. e Manduca P. (2000) The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis in vitro, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J Bone Miner Res*, **15**: 2154-2168.
- Fitch R.B. e Beale B.S. (1998) Osteochondrosis of the canine tibiotarsal joint. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **28**: 95-113.
- Flannery C.R., Little C.B., Caterson B. e Hughes C.E. (1999) Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and desintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix Biology*, **18**: 225-237.
- Fleckenstein E. e Dexter H.G. (1997) Tartrate-resistant acid phosphatase: gene structure and function. *Leukemia*, **11**: 10-13.
- Floyd W.E.D., Zaleske D.J., Schiller A.L., Trahan C. e Mankin H.J. (1987) Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine distal femoral epiphysis. *J Bone Joint Surg (Am)*, **69**: 185-190.
- Folkman J. e Klagsburn M. (1987) Angiogenic factors. *Science*, **235**: 442-447.
- Folkman J. e Shing Y. (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem*, **267**: 10931-10934.
- Fontanini G., Boldrini L., Vignati S., Chine S., Basolo F., Silvestri V., Lucchi M., Mussi A., Angeletti C.A. e Bevilacqua G. (1998) Bcl2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*, **34**: 718-723.
- Fortunato S.J. e Menon R. (2002) Screening of novel matrix metalloproteinases (MMPs) in human fetal membranes. *J Assist Reprod Genet*, **19**: 483-486.
- Freedman B.D., Gay C.V. e Leach R.M. (1985) Avian tibial dyschondroplasia II. Biochemical changes. *Am J Pathol*, **119**: 191-198.
- Freyria A.-M., Ronzière M.-C., Roche S., Rousseau C.F. e Herbage D. (1999) Regulation of growth, protein synthesis, and maturation of fetal bovine epiphyseal chondrocytes grown in high-density culture in the presence of ascorbic acid, retinoic acid, and dihydrocytochalasin B. *J Cell Biochem*, **76**: 84-98.
- Fuchs S.Y. (2002) The role of ubiquitin-proteasome pathway in oncogenic signaling. *Cancer Biol Therapy*, **1**: 337-341.
- Fuller K. e Chambers T.J. (1995) Localization of mRNA for collagenase in osteocytic, bone surface and chondrocytic cells but not osteoclasts. *J Cell Sci*, **108**: 2221-2230.

- Fuhrmann G., Rosenberger G., Grusch M., Klein N., Hofmann J. e Krupitza G. (1999) The MYC dualism in growth and death. *Mutat Res*, **437**: 205-217.
- Furth P.A. (1999) Mammary gland involution and apoptosis of mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **4**: 123-127.
- Gack S., Vallon R., Schmidt J., Grigoriadis A., Tuckermann J., Schenkel J., Weiher H., Wagner E.F. e Angel P. (1995) Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differentiation*, **6**: 759-767.
- Ganey T.M., Ogden J.A., Sasse J. Neame P.J. e Hilbelink D.R. (1995) Basement membrane composition of cartilage canals during development and ossification of the epiphysis. *Anat Rec*, **241**: 425-437.
- Gavrieli Y., Sherman Y. e Ben-Sasson S.A. (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**: 493-501.
- Gay C.V. e Weber J.A. (2000) Regulation of differentiated osteoclasts. *Critical Rev Eukariotic Gene Expression*, **10**: 213-230.
- George S.J., Lloyd C.T., Angelini G.D., Newby A.C. e Baker A.H. (2000) Inhibition of late vein graft neointima formation in human and porcine models by adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor metalloproteinase-3. *Circulation*, **101**: 296-304.
- Gerber H.P. e Ferrara N. (2000) Angiogenesis and bone growth. *TCM*, **10**: 223-228.
- Gerber H.P., Vu T.H., Ryan A.M., Kowalski J., Werb Z. e Ferrara N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral formation. *Nature Med*, **5**: 623-628.
- Gerschenson L.E. e Rotello R.J. (1992) Apoptosis: a different type of cell death *FASEB J*, **6**: 2450-2455.
- Gerstenfeld L.C. e Shapiro F.D. (1996) Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implications of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem*, **62**: 1-9.
- Gibbons I.R. (1981) Cilia and flagella of eukaryotes. *J Cell Biol*, **91**: 107s-124s.
- Gibson A.W., Cheng T. e Johnston R.N. (1995) Apoptosis induced by c-myc overexpression is dependent on growth conditions. *Exp Cell Res*, **218**: 351-358.
- Gibson G.J. (1998) Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech*, **43**: 191-204.
- Gibson G.J., Kohler W.J. e Schaffler M.B. (1995) Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Dev Dyn*, **203**: 468-476.
- Gibson G.J., Lin D.L. e Roque M. (1997) Apoptosis of terminally differentiated chondrocyte in culture. *Exp Cell Res*, **233**: 372-382.
- Glickman M.H. e Ciechanover A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**: 373-428.
- Glimcher M.J. (1989) Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes *in vitro* and *in vivo*. *Anat Rec*, **224**: 139-153.

- Goad D.L., Rubin J., Wang H., Tashjian A.H. Jr e Patterson C. (1996) Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, **137**: 2262-2268.
- Goering P.L. (1995) Stress Proteins: Molecular biomarkers of chemical exposure and toxicity. In Butterworth F.M., Corkum L.D. e Guzman-Rincon J. (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York. pp: 217-227.
- Gold R., Schmied M., Rothe G., Zischler H., Breitschopf H., Wekerle H. e Lassmann H. (1993) Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of *in situ* nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem*, **41**: 1023-1030.
- Goldberg M.E. e Guillou Y. (1994) Native disulfide bonds greatly accelerate secondary structure formation in the folding of lysozyme. *Protein Sci*, **3**: 883-887.
- Gomez D.E., Alonso D.F., Yoshiji H. e Thorgeirsson U.P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Europ J Cell Biol*, **74**: 111-122.
- Gory-Faure S., Prandini M.H., Pointu H., Rouillot V., Pignot-Paintrand I., Vernet M. e Huber P. (1999) Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*, **126**: 2093-2102.
- Goto T., Kiyoshima T., Moroi R., Tsukuba T., Nishimura Y., Himeno M., Yamamoto K. e Tanaka T. (1994) Localisation of cathepsins B, D and L in rat osteoclast by immuno-light and - electron microscopy. *Histochemistry*, **101**: 33-40.
- Goto T., Tsukuba T., Kiyoshima T., Nishimura Y., Kato K., Yamamoto K. e Tanaka T. (1993) Immunohistochemical localization of cathepsins B, D and L in the rat osteoclast. *Histochemistry*, **99**: 411-414.
- Gowan M.D., Wood D.D., Ihrie E.J., Meats J.E. e Russel R.G.G. (1984) Stimulation by interleukin-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycans by human chondrocytes but not by human osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Acta*, **797**: 186-193.
- Goz B. (1977) The effects of incorporation of 5-halogenated deoxyuridines into the DNA of eukaryotic cells. *Pharmacol Rev*, **29**: 249-272.
- Grant D.S., Kibbey M.C., Kinsella J.L., Cid M.C. e Kleinman H.K. (1994) The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. *Pathol Res Pract*, **190**: 854-863.
- Grant D.S., Kleinman H.K. e Martin G.R. (1990) The role of basement membranes in vascular development. *Ann N Y Acad Sci*, **588**: 61-72.
- Grant D.S., Morales D., Cid M.C. e Kleinman H.K. (1994) Angiogenesis models identify factors which regulate endothelial cell differentiation. In Maragoudakis et al (eds) *Angiogenesis: Molecular Biology, Clinical Aspects*. Plenum Press, New York. pp: 51-60.
- Grasl-Kraupp B., Ruttkay-Nedecky B., Koudelka H., Bukowska K., Bursch W. e Schulte-Hermann R. (1995) In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*, **21**: 1465-1468.

- Gratzner H.G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, **218**: 474-476.
- Gray A.W., Davies M.E. e Jeffcott L.B. (2002) Localisation and activity of cathepsins K and B in equine osteoclasts. *Res Vet Sci*, **72**: 95-103.
- Greenfield E.M., Bi Y. e Miyauchi A. (1999) Regulation of osteoclastic activity. *Life Sci*, **65**: 1087-1102.
- Gronthos S., Simmons P.J., Graves S.E. e Robey P.G. (2001) Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*, **28**: 174-181.
- Gronthos S., Stewart K., Graves S.E., Hay S. e Simmons P.J. (1997) Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*, **12**: 1189-1197.
- Grumbach M.M. (2000) Estrogen, bone, growth and sex: a sea change in conventional wisdom. *J Pediatr Endocr Metab*, **13**: 1439-1455.
- Grutter M.G. (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol*, **10**: 649-655.
- Gu Y.C., Kortessmaa J., Tryggvason K., Persson J., Ekblom P., Jacobsen S.E. e Ekblom M. (2003) Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. *Blood*, **101**: 877-885.
- Guitart R., Mateo R., Gutierrez J.M. e To-Figueras J. (1996) An outbreak of thiram poisoning on spanish poultry farms. *Vet Hum Toxicol*, **4**: 287-288.
- Gumbiner B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**: 345-357.
- Gupta M., Amma M.K. e Gupta K.G. (1993) Membrane disordering effect of thiram as assessed by brain synaptosomal and erythrocyte membrane constituents. *Bull Environ Contam Toxicol*, **50**: 764-771.
- Haimoto H., Hosoda S. e Kato K. (1987) Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest*, **57**: 489-498.
- Hale L.V., Kemick M.L.S. e Wuthier R.E. (1986) Effect of vitamin D metabolites on the expression of alkaline phosphatase activity by epiphyseal hypertrophic chondrocytes in primary culture. *J Bone Miner Res*, **1**: 489-495.
- Hall P.A., Levison D.A., Woods A.L., Yu C.C., Kellock D.B., Watkins J.A., Barnes D.M., Gillett C.E., Camplejon R. Dover R. (1990) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, **165**: 356-357.
- Halley J.T., Nelson T.S., Kirby L.H. e Johnson Z.B. (1987) Effect of altering dietary mineral balance on growth, leg abnormalities, and blood base excess in broiler chicks. *Poult Sci*, **66**: 1684-1692.
- Halvorson D.B. e Jacobson M (1970) Variations in development of muscles of chickens. *Poult Sci*, **49**: 150-154.

- Han C.I., Campbell G.R. e Campbell J.H. (2001) Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J Vasc Res*, **38**: 113-119.
- Hanahan D. e Folkman J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**: 353-364.
- Hardingham T. (1999) Proteoglycans and Glycosaminoglycans. In Seibel M.J., Robins S.P. e Bilezikian J.P. (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Academic Press, San Diego. pp: 71-81.
- Hargest T.E., Leach R.M. e Gay C.V. (1985) Avian tibial dyschondroplasia I. Ultrastructure. *Am J Pathol*, **119**: 175-190.
- Hartmann W. (1989) From Mendel to multi-national in poultry breeding. *World's Poult Sci J*, **45**: 5- 26.
- Hartmann W. (1992) Evaluation of the potentials of new scientific developments for commercial poultry breeding. *World's Poult Sci J*, **48**: 17-27.
- Hatori M., Klatte K.J., Teixeira , C.C. e Shapiro I.M. (1995) End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res*, **10**: 1960-1968.
- Hausler G., Helmreich M., Marlovits S. e Egerbacher M. (2002) Integrins and extracellular matrix proteins in the human childhood and adolescent growth plate. *Calcif Tissue Int*, **71**: 212-218.
- Hautamaki R.D., Kobayashi D.R., Senior R.M. e Shapiro S.D. (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*, **277**: 2002-2004.
- Havenstein G.P., Ferket P.R., Scheideler S.E. e Larson B.T. (1994) Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 *broilers* when feed "typical" 1957 and 1991 *broilers* diets. *Poult Sci*, **73**: 1785-1794.
- Havenstein G.P., Nestor K.E., Toelle V.D. e Bacon W.L. (1988) Estimates of genetic parameters in turkeys. 1. Body Weight and skeletal characteristics. *Poult Sci*, **67**: 1378-1387.
- Hayakawa T. (2002) Multiple functions of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): a new aspect involving osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab*, **20**: 1-13.
- Hayakawa T., Yamashita K., Ohuchi E. e Shinagawa A. (1994) Cell growth promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci*, **107**: 2372-2379.
- Hayami T., Endo N., Tokunaga K., Yamagiwa H., Hatano H., Uchida M. e Takahashi H.E. (2000) Spatiotemporal change of rat collagenase (MMP-13) mRNA expression in the development of the rat femoral neck. *J Bone Miner Metab*, **18**: 185-193.
- Hayman A.R., Jones S.J., Boyde A., Foster D., Colledge W.H., Carlton M.B., Evans M.J. e Cox T.M. (1996) Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp-5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development*, **122**: 3151-3162.
- Haye U. e Simons P.C.M. (1978) Twisted legs in *broilers*. *Br Poult Sci*, **19**: 549-557.
- Haynes J.S. e Walser M.M. (1986) Ultrastructure of *Fusarium*-induced tibial dyschondroplasia in chickens: a sequential study. *Vet Pathol*, **23**: 499-505.

- Haynes J.S., Walser M.M. e Lawler E.M. (1985) Morphogenesis of *Fusarium* sp-induced tibial dyschondroplasia in chickens. *Vet Pathol*, **22**: 629-636.
- Heinegard D., Lorenzo P. e Saxne T. (1999) Noncollagenous proteins; glycoproteins and related proteins. In Seibel M.J., Robins S.P. e Bilezikian J.P. (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Academic Press, San Diego. pp: 59-69.
- Heinegard D. e Oldberg A. (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J*, **3**: 369-375.
- Heizmann C.W. (2002) The multifunctional S100 proteins family. *Methods Mol Biol*, **172**: 69-80.
- Heizmann C.W., Fritz G. e Schafer B.W. (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*, **7**: d1356-d1368.
- Heizmann C.W. e Cox J.A. (1998) New perspectives on S100 proteins: a multifunctional  $Ca^{2+}$ -,  $Zn^{2+}$ - and  $Cu^{2+}$ - binding protein family. *Biometals*, **11**: 383-397.
- Helfrich M.H. e Horton M.A. (1999) Integrins and Adhesion Molecules. In Seibel M.J., Robins S.P. e Bilezikian J.P. (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Academic Press, San Diego. pp: 111-125.
- Helfrich M.H., Mieremet R.H. e Thesingh C.W. (1989) Osteoclast formation in vitro from progenitor cells present in the adult mouse circulation. *J Bone Miner Res*, **4**: 325-334.
- Hembry R.M., Dyce J., Driesang I., Hunziker E.B., Fosang A.J., Tyler J.A. e Murphy G. (2001) Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular cartilage. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*, **83A**: 826-838.
- Henderson J.E., He B., Goltzman D., Karaplis A.C. (1996) Constitutive expression of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) stimulates growth and inhibits differentiation of CFK2 chondrocytes. *J Cell Physiol*, **169**: 33-41.
- Henson F.M., Davenport C., Butler L., Moran I., Shingleton W.D., Jeffcott L.B e Schofield P.N. (1997) Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes *Equine vet J*, **29**: 441-447.
- Henson F.M., Davies M.E., Schofield P.N. e Jeffcott L.B. (1996) Expression of types II, VI and X collagen in equine growth cartilage during development. *Equine vet J*, **28**: 189-198.
- Henson F.M., Davies M.E., Skepper J.N. e Jeffcott L.B. (1995) Localisation of alkaline phosphatase in equine growth cartilage. *J AnatJ*, **187**: 151-159.
- Henthorn P.S., Millau J.L. e Leboy P. (1999) Acid and Alkaline Phosphatase. In Seibel M.J., Robins S.P. e Bilezikian J.P. (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Academic Press, San Diego. pp: 127-136.
- Hering T.M. (1999) Regulation of chondrocyte gene expression. *Front Biosci*, **4**: d408-d414.
- Hernandez-Barrantes S., Bernarndo M., Toth M. e Fridman R. (2002) Regulation of membrane type-matrix metalloproteinases. *Seminars Cancer Biol*, **12**: 131-138.
- Herold T. (2002) [http://www.bdbiosciences.ca/downloads/hotlines/MMP\\_HL\\_Spring2002.pdf](http://www.bdbiosciences.ca/downloads/hotlines/MMP_HL_Spring2002.pdf)
- Hester P.Y. (1994) The role of environment and management on leg abnormalities in meat-type fowl. *Poult Sci*, **73**: 904-915.

- Heymann D., Guicheux J., Gouin F., Passuti N. e Daculsi G. (1998) Cytokines, growth factors and osteoclasts. *Cytokine*, **10**: 155-168.
- Hickok N.J., Haas A.R. e Tuan R.S. (1998) Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech*, **43**: 174-190.
- Hill B.D., Sutton R.H. e Thompson H. (1998) Investigation of osteochondrosis in grazing beef cattle. *Aust Vet J*, **76**: 171-175.
- Hill D.J. e Logan A. (1992) Peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis. *Prog Growth Factor Res*, **4**: 45-68.
- Hinck L., Nathke I.S., Papkoff J. e Nelson W.J. (1994) Dynamics of cadherin-catenin complex formation: novel protein interaction and pathways of complex assembly. *J Cell Biol*, **125**: 1327-1340.
- Hinek A. e Poole A.R. (1988) The influence of vitamin D metabolites on the calcification of cartilage matrix and the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). *J Bone Miner Res*, **3**: 421-429.
- Hinek A., Reiner A. e Poole A.R. (1987) The calcification of cartilage matrix in chondrocyte cultures studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). *J Cell Biol*, **104**: 1453-1441.
- Hiraki Y., Inoue H., Iyama K., Kamizono A., Ochiai M., Shukunami C., Iijima S., Suzuki F. e Kondo J. (1997) Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *J Biol Chem*, **272**: 32419-32426.
- Hirsch M.S., Lunsford L.E., Trinkaus-Randall V. e Svoboda K.K. (1997) Chondrocyte survival and differentiation *in situ* are integrin mediated. *Dev Dyn*, **210**: 249-263.
- Hitomi J., Kimura T., Kusumi E., Nakagawa S., Kuwabara S., Hatakeyama K. e Yamaguchi K. (1998) Novel S100 proteins in human esophageal epithelial cells: CAAF1 expression is associated with cell growth arrest. *Arch Histol Cytol*, **61**: 163-178.
- Hocking P.M., Wilson S., Dick L., Dunn L.N., Robertson G.W. e Nixey C. (2002) Role of dietary calcium and available phosphorus in the aetiology of tibial dyschondroplasia in growing turkeys. *Br Poult Sci*, **43**: 432-441.
- Holliday L.S., Welgus H.G., Fliszar C.J., Veith G.M., Jeffrey J.J. e Gluck S.L. (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J Biol Chem*, **272**: 22053-22058.
- Holliday L.S., Welgus H.G., Hanna J., Lee B.S., Lu M., Jeffrey J.J. e Gluck S.L. (2003) Interstitial collagenase activity stimulates the formation of actin rings and ruffled membranes in mouse marrow osteoclasts. *Calcif Tissue Int*, **72**: 206-214.
- Holmbeck K., Bianco P., Caterina J., Yamada S., Kromer M., Kuznetsov S.A., Mankani M., Robey P.G., Poole A.R., Pidoux I., Ward J.M. e Birkedal-Hansen H. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, **99**: 81-92.
- Holtrop M.E. (1972a) The ultrastructure of the epiphyseal plate. I. The flattened chondrocyte. *Calcif Tissue Res*, **9**: 131-139.

- Holtrop M.E. (1972b) The ultrastructure of the epiphyseal plate. II. The hypertrophic chondrocyte. *Calcif Tissue Res*, **9**: 140-151.
- Horner A., Bishop N.J., Bord S., Beeton C., Kelsall A.W., Coleman N. e Compston J.E. (1999) Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *J Anat*, **194**: 519-524.
- Horner A., Bord S., Kemp P., Grainger D. e Compston J.E. (1996) Distribution of platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, protein, and PDGF- $\alpha$  receptor in rapidly forming human bone. *Bone*, **19**: 353-362.
- Horner A., Kemp P., Summers C., Bord S., Bishop N.J., Kelsall A.W., Coleman N. e Compston J.E. (1998) Expression and distribution of transforming growth factor- $\beta$  isoforms and their signaling receptors in growing human bone. *Bone*, **23**: 95-102.
- Horton M.A., Townsend P. e Nesbitt S. (1996) Cell surface attachment molecules in bone. In Bilezikian J.P., Raisz L.G. e Rodan G.A. (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego. pp: 217-230.
- Howard E.W., Bullen E.C. e Banda M.J. (1991) Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem*, **266**: 13064-13069.
- Howell D.S. e Dean D.D. (1992) The biology, chemistry and biochemistry of the mammalian growth plate. In Coe F.L. e Favus (eds) *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. Raven Press. New York. pp: 313-353.
- Howlett C.R. (1979) The fine structure of the proximal growth plate of the avian tibia. *J Anat*, **128**: 377-399.
- Hu J. e Van Eldik L.J. (1996) S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1313**: 239-245.
- Huang W., Li W.Q., Dehnade F. e Zafarullah M. (2002) Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J Cell Biochem*, **85**: 295-303.
- Huber O., Bierkamp C. e Kemler R. (1996) Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol*, **8**: 685-691.
- Hulan H.W., De Groote G., Fontaine G., De Munter G., McRae K.B. e Proudfoot F.G. (1985) The effect of different totals and ratios of dietary calcium and phosphorus on the performance and incidence of leg abnormalities of male and female broiler chickens. *Poult Sci*, **64**: 1157-1169.
- Hunt G. (1989) The role of laminin in cancer invasion and metastasis. *Exp Cell Biol*, **57**: 165-176.
- Hunter I., McGregor D. e Robins S.P. (2001) Caspase-dependent cleavage of cadherins and catenins during osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res*, **16**: 466-477.
- Hunziker E.B. (1988) Growth plate structure and function. *Pathol Immunopathol Res*, **7**: 9-13.



- Hunziker E.B., Herrmann W. e Schenk R.K. (1982) Improved cartilage fixation by ruthenium hexammine trichloride (RHT). A prerequisite for morphometry in growth cartilage. *J Ultrastruct Res*, **81**: 1-12.
- Hunziker E.B., Herrmann W., Schenk R.K., Mueller M. e Moor H. (1984) Cartilage ultrastructure after high pressure freezing, freeze substitution, and low temperature embedding. I. Chondrocyte ultrastructure-implications for the theories of mineralization and vascular invasion. *J Cell Biol*, **98**: 267-276.
- Hunziker E.B. e Schenk R.K. (1989) Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol*, **414**: 55-71.
- Hunziker E.B., Schenk R.K. e Cruz-Orive L.M. (1987) Quantitation of chondrocyte performance in growth plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am*, **69**: 162-173.
- Hurwitz S. e Pines M. (1992) Hormones and skeletal growth. In Schreibman M.P., Scanes C.G. e Pang P. (eds) *The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates*. AcademicPress. pp: 419-443.
- Huyseune A. e Sire J.Y. (1992) Bone and cartilage resorption in related to tooth development in the anterior part of the mandible in cichlid fish: a light and TEM study. *Anat Rec*, **234**: 1-14.
- Iannotti J.P. (1990) Growth plate physiology and pathology. *Orthop Clin North Am*, **21**: 1-17.
- Ichigatani M., Saga T., Yamaki K. e Yoshizuka M. (2001) Appearance of vascular growth factor (VEGF) in femoral head in the growing rat. *Histol Histopathol*, **16**: 463-468.
- Ingber D.E., Prusty D., Sun Z., Betensky H., Wang N. (1995) Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J Biomech*, **28**: 1471-1484.
- Irniger S. (2002) Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett*, **532**: 7-11.
- Ishizaki Y., Jacobson M.D. e Raff M.C. (1998) Role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol*, **140**: 153-158.
- Iskra M. e Majewski W. (1999) Activities of copper,zinc-superoxide dismutase in erythrocytes and ceruloplasmin in serum in chronic ischemia of lower limbs. *Int J Clin Lab Res*, **29**: 64-67.
- Isobe T., Ishioka N., Masuda T., Takahashi Y., Ganno S. e Okujama T. (1983) A rapid separation of S100 subunits by high performance liquid chromatography: the subunit composition of S100 proteins. *Biochem Int*, **6**: 419-426.
- Itoh T., Ikeda T., Gomi H., Nakao S., Suzuki T e Itohara S. (1997) Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J Biol Chem*, **272**: 22389-22392.
- Iwamoto M., Sato K., Nakashima A., Shimazu A. e Kato Y. (1989) Hypertrophy and calcification of rabbit permanent chondrocytes in pelleted cultures: synthesis of alkaline phosphatase and 1,25-dihydroxycholecalciferol receptor. *Dev Biol*, **136**: 500-508.

- Iwamoto M., Yagami K., Lu Valle P., Olsen B.R., Petropoulos C.J., Ewert D.L. e Pacifici M. (1993) Expression and role of c-myc in chondrocytes undergoing endochondral ossification. *J Biol Chem*, **268**: 9645-9652.
- Izumi Y., Ogino K., Murata T., Kobayashi H. e Hobara T. (1994) Effects of diethyldithiocarbamate on activating mechanisms of neutrophils. *Pharmacol Toxicol*, **74**: 280-286.
- Jacenko O., Luvalle P.A. e Olsen B. (1993) Spondylometaphyseal dysplasia in mice carrying dominant negative mutations in a matrix proteins specific for cartilage-to-bone transfer. *Nature*, **365**: 56-61.
- Jackson C. (2002) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **11**: 295-299.
- Jacobs J.R. e Stevens J.K. (1988) Experimental modification of pc12 neurite shape with the microtubule-depolymerizing drug nocodazole – a serial electron microscope study of neurite shape control. *J Cell Biol*, **103**: 907-915.
- Jaffe E.A., Hoyer L.W. e Nachman R.L. (1974) Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **71**: 1906-1909.
- Janicke R.U., Sprengart M.L., Wati M.R. e Porter A.G. (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, **273**: 9357-9360.
- Jeffcott L.B. (1991) Osteochondrosis in the horse - searching for the key to pathogenesis. *Equine Vet J*, **23**: 331-338.
- Jefferies D., Farquharson C., Seawright E., Whitehead C.C., Thorp B.H. e Houston B. (1998) Expression of candidate genes for tibial dyschondroplasia in growth plate chondrocytes separated on percoll gradients. *J Bone Miner Res*, **13**: 1511.
- Jefferies D., Houston B., Lester D., Whitehead C.C., Thorp B.H., Botman M. e Farquharson C. (2000) Expression patterns of chondrocyte genes cloned by differential display in tibial dyschondroplasia. *Biochim Biophys Acta*, **1501**: 180-188.
- Johansson N., Saarialho-Kere U., Airola K., Herva R., Nissinen L., Westermarck J., Vuorio E., Heino J. e Kahari V.M. (1997) Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn*, **208**: 387-397.
- Jones D.K., Luddington R., Higenbottom T.W., Scott J., Cavarocchi N., Reardon D., Calvis J. e Wallwark J. (1988) Changes in factor VIII proteins after cardiopulmonary bypass in man suggest endothelial damage. *Thromb Haemost*, **60**: 199-204.
- Jortikka M.O., Parkkinen J.J., Inkinen R.I., Karner J., Jarvelainen H.T., Nelimarkka L.O., Tammi M.I. e Lammi M.J. (2000) The role of microtubules in the regulation of proteoglycan synthesis in chondrocytes under hydrostatic pressure. *Arch Biochem Biophys*, **374**: 172-180.
- Joseph-Silverstein J. e Silverstein R.L. (1998) Cell adhesion molecules: An overview. *Cancer Invest*, **16**: 176-182.

- Joyce M.E., Jingushi S., Scully S.P. e Bolander M.E. (1991) Role of growth factors in fracture healing. *Prog Clin Biol Res*, **365**: 391-416.
- Juin P., Hueber A.O., Littlewood T. e Evan G. (1999) c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev*, **13**: 1367-1381.
- Juin P., Hunt A., Littlewood T., Griffiths B., Swigart L.B., Korsmeyer S. e Evan G. (2002) c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*, **22**: 6158-6169.
- Julian R.J. (1998) Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers. *Poult Sci*, **77**: 1773-1780.
- Juppner H. (1996) Jansen's metaphyseal chondrodysplasia: a disorder due to a PTH/PTHrP receptor gene mutation. *TEM*, **7**: 157-162.
- Kabasawa Y., Ejiri S., Matsuki Y., Hara K. e Ozawa H. (1998) Immunoreactive localization of transforming growth factor type II receptor positive cells in rat tibiae. *Bone*, **22**: 93-98.
- Kahari V.M. e Saarialho-Kere U. (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med*, **31**: 34-45.
- Kai K., Takagi K., Iyama K., Kitaoka M., Yoshioka H., Mizuta H. e Usuku G. (1995) Immunohistochemical localization of basal lamina components in the developing rat epiphyseal cartilage canals. *Clin Orthop*, **279**: 292-298.
- Kameda T., Ishikawa H. Tsutsui T. (1995) Detection and characterization of apoptosis in osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **207**: 753-760.
- Karsdal M.A., Larsen L., Engsig M.T., Lou H., Ferreras M., Lochter A., Delaisse J.M. e Foged N.T. (2002) Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem*, **277**: 44061-44067.
- Kashima T., Kawaguchi J., Takeshita S., Kuroda M., Takanashi M., Horiuchi H., Imamura T., Ishikawa Y., Ishida T., Mori S., Machinami R. e Kudo A. (1999) Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationships to metastasis and morphogenesis. *Am J Pathol*, **155**: 1549-1555.
- Kato M. e Onodera T. (1986) Observation on the development of osteochondrosis in young rats. *Lab Anim*, **20**: 249-256.
- Kato M. e Onodera T. (1987) Early changes of osteochondrosis in medial femoral condyles from rats. *Vet Pathol*, **24**: 80-86.
- Kawaguchi J., Azuma Y., Hoshi K., Kii I., Takeshita S., Ohta T., Ozawa H., Takeichi M., Chisaka O. e Kudo A. (2001) Targeted disruption of cadherin-11 leads to a reduction in bone density in calvaria and long bone metaphyses. *J Bone Miner Res*, **16**: 1265-1271.
- Kelly M., Yishing B., Cook M. e Lilburn M.S. (1993) Dietary calcium effects on skeletal growth in commercial ducks. *Poult Sci*, **72**(Suppl.1): 39 (Abstract).
- Kember N.F. (1960) Cell division in endochondral ossification. *J Bone Joint Surg*, **42B**: 824-839.
- Kember N.F. (1971) Cell population kinetics of bone growth: the first ten years of autoradiographic studies with tritiated thymidine. *Clin Orthop*, **76**: 213-230.

- Kember N.F. (1978) Cell kinetics and the control of growth of long bones. *Cell Tissue Kinet*, **11**: 477-485.
- Kember N.F. e Kirkwood J.K. (1987) Cell kinetics and longitudinal bone growth in birds. *Cell Tissue Kinet*, **20**: 625-629.
- Kember N.F., Kirkwood J.K., Duignan P.J., Godfrey D. e Spratt D.J. (1990) Comparative cell kinetics of avian growth plates. *Res Vet Sci*, **40**: 283-288.
- Kember N.F. e Sissons H.A. (1976) Quantitative histology of the human growth plate. *J Bone Joint Surg*, **8B**: 426-435.
- Kember N.F. e Walker K.V.R. (1971) Control of bone growth in rats. *Nature*, **229**: 428-429.
- Kemler R. (1993) From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet*, **9**: 317-321.
- Kemp S.F., Kearns G.L., Smith W.G. e Elders M.J. (1988) Effects of IGF-I on the synthesis and processing of glucosaminoglycans in cultured chick chondrocytes. *Acta Endocrinol*, **119**: 245-250.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. e Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**: 239-257.
- Kerrigan J.J., Mansell J.P. e Sandy J.R. (2000) Matrix turnover. *J Orthod*, **27**: 227-233.
- Kestin S.C., Su G. e Sorensen P. (1999) Different commercial crosses have different susceptibilities to leg weakness. *Poult Sci*, **78**: 1085-1090.
- Kielty C.M., Kwan A.P., Holmes D.F., Schor S.L. e Grant M.E. (1985) Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. *Biochem J*, **227**: 545-549.
- Kiiskinen T. and Andersson P. (1982) The incidence of tibial dyschondroplasia in two broiler strains and their performance on different diet. *Ann Agric Fenn*, **21**: 169-176.
- Kinoshita T., Sato H., Takino T., Itoh M., Akizawa T. e Seiki M. (1996) Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res*, **56**: 2535-2538.
- Kirchheimer J.C. e Remold H.G. (1989) Functional characteristic of receptor-bound urokinase on human monocytes: catalytic efficiency and susceptibility to inactivation by plasminogen activator inhibitors. *Blood*, **74**: 1396-1402.
- Kirkwood J.K. e Kember N.F. (1993) Comparative quantitative histology of mammalian growth plates. *J Zool, Lond*, **231**: 543-562.
- Kirkwood J.K., Spratt D.M. e Duigan P.J. (1989) Patterns of cell proliferation and growth rate in limb bones of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Res Vet Sci*, **47**: 139-147.
- Kirsch T., Harrison G., Golub E.E. e Nah H.D. (2000) The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem*, **275**: 35577-35583.
- Kirsch T., Nah H.D., Shapiro I.M. e Pacifici M. (1997) Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol*, **137**: 1149-1160.
- Kirsch T. e Wuthier R.E. (1994) Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *J Biol Chem*, **269**: 11462-11469.

- Kister A.E., Roytberg M.A., Chothia C., Vasiliev J. e Gelfand I.M. (2001) The sequence determinants of cadherins molecules. *Prot Sci*, **10**: 1801-1810.
- Kiviranta R., Morko J., Uusitalo H., Aro H.T., Vuorio E. e Rantakokko J. (2001) Accelerated turnover of metaphyseal trabecular bone in mice overexpressing cathepsin K. *J Bone Miner Res*, **16**: 1444-1452.
- Klagsbrun M. e Moses M.A. (1999) Molecular angiogenesis. *Chem Biol*, **6**: R217-R224.
- Klein J.R., Hoon D.S., Nangauyan J., Okun E. e Cochran A.J. (1989) S-100 protein stimulates cellular proliferation. *Cancer Immunol Immunother*, **29**: 133-138.
- Kleinman H.K., Cannon F.B., Laurie G.W., Hassell J.R., Aumailley M., Terranova V.P., Martin G.R. e DuBois-Dalcq M. (1985) Biological activities of laminin. *J Cell Biochem*, **27**: 317-325.
- Kleinman H.K., Weeks B.S., Schnaper H.W., Kibbey M.C., Yamamura K. e Grant D.S. (1993) The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases. *Vitam Horm*, **47**: 161-186.
- Kleinman P.K., Marks S.C. Jr, Spevak M.R., Belanger P.L. e Richmond J.M. (1991) Extension of growth-plate cartilage into the metaphysis: a sign of healing fracture in abused infants. *Am J Roentgenol*, **156**: 775-779.
- Knauper V., Lopez-Otin C., Smith B., Knight G. e Murphy G. (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem*, **271**: 1544-1550.
- Knopov V., Hadash D., Hurwitz S, Leach R.M. e Pines M. (1997) Gene expression during cartilage differentiation in turkey tibial dyschondroplasia, evaluated by in situ hybridization. *Avian Dis*, **41**: 62- 72.
- Knopov V., Leach R.M., Barak-Shalom T., Hurwitz S. e Pines M. (1995) Osteopontin gene expression and alkaline phosphatase activity in avian tibial dyschondroplasia. *Bone*, **16** (Suppl): 329S- 334S.
- Knudson W. e Loeser R.F. (2002) CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci*, **59**: 36-44.
- Koch A.W., Bozic D., Pertz O. e Engel J. (1999) Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol*, **9**: 275-281.
- Koch S., Kampen W.U. e Laprell H. (1997) Cartilage and bone morphology on osteochondritis dissecans. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, **5**: 42-45.
- Kockx M.M., Muhring J., Knaapen M.W. e de Meyer G.R. (1998) RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*, **152**: 885-888.
- Kolsteren P. (1992) Kashin-Beck disease. *Ann Soc belge Méd trop*, **72**: 81-91.
- Konttinen Y.T, Kaapa E., Hukkanen E., Gu X.H., Takagi M., Santavirta S., Alaranta H., Li T.F. e Suda A. (1999) Cathepsin G in degenerating and healthy discal tissue. *Clin Exp Rheumatol*, **17**: 194-204.

- Kothakota S., Azuma T., Reihard C., Klippel A., Tang J., Chu K.T., McGarry T.J., Kirschner M.W., Koths K., Kwiatkowski D.J. e Williams L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**: 294-298.
- Kouri J.B., Arguello C., Luna J. e Mena R. (1998) Use of microscopical techniques in the study of human chondrocytes from osteoarthritic cartilage: an overview. *Microsc Res Tech*, **40**: 22-36.
- Kranzler H.R. (2000) Pharmacotherapy of alcoholism: gaps in knowledge and opportunities for research. *Alcohol Alcoholism*, **35**: 537-547.
- Kroemer G., Petit P., Zamzami N., Vayssiere J.L. e Mignotte D. (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*, **9**: 1277-1287.
- Kuettner K.E. (1992) Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem*, **25**: 155-163.
- Kuettner K.E., Aydelotte M.B. e Thonar E.J.-M.A. (1991) Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *J Rheumatol. Suppl*, **2718**: 46-48.
- Kuida K., Zheng T.S., Na S.Q., Kuan C.Y., Yang D., Karasuyama H., Rakic P. e Flavell R.A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature*, **384**: 368-372.
- Kukita T., Hata K., Kukita A. e Iijima T. (1998a) Laminin, a major basement membrane component of the blood vessel, as a negative regulator of osteoclastogenesis. *Calcif Tissue Int*, **63**: 140-142.
- Kukita T. e Kukita A. (1996) Osteoclast differentiation antigen. *Histol Histopathol*, **11**: 821-830.
- Kukita T., Kukita A., Xu L., Maeda H. e Iijima T. (1998b) Successful detection of active osteoclasts in situ by systemic administration of an osteoclast-specific monoclonal antibody. *Calcif Tissue Int*, **63**: 148-153.
- Kwan A.P., Cummings C.E., Chapman J.A. e Grant M.E. (1991) Macromolecular organization of chicken type collagen in vitro. *J Cell Biol*, **114**: 597-604.
- Kwan A.P., Dickson I.R., Freemont A.J. e Grant M.E. (1989) Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage. *J Cell Biol*, **109**: 1849-1856.
- Kwan A.P., Freemont A.J. e Grant M.E. (1986) Immunoperoxidase localization of type X collagen expression in chick tibia. *Biosci Rep*, **6**: 155-1162.
- Labat-Moleur F., Guillermet C., Lorimier P., Robert C., Lantuejoul S., Brambilla E. e Negoescu A. (1998) TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*, **46**: 327-334.
- Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, **93**: 165-176.

- Landis W.J. e Glimcher M.J. (1982) Electron optical and analytical observations of rat growth plate cartilage prepared by ultracryomicrotomy: the failure to detect a mineral phase in matrix vesicles and the identification of heterodispersed particles as the initial solid phase of calcium phosphate deposited in the extracellular matrix. *J Ultrastruct Res*, **78**: 227-268.
- Larue L., Antos C., Butz S., Huber O., Delmas V., Dominis M. e Kemlecr R. (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development*, **122**: 3185-3194.
- Law A.S., Burt D.W., Alexander I. e Thorp B. (1996) Expression of the gene for transforming growth factor-beta in avian dyschondroplasia. *Res Vet Sci*, **61**: 120-124.
- Lawler E.M., Fletcher T.F. e Wasler M.M. (1985) Chondroclasts in *Fusarium*-induced tibial dyschondroplasia. A histomorphometric study. *Am J Pathol*, **120**: 276-281.
- Lawler E.M., Shivers J.L. e Wasler M.M. (1988) Acid phosphatase activity of chondroclasts from *Fusarium*-induced tibial dyschondroplastic cartilage. *Avian Dis*, **32**: 240-245.
- Layfield R., Alban A., Mayer R.J. e Lowe J. (2001) The ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **27**: 171-179.
- Leach R.M. Jr. e Gay C.V. (1987) Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation. 51st Annual Poultry Nutrition Conference-Symp: Metabolic Aspects of Avian Calcification, 784-790.
- Leach R.M. Jr. e Lilburn M.S. (1992) Current knowledge on the etiology of tibial dyschondroplasia in the avian species. *Poult Sci Rev*, **4**: 57-65.
- Leach R.M. Jr. e Nesheim M.C. (1965) Nutritional, genetic, and morphological studies of an abnormal cartilage formation in young chickens. *J Nutr*, **86**: 236-244.
- Leach R.M. Jr. e Nesheim M.C. (1972) Further studies on tibial dyschondroplasia (cartilage abnormality) in young chicks. *J Nutr*, **102**: 1673-1680.
- Leach R.M. Jr. e Twal W.O. (1994) Autocrine, paracrine and hormonal signals involved in growth plate chondrocyte differentiation. *Poult Sci*, **73**: 883-888.
- Leboy P.S., Shapiro I.M., Uschmann B.D., Oshima O. e Lin D. (1988) Gene expression in mineralizing chick epiphyseal cartilage. *J Biol Chem*, **263**: 8515-8520.
- Lee B.S., Holliday L.S., Ojikutu B., Krits I. e Gluck S.L. (1996) Osteoclasts express the B2 isoform of vacuolar H(+)-ATPase intracellularly and on their plasma membranes. *Am J Physiol*, **270**: C382-C388.
- Lee E.R., Lamplugh L., Shepard N.L. e Mort J.S. (1995) The septoclast, a cathepsin B-rich cell involved in the resorption of growth plate cartilage. *J Histochem Cytochem*, **43**: 525-536.
- Lee E.R., Murphy G., El-Alfy M., Davoli M.A., Lamplugh L., Docherty A.J. e Leblond C.P. (1999) Active gelatinase B is identified by histozytography in the cartilage resorption sites of developing long bones. *Dev Dyn*, **215**: 190-205.
- Lee J.C. e Peter M.E. (2003) Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol Rev*, **193**: 39-47.
- Lee J.S. e Gottlieb A.I. (2002) Rho and basic fibroblast growth factor involvement in centrosome redistribution and actin microfilament remodeling during early endothelial wound repair. *J Vasc Surg*, **35**: 1242-1252.

- Lee J.S. e Gottlieb A.I. (2003) Understanding the role of the cytoskeleton in the complex regulation of the endothelial repair. *Histol Histopathol*, **18**: 879-887.
- Lee K., Lanske B., Karaplis A.C., Deeds J.D., Kohno H., Nissenson R.A., Kronenberg H.M. e Segre G.V. (1996) Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology*, **137**: 5109-5118.
- Lee S.H., Hungerford J.E., Little C.D. e Iruela-Arispe M.L. (1997) Proliferation and differentiation of smooth muscle cell precursors occurs simultaneously during the development of the vessel wall. *Dev Dyn*, **209**: 342-352.
- Lee S.K., Malpeli M., Cancedda R., Utani A., Yamada Y. e Kleinman H.K. (1999) Laminin chain expression by chick chondrocytes and mouse cartilaginous tissues in vivo and in vitro. *Exp Cell Res*, **236**: 212-222.
- Leeson S. e Summers J.D. (1980) Production and carcass characteristics of the broiler chicken. *Poult Sci*, **59**: 786-798.
- Leonardi R., Villari L., Bernasconi G., Piacentini C., Baciliero U. e Travali S. (2000) Cellular S-100 protein immunostaining in human dysfunctional temporomandibular joint discs. *Arch Oral Biol*, **45**: 411-418.
- Leonhardt S.A., Fearson K., Danese P.N. e Mason T.L. (1993) HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol Cell Biol*, **13**: 6304-6313.
- Leterrier C., Constantin P., Le Bihan Duval E., Marché G. e Nys Y. (1998) Troubles locomoteurs et qualité osseuse chez volailles de chair. *INRA Prod Anim*, **11**: 125-130.
- Leterrier C. e Nys Y. (1992) Composition, cortical structure and mechanical properties of chicken tibiotarsi: effect of growth rate. *Br Poult Sci*, **33**: 925-939.
- Leterrier C., Rose N., Constatin P. e Nys Y. (1998) Reducing growth rate of broiler chickens with a low energy diet does not improve cortical bone quality. *Br Poult Sci*, **39**: 24-30.
- Lewinson D. e Kogan Y. (1995) Ontogenesis of chondro/osteoclasts and their precursors in mandibular condyle of the mouse. *Bone*, **17**: 293-299.
- Lewinson D., Maor G., Rozen N., Rabinovich I., Stahl S. e Rachmiel A. (2001) Expression of vascular antigens by bone cells during bone regeneration in a membranous bone distraction system. *Histochem Cell Biol*, **116**: 381-388.
- Lewinson D. e Silbermann M. (1992) Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *Anat Rec*, **233**: 504-514.
- Li P., Allen H., Banerjee S. e Seshadri T. (1997) Characterization of mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *J Cell Biochem*, **64**: 27-32.
- Lijnen H.R. (2002) Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Moscow)*, **67**: 92-98.
- Lilburn M.S. (1994) Skeletal growth of commercial poultry species. *Poult Sci*, **73**: 897-903.
- Lilburn M.S., Lauterio T.J., Ngiam-Rilling K. e Smith J.H. (1989) Relationships among mineral balance in the diet, early growth manipulation, and incidence of tibial dyschondroplasia in different strains of meat type chickens. *Poult Sci*, **68**: 1263-1269.



- Lilburn M.S. e Leach R.M. Jr. (1980) Metabolism of abnormal cartilage cells associated with tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **59**: 1892-1896.
- Lilburn M.S. e Nestor K.E. (1991) Body weight and carcass development in different lines of turkeys. *Poult Sci*, **70**: 2223-2231.
- Ling J., Kincaid S.A., McDaniel G.R., Bartels J.E. e Johnstone B. (1996) Immunohistochemical study of a chondroitin-6-sulfate in growth plates of broiler chickens with high and low genetic predispositions to tibial dyschondroplasia. *Avian Dis*, **40**: 88-98.
- Ling J., Kincaid S.A., McDaniel G.R. e Bartels J.E. (1995) Ultrastructural changes of chondrocytes of growth plates of young broiler chickens predisposed to tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **74**: 788-794.
- Ling J., Kincaid S.A., McDaniel G.R. e Waegell W. (2000) Immunolocalization analysis of transforming growth factor- $\beta$ 1 in the growth plates of broiler chickens with high and low incidences of tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **79**: 1172-1178.
- Linsenmayer T.F. (1991) Collagen. In Hay E.D. (ed) *Cell Biology of Extracellular Matrix*. 2nd edition. Plenum Press, New York. pp: 7-44.
- Linsenmayer T.F., Long F., Nurminskaya M., Chen Q. e Schmid T.M. (1998) Type X collagen and other upregulated components of the avian hypertrophic cartilage program. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol*, **60**: 79-109.
- Liu G.Y., Frank N., Bartsch H. e Lin J.K. (1998) Induction of apoptosis by thiuramdisulfides, the reactive metabolites of dithiocarbamates, through coordinative modulation of NF $\kappa$ B, c-fos/c-jun, and p53 proteins. *Mol Carcinog*, **22**: 235-246.
- Liu Z., Xu J., Colvin J.S. e Ornitz D.M. (2002) Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev*, **16**: 859-869.
- Loeser R.F. (2000) Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology*, **37**: 109-116.
- Loeser R.F. (2002) Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology*, **39**: 119-124.
- Lombardi T., Di Felice R. e Samson J. (1992) Human odontoblasts contain S-100 protein-like immunoreactivity. *Anat Rec*, **232**: 190-193.
- Long F. e Linsenmayer T.F. (1998) Regulation of growth region cartilage proliferation and differentiation by perichondrium. *Development*, **125**: 1067-1073.
- Lorentz A., Schuppan D., Gebert A., Manns M.P. e Bischoff S.C. (2002) Regulatory effects of stem cell factor and interleukin-4 on adhesion of human mast cells to extracellular matrix proteins. *Blood*, **99**: 966-972.
- Lorget F., Kamel S., Mentaverri R., Wattel A., Naassila M., Maamer M. e Brazier M. (2000) High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**: 899-903.
- Loveridge N., Farquharson C., Hesketh J.E., Jakowlew S.B., Whitehead C.C. e Thorp B.H. (1993) The control of chondrocyte differentiation during endochondral bone growth in vivo: changes in TGF- $\beta$  and the proto-oncogene c-myc. *J Cell Sci*, **105**: 949-956.
- Loveridge N. e Noble B.S. (1994) Control of longitudinal growth: the role of nutrition. *Eur J Clin Nutr*, **48**: 75-84.

- Loveridge N., Thomson B.M. e Farquharson C. (1992) Bone growth and turnover. In Whitehead C.C. (ed.) Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. *Poult Sci Symp*, **23**: 3-17.
- Lu Q., Paredes M., Medina M., Zhou J. Cavallo R., Peifer M., Orecchio L. e Kosik K.S. (1999)  $\delta$ -catenina, and adhesive junction-associated protein wich promotes cell scattering. *J Cell Biol*, **144**: 519- 532.
- Lukes A., Mun-Bryce S., Lukes M. e Rosenberg G.A. (1999) Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*, **19**: 267-284.
- Lund L.R., Romer J., Thomasset N., Solberg H., Pyke C., Bissel M.J., Dano K. e Werb Z. (1996) Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and-dependent pathways. *Development*, **122**: 181-193.
- Mackie E.J. (2003) Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**: 1301-1305.
- Mackie E.J. e Murphy L.I. (1998) The role of Tenascin-C and related glycoproteins in early chondrogenesis. *Microsc Res Tech*, **43**: 102-110.
- Maes C., Carmeliet P., Moermans K., Stockmans I., Smets N., Collen D., Bouillon R. e Carmeliet G. (2002) Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF<sub>164</sub> and VEGF<sub>188</sub>. *Mech Dev*, **111**: 61-73.
- Majeska R.J., Port M. e Einhorn T.A. (1993) Attachment to extracellular matrix molecules by cells differing in the expression of osteoblastic traits. *J Bone Miner Res*, **8**: 277-289.
- Makower A.M., Wroblewski J. e Pawlowski A. (1988) Effect of IGF-I, EGF and FGF on proteoglycans synthesis by fractionated chondrocytes of rat rib growth plate. *Exp Cell Res*, **179**: 498-506.
- Malinda K.M. e Kleinman H.K. (1996) The laminins. *Int J Biochem Cell Biol*, **28**: 957-959.
- Mannello F. e Gazzanelli G. (2001) Tissue inhibitor of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis*, **6**: 479-482.
- Mannucci P.M. (1998) von Willebrand factor: a marker of endothelial damage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**: 1359-1362.
- Mansson B., Wenglén C., Morgelin M., Saxne T. e Heinegard D. (2001) Association of chondroadherin with collagen type II. *J Biol Chem*, **276**: 32883-32888.
- Marie P.J. (2002) Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol*, **190**: 297-305.
- Marikovsky M. (2002) Thiram inhibits angiogenesis and slows the development of experimental tumours in mice. *Br J Cancer*, **86**: 779-787.
- Marikovsky M., Nevo N., Vadai E. e Harris-Cerruti C. (2000) Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *Int J Cancer*, **97**: 34-41.
- Marrs J.A. e Nelson W.J. (1996) Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis. *Int Rev Cyt*, **165**: 159-205.
- Masson R., Lefebvre O., Noel A., Fahime M.E., Chenard M.P., Wendling C., Kebers F., LeMeur M., Dierich A., Foidart J.M., Basset P. e Rio M.C. (1998) In vivo evidence that the

- stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. *J Cell Biol*, **140**: 1535-1541.
- Matrisian I.M. (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioassays*, **14**: 455-463.
- Mayne R. e von der Mark K. (1983) Collagens of cartilage. In Hall B.K. (ed) *Cartilage*, vol 1. Structure, Function, and Biochemistry. Academic Press, New York. pp: 281-312.
- Mazzucchelli L. (2002) Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol*, **160**: 7-13.
- Mbalaviele G., Chen H., Boyce B.F., Mundy G. e Yoneda T. (1995) The role of cadherin in the generation of multinucleated osteoclast from mononuclear precursors in murine marrow. *J Clin Invest*, **95**: 2757-2765.
- Mbalaviele G., Nishimura R., Myoi A., Niewolna M., Reddy S.V., Chen D., Feng J., Roodman D., Mundy G.R. e Yoneda T. (1998) Cadherin-6 mediates the heterotypic interactions between the hemopoietic osteoclast cell lineage and stromal cells in a murine model of osteoclast differentiation. *J Cell Biol*, **141**: 1467-1476.
- McCarthy E.F. e Frassica F.J. (1998) *Pathology of Bone and Joint Disorders*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 385 páginas.
- McCawley L.J. e Matrisian L.M. (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore. *Current Opinion Cell Biol*, **13**: 534-540.
- McFarland C.D., Brown R.A., McLaughlin B., Ali S.Y. e Weiss J.B. (1990) Production of endothelial cell stimulating angiogenesis factor (ESAF) by chondrocytes during in vitro cartilage calcification. *Bone Miner*, **11**: 319-333.
- McIntush E.W. e Smith M.F. (1998) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. *Reviews of Reprod*, **3**: 23-30.
- Medill N.J., Praul C.A., Ford B.C. e Leach R.M. (2001) Parathyroid hormone-related peptide expression in the epiphyseal growth plate of the juvenile chicken: evidence for the origin of the parathyroid hormone-related peptide found in the epiphyseal growth plate. *J Cell Biochem*, **80**: 504-511.
- Meichle A., Philipp A. e Eilers M. (1994) The functions of Myc proteins. *Biochem Biophys Acta*, **1114**: 129-146.
- Menanteau J., Newman W.F. e Newman M.W. (1982) A study of bone proteins wich can prevent hydroxyapatite formation. *Metab Bone Dis Relat Res*, **4**: 157-161.
- Mendler M., Eich-Bender S.G., Vaughan L., Winterhalter K.H. e Bruckner P. (1989) Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol*, **108**: 191-197.
- Mercer J.T. e Hill W.G. (1984) Estimation of genetic parameters for skeletal defects in broiler chickens. *Heredity*, **53**: 193-203.
- Mignon-Grasteau S., Beaumont C., Poivey J.-P. e Rochambeau H. (1998) Estimation of the genetic parameters of sexual dimorphism of body weight in "label" chickens and Muscovy ducks. *Genet Sel Evol*, **30**: 481-491.
- Minkin C. (1982) Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*, **34**: 285-290.

- Mitchell R.D. e Burke W.H. (1995) Genotype and sexual influences on growth and muscle development of chicken embryos. *Growth Dev Aging*, **59**: 31-44.
- Mitchison T., Evans L., Schulze E. e Kirschner M. (1986) Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. *Cell*, **45**: 515-527.
- Mohr W., Kuhn C., Pelster B. e Wessinghage D. (1985) S-100 protein in normal, osteoarthrotic, and arthritic cartilage. *Rheumatol Int*, **5**: 273-277.
- Mooney D., Langer R. e Ingber D.E. (1995) Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. *J Cell Sci*, **108**: 2311-2320.
- Moore B. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Comm*, **19**: 739-744.
- Morimoto R.I., Tissières A. e Georgopoulos C. (1990) The stress response: function of the proteins and perspectives. In Morimoto R.I., Tissières A. e Georgopoulos C. (eds) *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp: 1-36.
- Morimoto R.I., Tissières A. e Georgopoulos C. (1994) *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Moses M.A. (1997) The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells*, **15**: 180-189.
- Moses M.A., Sudhalter J. e Langer R. (1990) Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science*, **248**: 1408-1410.
- Moses M.A. Sudhalter J. e Langer R. (1992) Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *J Cell Biol*, **119**: 475-482.
- Moses M.A., Wiederschain D., Wu I., Fernandez C.A., Ghazizadeh V., Lane W.S., Flynn E., Sytkowski A., Tao T. e Langer R. (1999) Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 2645-2650.
- Mudgett J.S., Hutchinson N.I., Chartrain N.A., Forsyth A.J., McDonnell J., Singer I.I., Bayne E.K., Flanagan J., Kawka D., Shen C.F., Stevens K., Chen H., Trumbauer M. e Visco D.M. (1998) Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction. *Arthritis Rheum*, **41**: 110-121.
- Muller-Glausser W.B., Humbel B., Glatt M., Stauli P., Wintherhalter K.H. e Bruckner P. (1986) On the role of type IX collagen in the extracellular matrix cartilage: type IX collagen is localized to intersection of collagen fibrils. *J Biol Chem*, **102**: 1931-1939.
- Muratani M. e Tansey W.P. (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nature Rev Mol Cell Biol*, **4**: 1-10.
- Murphy G., Knauper V., Atkinson S., Butler G., English W., Hutton M., Stracke J. e Clark I. (2002) Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res*, **4 (suppl 3)**: S39-S49.
- Murphy G. e Reynolds J.J. (2002) Extracellular matrix degradation. In Peter M. Royce P.M. e Steinmann B. (Eds) *Connective Tissue and Its Heritable Disorders: Molecular, Genetic, and Medical Aspects*, 2nd Edition, John Wiley & Sons. New York. pp: 343-384.

- Murphy G., Stanton H., Cowell S., Butler G., Knauper V., Atkinson S. e Gavrilovic J. (1999) Mechanisms for pro-matrix metalloproteinase activation. *APMIS*, **107**: 38-44.
- Murray E., Bentley G.V., Grisanti M.S. e Murray S.S. (1998) The ubiquitin-proteasome system and cellular proliferation and regulation in osteoblastic cells. *Exp Cell Res*, **242**: 460-469.
- Nachman R., Levine R. e Jaffe E.A. (1977) Synthesis of factor VIII antigen by cultured guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest*, **60**: 914-921.
- Nachtigal P., Gojova A. e Semecky V. (2001) The role of epithelial and vascular-endothelial cadherin in differentiation and maintenance tissue integrity. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, **44**: 83-87.
- Nagai H. e Aoki M. (2002) Inhibition of growth plate angiogenesis and endochondral ossification with diminished expression of MMP-13 in hypertrophic chondrocytes in FGF-2-treated rats. *Bone Miner Metab*, **20**: 142-147.
- Nagase H. e Brew K. (2002) Engineering of tissue inhibitors of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res*, **4 (suppl 3)**: S51-S61.
- Nagase H. e Woessner J.F. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, **274**: 21491-21494.
- Nakagawa M., Kaneda T., Arakawa T., Morita S., Sato T., Yomada T., Hanada K., Kumegawa M. e Hakeda Y. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett*, **473**: 161-164.
- Nakamura S., Nakamura T. e Kawahara H. (1988) S-100 protein in human articular cartilage. *Acta Orthop Scand*, **59**: 438-440.
- Nakanishi T., Nishida T., Shimo T., Kobayashi K., Kubo T., Tamatani T., Tezuka K. e Takigawa M. (2000) Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology*, **141**: 264-273.
- Nakase T., Kaneko M., Tomita T., Myoui A., Ariga K., Sugamoto K., Uchiyama Y., Ochi T. e Yoshikawa H. (2000) Immunohistochemical detection of cathepsin D, K, and L in the process of endochondral ossification in the human. *Histochem Cell Biol*, **114**: 21-27.
- Nap R.C. e Hazewinkel H.A. (1994) Growth and skeletal development in the dog in relation to nutrition; a review. *Vet Quart*, **16**: 50-59.
- Nath P., Getzenberg R., Beebe D., Pallansch L. e Zelenka P. (1987) c-myc mRNA is elevated as differentiating lens cells withdraw from the cell cycle. *Exp Cell Res*, **169**: 215-222.
- Nathan C. e Sporn M.J. (1991) Cytokines in context. *J Cell Biol*, **113**: 981-986.
- Naujokat C e Hoffmann S. (2002) Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest*, **82**: 965-980.
- NCSS (2002) <http://www.ncss.com>
- Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., Drouet C., Robert C., Guillermet C., Brambilla C. e Brambilla E. (1996) In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*, **44**: 959-968.

- Nelson M.R. e Chazin W.J. (1998) Structures of EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins: diversity in the organization, packing and response to  $\text{Ca}^{2+}$  binding. *BioMetals*, **11**: 297-318.
- Nelson T.S., Kirby L.K., Purdy J.W., Johnson Z.B. e Beasley J.N. (1992) Effect of age of maternal flock and strain on the incidence of tibial dyschondroplasia in growing chicks. *Avian Dis*, **36**: 1015-1018.
- Neomarkers (2002) <http://www.labvision.com>
- Neri M., Descalzi-Cancedda F. e Cancedda R. (1992) Heat shock response in cultured chick embryo chondrocytes: osteonectin is a secreted heat-shock protein. *Eur J Biochem*, **205**: 569-574.
- Nestor K.E., Bacon W.L., Havenstein G.B., Saif Y.M. e Renner P.A. (1987) Comparison of bone and muscle growth in turkey lines selected for increased body weight and increased shank width. *Poult Sci*, **66**: 1421-1428.
- Nestor K.E., Bacon W.L., Havenstein G.B., Saif Y.M. e Renner P.A. (1988) Carcass traits of turkeys from lines selected for increased growth rate or increased shank width. *Poult Sci*, **67**: 1660-1667.
- Nestor K.E., Bacon W.L., Saif Y.M. e Renner P.A. (1985) The influence of genetic increases in shank width on body weight, walking ability and reproduction of turkeys. *Poult Sci*, **64**: 2248-2255.
- Nguyen M., Arkell J. e Jackson C.J. (2001) Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**: 960-970.
- Nguyen Q., Willenbrock F., Cockett M.I., O'Shea M., Docherty A.J. e Murphy G. (1994) Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. *Biochemistry*, **33**: 2089-2095.
- Nie D., Genge B.R., Wu L.N.Y. e Wuthier R.E. (1995) Defect in formation of functional matrix vesicles by growth plate chondrocytes in avian dyschondroplasia: evidence of defective tissue vascularization. *J Bone Miner Res*, **10**: 1625-1634.
- Nie D., Ishikawa Y., Yoshimori T., Wuthier R.E. e Wu L.N. (1998) Retinoic acid treatment elevates matrix metalloproteinase-2 protein and mRNA levels in avian growth plate chondrocyte cultures. *J Cell Biochem*, **68**: 90-99.
- Niida S., Kaku M., Amano H., Yoshida H., Kataoka H., Nishikawa S., Tanne K., Maeda N., Nishikawa S. e Kodama H. (1999) Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med*, **190**: 293-298.
- Nissen N.N., Polverini P.J., Koch A.E., Volin M.V., Gamelli R.L. e DiPietro L.A. (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol*, **152**: 1445-1452.
- Nobel C.S., Burgess D.H., Zhivotovsky B., Burkitt M.J., Orrenius S. e Slater A.F. (1997) Mechanism of dithiocarbamate inhibition of apoptosis: thiol oxidation by dithiocarbamate disulfides directly inhibits processing of the caspase-3 proenzyme. *Chem Res Toxicol*, **10**: 636-643.

- Nobel C.S., Kimland M., Lind B., Orrenius S. e Slater A.F. (1995) Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper. *J Biol Chem*, **270**: 26202-26208.
- Nogales E. (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem*, **69**: 277-302.
- Nollet F., Kools P e Van Roy F. (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, **299**: 551-572.
- Noonan K.J., Hunziker E.B., Nessler J. e Buckwalter J.A. (1998) Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones. *J Orthop Res*, **16**: 500-508.
- Nordhal J., Anderson G. e Reinholt F.P. (1998) Chondroclasts and osteoclasts in bones of young rats: comparisons of ultrastructural and functional features. *Calcif Tissue Int*, **63**: 401-408.
- Nuttall M.E., Nadeau D.P., Fisher P.W., Wang F., Keller P.M., DeWolf W.E. Jr, Goldring M.B., Badger A.M., Lee D., Levy M.A., Gowen M. e Lark M.W. (2000) Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in vitro. *J Orthop Res*, **18**: 356-363.
- Oberlender S.A. e Tuan R.S. (1994a) Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun*, **2**: 521-537.
- Oberlender S.A. e Tuan R.S. (1994b) Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*, **120**: 177-187.
- Oguz I., Altan O., Kirkpınar F. e Settar P. (1996) Body weights, carcass characteristics, organ weights fat, and lipid content of liver and carcass in two lines of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), unselected and selected for four week body weight. *Br Poult Sci*, **37**: 579-588.
- Ohara Y., Peterson T.E. e Harrison D.G. (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, **91**: 2456-2451.
- Ohashi N., Robling A.G., Burr D.B. e Turner C.H. (2002) The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res*, **17**: 284-292.
- Ohba Y., Goto Y., Kimura Y., Suzuki F., Hisa T., Takahashi K. e Takigawa M. (1995) Purification of an angiogenesis inhibitor from culture medium conditioned by a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8. *Biochim Biophys Acta*, **1245**: 1-8.
- Ohsawa Y., Nitatori T., Higuchi S., Kominami E. e Uchiyama Y (1993) Lysosomal cysteine and aspartic proteinases, acid phosphatases, and an endogenous cysteine proteinase inhibitor, cystatin-beta, in rat osteoclasts. *J Histochem Cytochem*, **41**: 1075-1083.
- Ohyama K., Farquharson C., Whitehead C.C. e Shapiro I.M. (1997) Further observations on programmed cell death in the epiphyseal growth plate: comparison of normal and dyschondroplastic epiphyses. *J Bone Miner Res*, **12**: 1647-1656.

- Okajima K., Honda I. e Kitagawa T. (1988) Immunohistochemical distribution of S-100 protein in tumors and tumor-like lesions of bone and cartilage. *Cancer*, **61**: 792-799.
- Okazaki M., Takeshita S., Kawai S., Kikuno R., Tsujimura A., Kudo A. e Amann E. (1994) Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J Biol Chem*, **269**: 12092-12098.
- O'Keefe R.J., Crabb I.D., Puzas J.E. e Rosier R.N. (1992) Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res*, **7**: 397-404.
- O'Keefe R.J., Crabb I.D., Puzas J.E. e Rosier R.N. (1994) Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factor on DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res*, **12**: 299-310.
- Oni O.O. (2000) Proto-oncogene expression during fracture repair. *Injury*, **31**: 363-366.
- Opdenakker G., Van den Steen P.E., Dubois B., Nelissen I., Van Coillie E., Masure S., Proost P. e Van Damme J. (2001) Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*, **69**: 851-859.
- Opdenakker G., Van den Steen P.E. e Van Damme J. (2001) Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends Immunol*, **22**: 571-579.
- Orlowski R.Z. (1999) The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ*, **6**: 303-313.
- Ornitz D.M. (2001) Regulation of chondrocyte growth and differentiation by fibroblast growth factor receptor 3. *Novartis Found Symp*, **232**: 63-76; discussion 76-80, 272-282.
- Ornoy A. (1995) Comparative aspects of cartilage and bone formation in man, rats, and mice. In Ornoy A. (ed) *Animal Models of Human Related Calcium Metabolic Disorders*. CRC Press, Boca Raton. pp: 1-21.
- Ortega N., Behonick D., Stickens D. e Werb Z. (2003) How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, **995**: 109-116.
- Orth M.W. (1999) The regulation of growth plate cartilage turnover. *J Anim Sci*, **77** (suppl 2): 183- 189.
- Orth M.W., Bai Y., Zeytun I.H. e Cook M.E. (1994) Excess levels of cysteine and homocysteine induce tibial dyschondroplastic in broiler chicks. *J Nutr*, **122**: 482-487.
- Orth M.W. e Cook M.E. (1994) Avian tibial dyschondroplasia: a morphological and biochemical review of the growth plate lesion and its causes. *Vet Pathol*, **31**: 403-414.
- Orth M.W., Martinez D.A., Cook M.E. e Vailas A.C. (1991) Nonreducible crosslink formation in tibial dyschondroplastic growth plate cartilage from broiler chicks fed homocysteine. *Biochem Biophys Res Comm*, **179**: 1582-1586.
- Orth M.W., Peters T.L. e Chlebek-Brown K.A. (2000) Cartilage turnover in embryonic chick tibial explant cultures. *Poult Sci*, **79**: 990-993.
- Ottani V., Raspanti M. e Ruggeri A. (2001) Collagen structure and functional implications. *Micron*, **32**: 251-260.



- Pacifici M., Oshima O., Fisher L.W., Young M.F., Shapiro I.M. e Leboy P.S. (1990) Changes in osteonectin distribution and levels are associated with mineralization of the chicken tibial growth cartilage. *Calcif Tissue Int*, **47**: 51-61.
- Paleolog E.M., Crossman D.G., McVey J.H. e Pearson J.D. (1990) Differential regulation by cytokines of constitutive and regulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood*, **75**: 688-699.
- Parakh K.A. e Kannan K. (1993) Demonstration of a ubiquitin binding site on murine haemopoietic progenitor cells: implication of ubiquitin in homing and adhesion. *Br J Haematol*, **84**: 212-218.
- Parkinson G., Thorp B.H., Azuolas J. e Vaiano S. (1996) Sequential studies of endochondral ossification and serum 1,25-dihydroxycholecalciferol in broiler chickens between one and 21 days of age. *Res Vet Sci*, **60**: 173-178.
- Parkinson G., Vaiano S. e Azuolas J. (1992) Rickets and tibial dyschondroplasia in australian broiler chicken. *Aust Poult Sci Symp*, University of Sydney, Sydney. pp: 125-130.
- Parks W.C. e Shapiro S.D. (2001) Matrix metalloproteinases in lung biology. *Resp Res*, **2**: 10-19.
- Pawlowski A., Makower A.M., Madsen K., Wroblewski J. e Friberg U. (1987) Cell fractions from rat rib growth cartilage: biochemical characterization of matrix molecules. *Exp Cell Res*, **164**: 211-222.
- PDB (2003) Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/>
- Peled A., Zipori D., Abramsky O., Ovadia H. e Shezen E. (1991) Expression of alpha-smooth muscle actin in murine bone marrow stromal cells. *Blood*, **78**: 304-309.
- Pelengaris S., Khan M. e Evan G. (2002) c-myc: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*, **2**: 764-776.
- Pelletier L., Regnard J., Fellmann D. e Charbord P. (2000) An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: role of hematopoietic cytokines. *Lab Invest*, **80**: 501-511.
- Pepper M.S. (2001) Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**: 1104-1117.
- Pepper M.S., Montesano R., Vassalli J.D. e Orci L. (1991) Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation *in vitro*: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol*, **146**: 170-179.
- Petruzzelli L., Takami M. e Humes H.D. (1999) Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med*, **106**: 467-476.
- Philchenkov A.A. (2003) Caspases as regulators of apoptosis and other cell functions. *Biochemistry (Mosc)*, **68**: 365-376.
- Piedra M.E., Delgado M.D., Ros M.A. e Leon J. (2002) c-myc overexpression increases cell size and impairs cartilage differentiation during chick limb development. *Cell Growth Differ*, **13**: 185-193.

- Pines M., Granot I. e Hurwitz S. (1990) Cyclic AMP-dependent inhibition of collagen synthesis in avian epiphyseal cartilage cells: effect of chicken and human parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Bone Miner*, **9**: 23-33.
- Pines M. e Hurwitz S. (1991) The role of the growth plate in longitudinal bone growth. *Poult Sci*, **70**: 1806-1814.
- Pines M., Knopov V., Genina O., Hurwitz S., Faerman A., Gerstenfeld L.C. e Leach R.M. (1998) Development of avian tibial dyschondroplasia: gene expression and protein synthesis. *Calcif Tissue Int*, **63**: 521-527.
- Pistone M., Sanguineti C., Federici A., Sanguineti F., Defilippi P., Santolini F., Querze G., Marchisio P.C. e Manduca P. (1996) Integrin synthesis and utilization in cultured human osteoblasts. *Cell Biol Int*, **20**: 471-479.
- Pitsillides A.A., Rawlinson S.C.F., Mosley J.R. e Lanyon L.E. (1999) Bone's early responses to mechanical loading differ in distinct genetic strains of chick: selection for enhanced growth reduces skeletal adaptability. *J Bone Miner Res*, **14**: 980-987.
- Plancha C.E. e David-Ferreira J.F. (1999) Citosqueleto: composição, organização e significado funcional. In Azevedo C. (Coord) *Biologia Celular*, pp. 203-218. LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa.
- Pober J.S. e Cotran R.S. (1990) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, **50**: 537-544.
- Ponce M.L., Nomizu M., Delgado M.C., Kuratomi Y., Hoffman M.P., Powell S., Yamada Y., Kleinman H.K. e Malinda K.M. (1999) Identification of endothelial cell binding sites on the laminin  $\gamma$ 1 chain. *Circ Res*, **84**: 688-694.
- Poole A.R., Pidoux I., Reiner A., Choi H. e Rosenberg L.C. (1984) Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. *J Cell Biol*, **98**: 532-539.
- Poole A.R., Matsui Y., Hinek A. e Lee E.R. (1989) Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat Rec*, **224**: 167-179.
- Porter A.G. e Janicke R.U. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, **6**: 99-104.
- Pottinger B.E., Read R.C., Paleolog E.M. e Pearson J.D. (1989) von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res*, **53**: 389-395.
- Poulos P.W. Jr. (1978) Tibial dyschondroplasia (osteochondrosis) in the turkey. A morphologic investigation. *Acta Radiol Suppl*, **358**: 197-227.
- Poulos P.W. Jr., Reiland S., Elwinger K. e Olsson S.E. (1978) Skeletal lesions in the broiler, with special reference to dyschondroplasia (osteochondrosis). Pathology, frequency and clinical significance in two strains of birds on high and low energy feed. *Acta Radiol Suppl*, **358**: 229-275.
- Praul C.A., Ford B.C., Gay C.V., Pines M. e Leach R.M. (2000) Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **79**: 1009-1013.

- Praul C.A., Gay C.V. e Leach R.M. (1997) Chondrocytes of the tibial dyschondroplastic lesion are apoptotic. *Int J Dev Biol*, **41**: 621-626.
- Price J.S. e Russel G.G. (1992) Bone remodeling: regulation by systemic and local factors. In Whitehead C.C. (ed.) Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. *Poult Sci Symp*, **23**: 39-60.
- Prohaska J.R. (1990) Biochemical changes in copper deficiency. *J Nutr Biochem*, **1**: 452-461.
- Quarto R., Dozin B., Bonaldo P., Cancedda R. e Colombatti A. (1993) Type VI collagen expression is upregulated in the early events of chondrocyte differentiation. *Dev*, **117**: 245-251.
- Quarto R., Dozin B., Tacchetti C., Robino G., Zenke M., Campanile G. e Cancedda R. (1992) Constitutive myc expression impairs hypertrophy and calcification in cartilage. *Dev Biol*, **149**: 168-176.
- Rafael A., Capela e Silva F., Castro, R.F. e Cabrita, A.M.S (2000) Evaluation of Endochondral Ossification in a Mammal Experimental Model after Thiram Administration. American College of Toxicology, 21st Annual Meeting, San Diego, California, P-26, 59.
- Rammes A., Roth J., Goebeler M., Klemot M., Hartmann M. e Sorg C. (1997) Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium binding proteins of the S100 family, are secreted by activated macrophages via a novel, tubulin dependent pathway. *J Biol Chem*, **272**: 9496-9502.
- Rantakokko J. e Vuorio E. (1996) Proteases in endochondral ossification and bone remodeling. *ICOP Newsletter*, **April**: 1-2.
- Rath N.C., Balog J.M., Huff W.E., Huff G.R., Kulkarni G.B. e Tierce J.F. (1999) Comparative differences in the composition and biochemical properties of tibiae of seven- and seventy-two-week-old male and female broiler breeder chickens. *Poult Sci*, **78**: 1232-1239.
- Rath N.C., Bayyari G.R., Balog J.M. e Huff W.E. (1994) Physiological studies of turkey tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **73**: 416-424.
- Rath N.C., Huff W.E., Balog J.M. e Bayyari G.R. (1994) Effect of gonadal steroids on bone and other physiological parameters of male broiler chickens. *Poult Sci*, **75**: 556-562.
- Rath N.C., Huff W.E., Balog J.M., Bayyari G.R. e Reddy R.P. (1997) Matrix metalloproteinases activities in avian tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **76**: 501-505.
- Rath N.C., Huff W.E., Bayyari G.R. e Balog J.M. (1995) Effect of thiram on chick chondrocytes in culture. *J Toxicol Environ Health*, **44**: 369-376.
- Rath N.C., Huff W.E., Bayyari G.R. e Balog J.M. (1998) Cell death in avian tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **76**: 501-505.
- Reddi A.H. (2000a) Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection. *Pediatr Nephrol*, **14**: 598-601.
- Reddi A.H. (2000b) Initiation and promotion of endochondral bone formation by bone morphogenetic proteins: potential for avian tibial dyschondroplasia. *Poult Sci*, **79**: 978-981.

- Redini F., Galera P., Mauviel A., Loyau G. e Pujol J.P. (1988) Transforming growth factor- $\beta$  stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *Fed Eur Biochem Soc Lett*, **234**: 172-176.
- Redini F., Lafuma C., Pujol J.P., Robert L. e Hornbeck W. (1988) Effects of cytokines and growth factors on the expression of elastase activity by human synoviocytes, dermal fibroblasts and rabbit articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **155**: 786-793.
- Reginato A.M., Bashey R.I., Rosselot G., Leach R.M., Gay C.V. e Jimenez S.A. (1998) Type X collagen biosynthesis and expression in avian tibial dyschondroplasia. *Osteoarthritis Cartilage*, **6**: 125-136.
- Reichenberger E., Aigner T., von der Mark K., Stob H. e Bertling W. (1991) In situ hybridisation studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev Bio*, **148**: 562-572.
- Reiland S., Olsson S.E., Poulos P.W. Jr. e Elwinger K. (1978) Normal and pathologic skeletal development in broiler and leghorn chickens. A comparative investigation. *Acta Radiol Suppl*, **358**: 277-298.
- Reinholt F.P., Engfeldt B., Hjerpe A. e Jansson K. (1982) Stereological studies on the epiphyseal growth plate with special reference to the distribution of matrix vesicles. *J Ultrastruct Res*, **80**: 270-279.
- Reinholt F.P., Widholm S.M., Ek-Rylander B. e Andersson G. (1990) Ultrastructural localization of a tartrate-resistant acid ATPase in bone. *J Bone Miner Res*, **5**: 1055-1061.
- Religa P., Bojakowski K., Maksymowicz M., Bojakowska M., Sirsjo A., Gaciong Z., Olszewski W., Hedin U. e Thyberg J. (2002) Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries. *Transplantation*, **74**: 1310-1315.
- Ren P., Rowland G.N. 3rd e Halper J. (1997) Expression of growth factors in chicken growth plate with special reference to tibial dyschondroplasia. *J Comp Pathol*, **116**: 303-320.
- Ren W., Kinniburgh A.J. e Dziak R. (1992) Regulation of C-myc protooncogene expression in osteoblastic cells by arachidonic acid metabolites: relationship to proliferation. *Calcif Tissue Int*, **50**: 372-377.
- Rennie J.S., Whitehead C.C. e Thorp B.H. (1993) The effect of dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol in preventing tibial dyschondroplasia in broilers fed on diets imbalanced in calcium and phosphorus. *Br J Nutr*, **69**: 809-816.
- Reynolds J.J. (1996) Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis*, **2**: 70-76.
- Ricciardi A., Danova M. e Ascari E. (1988) Bromodeoxyuridine for cell kinetic investigations in humans. *Haematologica*, **73**: 423-430.
- Riddell C. (1975a) Tibial dyschondroplasia in domestic poultry. Slide study set #6. American Association of Avian Pathologists.

- Riddell C. (1975b) Studies on the pathogenesis of tibial dyschondroplasia in chickens. III Effect of body weight. *Avian Dis*, **19**: 497-505.
- Riddell C. (1975c) Studies on the pathogenesis of tibial dyschondroplasia in chickens. II Growth rate of long bones. *Avian Dis*, **19**: 490-496.
- Riddell C. (1975d) The development of tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *Avian Dis*, **19**: 443-462.
- Riddell C. (1975e) Studies on the pathogenesis of tibial dyschondroplasia in chickens. I. Production of a similar defect by surgical interference. *Avian Dis*, **19**: 483-489.
- Riddell C. (1976) Selection of broiler chickens for a high and low incidence of tibial dyschondroplasia with observations on spondylolisthesis and twisted leg (perosis). *Poult Sci*, **55**: 145-151.
- Riddell C. (1977) Studies on the pathogenesis of tibial dyschondroplasia in chickens. IV. Some features of the vascular supply to the growth plates of the tibiotarsus. *Avian Dis*, **21**: 9-15.
- Riddell C., Howell J. e Kaye M. (1971) Tibial dyschondroplasia in broiler chickens in western Canada. *Avian Dis*, **15**: 557-565.
- Riddell C., King M.W. e Gunasekera K. (1983) Pathology of the skeleton and tendons of broiler chicken reared to roaster weights. I Crippled chickens. *Avian Dis*, **27**: 950-962.
- Risau W. e Lemmon V. (1988) Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol*, **125**: 441-450.
- Roach H.I. (1997) New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. *J Bone Miner Res*, **12**: 795-805.
- Roach H.I. (1999) Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *Histochem J*, **31**: 53-61.
- Roach H.I., Baker J.E. e Clarke N.M. (1998) Initiation of the bony epiphysis in long bones: chronology of interactions between the vascular system and the chondrocytes. *J Bone Miner Res*, **13**: 950-961.
- Roach H.I. e Erenpreisa J.E (1996) The phenotypic switch from chondrocytes to bone-forming cells involves asymmetric cell division and apoptosis. *Connective Tissue Res*, **35**: 85-91.
- Roach H.I., Erenpreisa J. e Aigner T. (1995) Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol*, **131**: 483-494.
- Roach H.I. e Shearer J.R. (1989) Cartilage resorption and endochondral bone formation during the development of long bones in chick embryos. *Bone Miner*, **6**: 289-309.
- Roberson K.D., Hill C.H. e Ferket P.R. (1993) Additive amelioration of tibial dyschondroplasia in broilers by supplemental calcium of feed deprivation. *Poult Sci*, **72**: 798-805.
- Robertson J.D. e Orrenius S. (2000) Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol*, **30**: 609-627.
- Roche P., Goldberg H.A., Delmas P.D. e Malaval L. (1999a) Selective attachment of osteoprogenitors to laminin. *Bone*, **24**: 329-336.

- Roche P., Rousselle P., Lissitzky J.C., Delmas P.D. e Malaval L. (1999b) Isoform-specific attachment of osteoprogenitors to laminins: mapping to the short arms of laminin-1. *Exp Cell Res*, **250**: 465-474.
- Rodrigues E., Capela e Silva F., Pereira A., Pinelas A., Lino C., Fialho I. e Cabrita A.S. (2000) Desenvolvimento do intestino delgado em machos e fêmeas de frangos de carne nos primeiros 21 dias pós-eclosão. *Rev Port Zootecnia* **1**: 167-179.
- Rojas A.I. e Ahmed A.R. (1999) Adhesion receptors in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **10**: 337-358.
- Romberg R.W., Werness P.G., Riggs B.L. e Mann M.G. (1986) Inhibition of dihydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium binding proteins. *Biochemistry*, **25**: 1176-1180.
- Ronot X., Gaillardfroger B., Hainque B. e Adolphe M. (1988) In vitro aging of articular chondrocytes identified by analysis of DNA and tubulin content and relationship to cell size and protein content. *Cytometry*, **9**: 436-440.
- Roodman G.D. (1996) Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev*, **17**: 308-332.
- Roodman G.D. (1999) Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol*, **27**: 1229-1241.
- Rosati R., Horan G.S., Pinero G.J., Garofalo S., Keene D.R., Horton W.A., Vuorio E., de Crombrughe B. e Behringer R.R. (1994) Normal long bone growth and development in type X collagen-null mice. *Nat Genet*, **8**: 129-135.
- Rose N., Constatin P. e Leterrier C. (1996) Sex differences in bone growth of broiler chickens. *Growth Dev Aging*, **60**: 49-59.
- Rosenberg G.A. (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*, **39**: 279-291.
- Rosse T., Olivier R., Monney L., Rager M., Conus S., Fellay I., Jansen B. e Borner C. (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, **391**: 496-499.
- Rosselot G., Sokol C. e Leach R.M. (1994) Effect of lesion size on the metabolic activity of tibial dyschondroplastic chondrocytes. *Poult Sci*, **73**: 452-456.
- Rozenblatt-Rosen O., Mosonego-Ornan E., Sadot E., Madar-Shapiro L. Sheinin Y., Ginsberg D. e Yayon A. (2002) Induction of chondrocyte growth arrest by FGF: transcriptional and cytoskeletal alterations. *J Cell Sci*, **115**: 553-562.
- Ruggeri Z.M. (2001) Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol*, **14**: 257-279.
- Saadeh P.B., Mehrara B.J., Steinbrech D.S., Dudziak M.E., Greenwald J.A., Luchs J.S., Spector J.A., Ueno H., Gittes G.K. e Longaker M.T. (1999) Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol*, **277**: C628-C637.
- Sadler J.E. (1991) Von Willebrand factor. *J Biol Chem*, **266**: 22777-22784.
- Saenko E.L., Yaropolova I. e Harris E.D. (1994) Biological functions of ceruloplasmin expressed through copper-binding sites and a cellular receptor. *J Trace Elem Exp Med*, **7**: 69-88.

- Sakaguchi M., Miyazaki M., Inoue Y., Tsuji T., Kouchi H., Tanaka T., Yamada H., Namba M. (2000) Relationship between contact inhibition and intranuclear S100C of normal human fibroblasts. *J Cell Biol*, **149**: 1193-1206.
- Sakiyama H., Inaba N., Toyoguchi T., Okada Y., Matsumoto M., Moriya H. e Ohtsu H. (1994) Immunolocalization of complement C1s and matrix metalloproteinase 9 (92kDa gelatinase/type IV collagenase) in the primary ossification center of the human femur. *Cell Tissue Res*, **277**: 239-245.
- Sakiyama H., Masuda R., Inoue N., Yamamoto K., Kuriwa K., Nakagawa K. e Yoshida K. (2001) Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers. *J Bone Miner Metab*, **19**: 220-227.
- Salamonsen L.A. (1999) Role of proteases in implantation. *Reviews of Reprod*, **4**: 11-22.
- Sambade C. (1999) A morte celular por apoptose. In Azevedo C. (Coord) *Biologia Celular*, pp. 461-479. LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa.
- Sanders B.M. e Dyer S.D. (1994) Celular stress response. *Environ Toxicol Chemistry*, **13**: 1209-1210.
- Sanders B.M., Goering P.L. e Jenkins K. (1996) The role of general and metal-specific cellular responses in protection and repair of metal-induced damage: stress proteins and metallothioneins. In Chang L.W. (ed) *Toxicology of Metals*. CRC Press, Boca Raton. pp: 165-187.
- Sambade C. (1999) A morte celular por apoptose. In Azevedo C. (Coord) *Biologia Celular*, pp. 461-479. LIDEL-Edições Técnicas, Lisboa.
- Sandberg M. e Vuorio E. (1987) Localization of type I, II and III collagen mRNAs in developing human skeletal tissue *in situ* hybridization. *J Cell Biol*, **104**: 1077-1084.
- Sasaki M., Kashima M., Ito T., Watanabe A., Izumiyama N., Sano M., Kagaya M., Shioya T. e Miura M. (2000a) Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin-1beta and TNF-alpha. *Mediators Inflamm*, **9**: 155-160.
- Sasaki M., Kashima M., Ito T., Watanabe A., Sano M., Kagaya M., Shioya T. e Miura M. (2000b) Effect of heparin and related glycosaminoglycan on PDGF-induced lung fibroblast proliferation, chemotactic response and matrix metalloproteinases activity. *Mediators Inflamm*, **9**: 85-91.
- Sasano Y., Zhu J.X., Tsubota M., Takahashi I., Onodera K., Mizoguchi I. e Kagayama M. (2002) Gene expression of MMP8 and MMP13 during embryonic development of bone and cartilage in the rat mandible and hind limb. *J Histochem Cytochem*, **50**: 325-332.
- Sauver B. e Mongin P. (1978) Tibial dyschondroplasia, a cartilage abnormality in poultry. *Ann Biol Anim Biochim Biophys*, **18**: 87-98.
- Sauveur B., Garabedian M., Fellot C., Mongin P. e Balsan S. (1977) The effect of induced metabolic acidosis on vitamin D<sub>3</sub> metabolism in rachitic chicks. *Calcif Tissue Res*, **23**: 121-124.

- Schedewie H.E., Willich H., Grobe H. e Mueller K.M. (1973) Skeletal findings in homocystinuria: a collaborative study. *Pediatr Radiol*, **1**: 12-23.
- Schelinfreund R.H., Barger S.W., Welsh M.J. e Van Eldik L.J. (1990) Antisense inhibition of glial S100 beta production results in alterations in cell morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation. *J Cell Biol*, **111**: 2021-2028.
- Schenk R.K., Spiro D. e Wiener J. (1967) Cartilage resorption in the tibial epiphyseal plate of growing rats. *J Cell Biol*, **34**: 275-291.
- Schipani E., Langman C., Hunzelman J., Le Merrer M., Loke K.Y., Dillon M.J., Silve C. e Juppner H. (1999) A novel parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mutation in Jansen's methaphyseal chondrodysplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**: 3052-3057.
- Schlesinger M.J. (1990) Heat shock proteins. *J Biol Chem*, **265**: 12111-12114.
- Schnaper H.W., Kleinman H.K. e Grant D.S. (1993) Role of laminin in endothelial recognition and differentiation. *Kidney Int*, **43**: 20-25.
- Schwartz A.L. e Ciechanover A. (1999) The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Ann Rev Med*, **50**: 57-74.
- Schwartz S.M. e Benditt E.P. (1977) Aortic endothelial cell replication. I. Effects of age and hypertension in the rat. *Circ Res*, **41**: 248-255.
- Schwartz Z., Schlader D.L., Swain L.D. e Boyan B.D. (1988) Direct effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on growth zone and resting zone chondrocytes membranes alkaline phosphatase and phospholipase-A2 specific activity. *Endocrinol*, **123**: 2878-2884.
- Schwartz Z., Sylvia V.L., Liu Y., Dean D.D. e Boyan B.D. (1998) Treatment of resting zone chondrocytes with transforming growth factor- $\beta$ 1 induces differentiation into a phenotype characteristic of growth zone chondrocytes by downregulating responsiveness to 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and upregulating responsiveness to 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Bone*, **23**: 465-470.
- Schwartzman R.A. e Cidlowski J.A. (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, **14**: 133-151.
- Scott C.A., Gibbs H.A. e Thompson H. (1996) Osteochondrosis as a cause of lameness in a purebred Suffolk lambs. *Vet Rec*, **139**: 165-167.
- Scozzafava A., Mastrolorenzo A. e Supuran C.T. (2000) Arylsulfonyl-N,N-diethyl-dithiocarbamates: a novel class of antitumor agents. *Bioorg Med Chem Lett*, **10**: 1887-1891.
- Scully S.P., Lee J.W., Ghert P.M. e Qi W. (2001) The role of the extracellular matrix in articular chondrocyte regulation. *Clin Orthop*, **391 (Suppl)**: S72-S89.
- Sefton A.E e Siegel P.B. (1974) Inheritance of body weight in Japanese quail. *Poult Sci*, **53**: 1597-1603.
- Seinsheimer F. 3rd e Sledge C.B. (1981) Parameters of longitudinal growth rate in rabbit epiphyseal growth plates. *J Bone Joint Surg Am*, **63**: 627-630.



- Selecciones Avícolas (1998) Consideración sobre las ventajas de la cría con separación de sexos. *Cobb News*, **12**: 13.
- Sen C.K., Khanna S., Venojarvi M., Trikha P., Ellison E.C., Hunt T.K. e Roy S. (2002) Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **282**: H1821-H1827.
- Sentman C.L., Shutter J.R., Hockenbery D., Kanagawa O. e Korsmeyer S.J. (1991) Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*, **67**: 879-888.
- Shalev B.A. e Pasternak H. (1998) The relative energy requirement of male vs females broilers and turkeys. *Poult Sci*, **77**: 859-863.
- Shan W.S., Koch A., Murray J., Colman D.R. e Shapiro L. (1999) The adhesive binding site of cadherins revisited. *Biophys Chem*, **82**: 157-163.
- Shapiro I.M., Golub E.E., Chance B., Piddington C., Oshima O., Tuncay O.C., Frasca P., Haselgrove J.C. (1988) Linkage between energy status of perivascular cells and mineralization of the chick growth cartilage. *Dev Biol*, **129**: 372-379.
- Shapiro I.M., Leboy P.S., Tokuoka T., Forbes E., DeBolt K., Adams S.L e Pacifici M. (1991) Ascorbic acid regulates multiple metabolic activities of cartilage cells. *Am J Clin Nutr*, **54** (6 Suppl): 1209S-1213S.
- Shapiro I.M., Mansfield K.D., Evans S.M., Lord E.M. e Koch C.J. (1997) Chondrocytes in the endochondral growth cartilage are not hypoxic. *Am J Physiol*, **272** (Cell Physiol, **41**): C1134-C1143.
- Shapiro S.D. (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*, **10**: 602-608.
- Sheridan A.K. (1974) Genetic studies of tibial dyschondroplasia in the broiler chicken. *Proc Australian Poult Sci Convention, World's Poult Sci Assoc, Hobart, Tasmania, Australia*. pp: 86.
- Sheridan A.K., Howlett C.R. e Burton J.A. (1978) The inheritance of tibial dyschondroplasia in broilers. *Br Poult Sci*, **19**: 491-499.
- Sheridan A.K., Howlett C.R. e Dettman E.B. (1976) Selection for tibial dyschondroplasia in Australian meat chickens. *Proc First Australasian Poult Stok Feed Convention, Vol 2, Melbourne, Australia*. pp: 176-181.
- Shi Y., Glynn J.M., Guilbert L.J., Cotter T.G., Bissonnette R.P. e Green D.R. (1992) Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, **257**: 212-214.
- Shi Y.-B., Li Q., Damjanovski S., Amano T. e Ishizuya-Oka A. (1998) Regulation of apoptosis during development: input from the extracellular matrix (review). *Int J Mol Med*, **2**: 273-282.
- Shibata S., Suzuki S. e Yamashita Y. (1997) An ultrastructural study of cartilage resorption at the site of initial endochondral bone formation in the fetal mouse mandibular condyle. *J Anat*, **191**: 65-76.

- Shibata S. e Yamashita Y. (2001) An ultrastructural study of osteoclasts and chondroclasts in poorly calcified mandible induced by high doses of strontium diet to fetal mice. *Annals Anat*, **183**: 357-361.
- Shin C.S., Lecanda F., Sheikh S., Weitzmann L., Cheng S.-L. e Civitelli R. (2000) Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways. *J Cell Biochem*, **78**: 566-577.
- Shiotani A., Takami M., Itoh K., Shibasaki Y. e Sasaki T. (2002) Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin. *Anat Rec*, **268**: 137-146.
- Shum L. e Nuckolls G. (2002) The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res*, **4**: 94-106.
- Shweiki D., Itin A., Soffer D. e Keshet E. (1992) Vascular endothelial growth induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, **359**: 843-845.
- Siller W.J. (1970) Tibial dyschondroplasia in the fowl. *J Pathol*, **101**: 9-46.
- Simonneau L., Kitagawa M., Suzuki S. e Thiery J.P. (1995) Cadherin-11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins? *Cell Adhes Commun*, **3**: 115-130.
- Simper D., Stalboerger P.G., Panetta C.J., Wang S. e Caplice N.M. (2002) Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, **106**: 1199-1204.
- Sire J.Y., Huysseune A. e Meunier F.J. (1990) Osteoclast in teleost fish: light- and electron microscopical observations. *Cell Tissue Res*, **260**: 85-94.
- Sires U.I., Schmidt T.M., Fliszar C.J., Wang Z.Q., Gluck S.L. e Welgus H.G. (1995) Complete degradation of type X collagen requires the combined action of interstitial collagenase and osteoclast-derived cathepsin B. *J Clin Invest*, **95**: 2089-2095.
- Sissons H.A. (1953) Experimental determination of rate of longitudinal bone growth. *J Anat*, **87**: 228-237.
- Silvestrini G., Mocetti P., Ballanti P., Di Grezia R. e Bonucci E. (1998) In vivo incidence of apoptosis evaluated with the TdT FragEL™ DNA fragmentation detection kit in cartilage and bone of the rat tibia. *Tissue & Cell*, **30**: 627-633.
- Silvestrini G., Ricordi M.E. e Bonucci E. (1979) Resorption of uncalcified cartilage in the diaphysis of the chick embryo tibia. *Cell Tissue Res*, **196**: 221-235.
- Skaggs D.L., Bachrach N.M., Cohen B., Haven-Weiss L., Chorney G.S. e Mow V.C. (1993) Differential change in volume of chondrocytes through the depth of the bovine growth plate during compression: a confocal microscopy study. *Trans Orthop Res Soc*, **18**: 93.
- Slack J. (2001) *Essential Developmental Biology*. Blackwell Science. Oxford. 322 páginas.
- Smith G.N., Jr e Brandt K.B. (1992) Hypothesis: can type IX collagen "glue" together intersecting type II fibers in articular cartilage matrix? A proposed mechanism. *J Rheumatol*, **19**: 14-17.
- Smith-Mungo L.I. e Kagan H.M. (1998) Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*, **16**: 387-398.

- Smrzka O.W., Delgehyr N. e Bornens M. (2000) Tissue-specific expression and subcellular localisation of mammalian  $\delta$ -tubulin. *Curr Biol*, **10**: 413-416.
- Soderstrom M., Salminen H., Glumoff V., Kirschke H., Aro H. e Vuorio E. (1999) Cathepsin expression during skeletal development. *Bioch Biophys Acta*, **1446**: 35-46.
- Solursh M., Jensen K.L., Reiter R.S. e Linsenmayer T.F. (1984) Extracellular matrix mediates epithelial effects of chondrogenesis in vitro. *Dev Biol*, **105**: 451-457.
- Somes R.G. Jr. (1969) Genetic perosis in the domestic fowl. *J Hered*, **60**: 163-166.
- Sommarin Y., Larsson T. e Heinegard D. (1989) Chondrocyte matrix interactions. *Exp Cell Res*, **184**: 181-192.
- Sommer B., Bickel M., Hofstetter W. e Wetterwald A. (1996) Expression of matrix proteins during the development of mineralized tissues. *Bone*, **19**: 371-380.
- Sørensen P. (1992) The genetics of leg disorders. In Whitehead C.C. (ed) Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. *Poult Sci Symp*, **23**: 213-228.
- Sounni N.E., Janssen M., Foidart J.M. e Noel A. (2003) Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumour angiogenesis. *Matrix Biol*, **22**: 55-61.
- Souza A.P., Gerlach R.F. e Line S.R.P. (2000) Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dental Materials*, **16**: 103-108.
- Souza A.P., Gerlach R.F. e Line S.R.P. (2000) Inhibition of human gelatinases by metal released from dental amalgam. *Biomaterials*, **22**: 2025-2030.
- Spector J.A., Mehrara B.J., Greenwald J.A., Saadeh P.B., Steinbrech D.S., Bouletreau P.J., Smith L.P. e Longaker M.T. (2001) Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *Am J Physiol*, **280**: C72-C80.
- Sporn L.A., Chavin S.I., Marder V.J. e Wagner D.D. (1985) Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J Clin Invest*, **76**: 1102-1106.
- SPSS (2002) [www.spss.com](http://www.spss.com)
- Starck J.M. (1996) Comparative morphology and cytokinetics of skeletal growth in hatchlings of altricial and precocial birds. *Zool Anz*, **235**: 53-75.
- Steinbrech D.S., Mehrara B.J., Saadeh P.B., Chin G., Dudziak M.E., Gerrets R.P., Gittes G.K. e Longaker M.T. (1999) Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg*, **104**: 738-47.
- Stevenson S., Hunziker E.B., Herman W. e Schenk R.K. (1990) Is longitudinal bone growth influenced by diurnal variation in the mitotic activity of chondrocytes of the growth plate? *J Orthop Res*, **8**: 132-135.
- Stewart J., Evan G., Watson J. e Sikora K. (1986) Detection of the c-myc oncogene product in colonic pulps and carcinomas. *Br J Cancer*, **45**: 4416-4421.
- Strause L., Saltman P. e Glowacki J. (1987) The effect of deficiencies of manganese and copper on osteoinduction and on resorption of bone particles in rats. *Calcif Tissue Int*, **41**: 145-150.
- Street J., Bao M., deGuzman L., Bunting S., Peale F.V. Jr, Ferrara N., Steinmetz H., Hoeffel J., Cleland J.L., Daugherty A., van Bruggen N., Redmond H.P., Carano R.A. e Filvaroff E.H.

- (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 9656-9661.
- Suda T., Nakamura I., Jimi E. e Takahashi N. (1997) Regulation of osteoclast function. *J Bone Min Res*, **12**: 869-879.
- Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Jimi E., Gillespie M.T. e Martin T.J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumour necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, **20**: 345-357.
- Suda T., Udagawa N. e Takahashi N. (1996) Cells of bone: osteoclast generation. In Bilezikian J.P., Raisz L.G. e Rodan G.A. (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press. San Diego. pp: 87-102.
- Sugimoto M. e Miyata S. (2002) Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol*, **75**: 19-24.
- Sugimoto S., Kusuzaki K., Takeshita H., Kuzuhara A., Tsuji Y., Yamashita F., Hirasawa Y. e Ashihara T. (1991) The distribution of S-100 protein positive chondrocytes in the human articular cartilages under aging or diseased conditions [Abstract] *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, **65**: 902-908.
- Sullivan T.W. (1994) Skeletal problems in poultry: estimated annual cost and descriptions. *Poult Sci*, **73**: 879-882.
- Sullivan T.W. e Al-Ubaidi Y.Y. (1963) Linear growth and mineralization of bones in broad breasted bronze turkeys. *Poult Sci*, **42**: 46-49.
- Sussman I.I. e Rand J.H. (1982) Subendothelial deposition of von Willebrand's factor requires the presence of endothelial cells. *J Lab Clin Med*, **100**: 526-532.
- Sutton J.S. e Weiss L. (1966) Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. An electron microscope study. *J Cell Biol*, **28**: 303-332.
- Suzuki S.T. (2000) Recent progress in protocadherin research. *Exp Cell Res*, **261**: 13-18.
- Suzuki T., Kurokawa T. e Srivastava A.S. (2001) Induction of bent cartilaginous skeletons and undulating notochord in flounder embryos by disulfiram and a,a'-dipyridyl. *Zoological Sci*, **18**: 345-351.
- Suzuki T., Srivastava A.S. e Kurokawa T. (2000) Experimental induction of jaw, gill and pectoral fin malformations in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, larvae. *Aquaculture*, **185**: 175-187.
- Svoboda K.K. (1998) Chondrocyte-matrix attachment complexes mediate survival and differentiation. *Microsc Res Tech*, **43**: 111-122.
- Syrigos K.N., Harrington K.J. e Pignatelli M. (1999) Role of adhesion molecules in bladder cancer: an important part of the jigsaw. *Urology*, **53**: 428-434.
- Szuwart T., Kierdorf H., Kierdorf U. e Clemen G. (2002) Histochemical and ultrastructural studies of cartilage resorption and acid phosphatase activity during antler growth in fallow deer (*Dama dama*). *Anat Rec*, **268**: 66-72.

- Tajima Y., Kato K., Kashimata M., Hiramatsu M. e Utsumi N. (1994) Immunohistochemical analysis of EGF in epiphyseal growth plate from normal, hypophysectomized, and growth hormone-treated hypophysectomized rats. *Cell Tissue Res* **278**: 279-282.
- Tajima Y., Yokose S., Takenoya M., Kanda K. e Utsumi N. (1991) Immunocytochemical detection of S-100 protein in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol*, **36**: 875-879.
- Takagi M., Kamiya N., Urushizaki T., Tada Y. e Tanaka H. (2000) Gene expression and immunohistochemical localization of biglycan in association with mineralization in the matrix of epiphyseal cartilage. *Histochem J*, **32**: 175-186.
- Takahashi H., Hashimoto Y., Aoki N., Kinouchi M., Ishida-Yamamoto A. e Iizuka H. (2000) Copper, zinc-superoxide dismutase protects from ultraviolet B-induced apoptosis of SV40-transformed human keratinocytes: the protection is associated with the increased levels of antioxidant enzymes. *J Dermatol Sci*, **23**: 12-21.
- Takechi M. e Itakura C. (1995) Ultrastructural and histochemical studies of the epiphyseal plate in normal chicks. *Anat Rec*, **242**: 29-39.
- Takeichi M. (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, **7**: 619-627.
- Tamiolakis D., Kotini A., Lambropoulou M., Tolparidou I. e Papadopoulos N. (2002) Expression of alpha-smooth muscle actin in the stromal cells of bone marrow in fetuses in different stages of development, in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of unknown significance. *Clin Exp Obstet Gynecol*, **29**: 45-48.
- Tandon S.K., Singh S. e Prasad S. (1997) Chelation in metal intoxication LI: efficacy of amphipathic dithiocarbamates in mobilization of lead in the rat. *Exp Toxicol*, **16**: 557-562.
- Tanzer M.L., Chandrasekaran S., Dean J.W. 3rd e Giniger M.S. (1993) Role of laminin carbohydrates on cellular interactions. *Kidney Int*, **43**: 66-72.
- Tarkka T., Sipola A., Jamsa T., Soini Y., Yla-Herttuala S., Tuukkanen J. e Hautala T. (2003) Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *Gene Med*, **5**: 560-566.
- Tatsuyama K., Maezawa Y., Baba H., Imamura Y. e Fukuda M. (2000) Expression of various growth factors for cell proliferation and cytodifferentiation during fracture repair of bone. *Eur J Histochem*, **44**: 269-278.
- Tavella S., Raffo P., Tacchetti C., Cancedda R. e Castagnola P. (1994) N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res*, **215**: 354-362.
- Tepass U. (1999) Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Current Opinion Cell Biol*, **11**: 540-548.
- Tetlow L.C. e Woolley D.E. (1999) The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on matrix metalloproteinase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by cells of the rheumatoid lesion. *Arthritis Res*, **1**: 63-70
- Tezuka K., Tezuka Y., Maejima A., Sato T., Nemoto K., Kamioka H., Hakeda Y. e Kumegawa M. (1994) Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem*, **269**:1106-1109.

- Thompson E.B. (1998) The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol*, **60**: 575-600.
- Thorp B.H. (1988) Relationship between the rate of longitudinal bone growth and physeal thickness in the growing fowl. *Res Vet Sci*, **45**: 83-85.
- Thorp B.H. (1992) Abnormalities in the growth of leg bones. In Whitehead C.C. (ed) Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. *Poult Sci Symp*, **23**: 147-166.
- Thorp B., Dick L., Jefferies D., Houston B. e Wilson J. (1997) An assessment of the efficacy of the Lixiscope for the detection of tibial dyschondroplasia. *Avian Pathol*, **26**: 97-104.
- Thorp B., Farquharson C., Kwan A. e Loveridge N. (1993) Osteochondrosis/dyschondroplasia: a failure of chondrocyte differentiation. *Equine vet J (Suppl)*, **16**: 13-18.
- Thorp B.H., Whitehead C.C. e Rennie J.S. (1991) Avian tibial dyschondroplasia: a comparasion of the incidence and severity as assessed by gross examination and histopathology. *Res Vet Sci*, **51**: 48-54.
- Thyberg J. (1974) Electron microscopic studies on the initial phases of calcification in guinea pig epiphyseal cartilage. *J Ultrastruct Res*, **46**: 206-218.
- Tiku M.L., Gupta S. e Deshmukh D.R. (1999) Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Rad Res*, **30**: 395-405.
- Tilly J.L. e Hsueh A.J. (1993) Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Physiol*, **154**: 519-526.
- Timpl R. e Brown J.C. (1994) The laminins. *Matrix Biol*, **14**: 275-281.
- Topping R.J. e Jones M.M. (1988) Optimal dithiocarbamate structure for immunomodulator action. *Med Hypotheses*, **27**: 55-57.
- Toury R., Wang Y., Hauchecorne M. e Balmain (1999) c-Myc and Mxi1 immunoreactivities in the calcifying areas of the epiphyseal plate cartilage matrix of growing rats. *Bone*, **24**: 555-563.
- Trueta J. e Amato V.P. (1960) The vascular contribution to osteogenesis. III. Changes in the growth cartilage caused by experimentally induced ischaemia. *J Bone Joint Surg*, **42B**: 571-587.
- Tryon K.A. e Farrow C.S. (1999) Osteochondrosis in cattle. *Vet Clin North America: Food Ani Practice*, **15**: 265-274.
- Tselepis C., Hoyland J.A., Barber R.E., Thorp B.H. e Kwan A.P.L. (1996) Expression and distribution of cartilage matrix macromolecules in avian tibial dyschondroplasia. *Avian Pathol*, **25**: 305-324.
- Tselepis C., Kwan A.P., Thornton D. e Sheehan J. (2000) The biochemical characterization of aggrecan from normal and tibial-dyschondroplastic chicken growth-plate cartilage. *Biochem J*, **15**: 517-525.
- Tsonis P.A., Del Rio-Tsonis K., Millan J.L. e Wheelock M.J. (1994) Expression of N-cadherin and alkaline phosphatase in chick limb bud mesenchymal cells: regulation by 1,25dihydroxyvitamin D3 or TGF-beta 1. *Exp Cell Res*, **213**: 433-437.

- Tunuguntla R., Ripley D., Sang Q.X. e Chegini N. (2003) Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-3 and -4 in benign endometrium and endometrial cancer small star, filled. *Gynecol Oncol*, **89**: 453-459.
- Turner K.A. e Lilburn M.S. (1992) The effect of early protein restriction (zero to eight weeks) on skeletal development in turkey toms from two to eighteen weeks. *Poult Sci*, **71**: 1680-1686.
- Twal W.O., Wu J., Gay C.V. e Leach R.M. Jr. (1996) Immunolocalization of basic fibroblastic growth factor in avian tibial dyschondroplastic cartilage. *Poult Sci*, **75**: 130-134.
- Udagawa N., Takahashi N., Yasuda H., Mizuno A., Itoh K., Ueno Y., Shinki T., Gillespie M.T., Martin T.J., Higashio K. e Suda T. (2000) Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, **141**: 3478-3484.
- Uhlhorn H., Dalin G., Lundeheim N. e Ekman S. (1995) Osteochondrosis in Wild Boar - Swedish Yorkshire crossbred pigs (F2 generation). *Acta Vet Scand*, **36**: 41-53.
- Uusitalo H., Hiltunen A., Soderstrom M., Aro H.T. e Vuorio E. (2000) Expression of cathepsins B, H, K, L and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int*, **67**: 382-390.
- Vaananen H.K. (1993) Mechanism of bone turnover. *Ann Med*, **25**: 353-359.
- Vaananen H.K., Karhukorpi E.K., Sundquist K., Wallmark B., Roininen I., Hentunen T., Tuukkanen J. e Lakkakorpi P. (1990) Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol*, **111**: 1305-1311.
- Vaananen H.K., Zhao H., Mulari M. e Halleen J.M. (2000) The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*, **113**: 377-381.
- Vaiano S., Azuolas J., Parkinson G.B. e Scott P.C. (1994) Serum total calcium, phosphorus, 1,25-dihydroxycholecalciferol and endochondral ossification defects in commercial broiler chickens. *Poult Sci*, **73**: 1296-11305.
- Vale R.D. (1987) Intracellular transport using microtubule-based motors. *Ann Rev Cell Biol*, **3**: 347-378.
- Vanags D.M., Pomares M.I., Coppola S., Burgess D.H. e Orrenius S. (1996) Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem*, **271**: 31075-31085.
- van der Rest M. e Garrone R. (1991) Collagen family proteins. *FASEB J*, **5**: 2814-2823.
- van der Rest M. e Mayne R. (1988) Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J Biol Chem*, **263**: 1615-1618.
- Vanky P., Brockstedt U., Hjerpe A. e Wikstrom B. (1998) Kinetic studies on epiphyseal growth cartilage in the normal mouse. *Bone*, **22**: 331-339.
- van't Hof R.J., von Lindern M., Nijweide P.J. e Beug A.H. (1997) Stem cell factor stimulates chicken osteoclast activity in vitro. *FASEB J*, **11**: 287-293.

- Varet J., Vincent L., Mirshahi P., Pille J.V., Legrand E., Opolon P., Mishal Z., Soria J., Li H. e Soria C. (2003) Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci*, **60**: 810-819.
- Vargas M.I., Lamas J.M. e Alvarenga V. (1983) Tibial dyschondroplasia in growing in chickens experimentally intoxicated with tetramethylthiuram disulfide. *Poult Sci*, **62**: 1195-1200.
- Varughese K.I., Celikel R. e Ruggeri Z.M. (2002) Structure and function of the von Willebrand factor A1 domain. *Curr Protein Pept Sci*, **3**: 301-312.
- Vaughan-Thomas A., Young R.D., Phillips A.C. e Duance V.C. (2001) Characterization of type XI collagen-glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem*, **276**: 5303-5309.
- Velleman S.G. (2000) The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult Sci*, **79**: 985-989.
- Veltmann J.R. Jr. e Jensen L.S. (1981) Tibial dyschondroplasia in *broilers*: comparison of dietary additives and strains. *Poult Sci*, **60**: 1473-1478.
- Veltmann J.R. Jr e Linton S.S. (1986) Influence of dietary tetramethylthiuram disulfide (a fungicide) on growth and incidence of tibial dyschondroplasia in single comb White Leghorn chicks. *Poult Sci*, **65**: 1205-1207.
- Veltmann J.R. Jr, Rowland G.N. e Linton S.S. (1985) Tibial dyschondroplasia in single-comb White Leghorn chicks fed tetramethylthiuram disulfide (a fungicide). *Avian Dis*, **29**: 1269-1272.
- Verhaegen S. (1998) Microscopical study of cell death via apoptosis. *Eur Microsc Anal*, **51**: 31-33.
- Verhaegen S., McGowan A.J., Brophy A.R., Fernandes R.S. e Cotter T.G. (1995) Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. *Biochem Pharmacol*, **50**: 1021-1029.
- Vicario J.H., Piva J., Pierini A., Campos C., Canal A.M., Ortega H., Pfeiffer H., Gerardo L., Fendrich I. e Novero R. (2002) Médula ósea autóloga via seno coronário y angiogénesis en cerdos con injuria miocárdica. *Rev Fed Arg Cardiol*, **31**: 441-449.
- Vignery A. (2000) Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol*, **81**: 291-304.
- Vihinen P. e Kahari, V.-M. (1999) Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer*, **99**: 157-166.
- Visse R. e Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, **92**: 827-839.
- Vlemminckx K. e Kemler R. (1999) Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, **21**: 211-220.
- von der Mark K. (1999) Structure, Biosynthesis, and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone. In Seibel M.J., Robins S.P. e Bilezikian J.P. (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Academic Press, San Diego. pp: 3-29.



- Vortkamp A., Lee K., Lanske B., Segre G.V., Kronenberg H.M. e Tabin C.J. (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, **273**: 613-622.
- Vu T. e Werb Z. (2000) Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*, **14**: 2123-2133.
- Vu T.H., Shipley J.M., Bergers G., Berger J.E., Helms J.A., Hanahan D., Shapiro S.D., Senior R.M. e Werb Z. (1998) MMP-9/Gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, **93**: 411-422.
- Vukicevic S., Luyten F.P., Kleinman H.K. e Reddi A.H. (1990) Differentiation of canalicular cell processes in bone cells by basement membrane matrix components: regulation by discrete domains of laminin. *Cell*, **63**: 437-445.
- Waldroup P.K., Adams M.H. e Waldroup A.L. (1993) Effects of amino acid restriction during starter and grower periods on subsequent performance and incidence of leg disorders in male large white turkeys. *Poult Sci*, **72**: 816-828.
- Walker K.V.R. e Kember N.F. (1971a) Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. I. Measurements in young male rats. *Cell Tissue Kinet*, **5**: 401-408.
- Walker K.V.R. e Kember N.F. (1971b) Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. II. Measurements during ageing. *Cell Tissue Kinet*, **5**: 409-419.
- Walter H., Kawashima A., Nebelung W., Neumann W. e Roessner A. (1998) Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation. *Pathol Res Pract*, **194**: 73-81.
- Wang L., Almqvist F., Veys E.M. e Verbruggen G. (2002a) Control of extracellular matrix homeostasis of normal cartilage by a TGF- $\beta$  autocrine pathway. Validation of flow cytometry as a tool to study chondrocyte metabolism in vitro. *Osteoarthritis Cart*, **10**: 188-198.
- Wang L., Wang J., Almqvist K.F., Veys E.M. e Verbruggen G. (2002b) Influence of polysulphated polysaccharides and hydrocortisone on the extracellular matrix metabolism of human articular chondrocytes in vitro. *Clin Exp Rheumatol*, **20**: 669-676.
- Wang W., Ferguson D.J., Quinn J.M., Simpson A.H. e Athanasou N.A. (1997) Osteoclasts are capable of particle phagocytosis and bone resorption. *J Pathol*, **182**: 92-98.
- Wang Y., Tourny R., Hauchecorne M. e Balmain N. (1997a) Expression of Bcl-2 protein in the epiphyseal plate cartilage and trabecular bone of growing rats. *Histochem Cell Biol*, **108**: 45-55.
- Wang Y., Tourny R., Hauchecorne M. e Balmain N. (1997b) Expression and subcellular localization of the Myc superfamily proteins: c-myc, Max, Mad1 and Mxi1 in the epiphyseal plate cartilage chondrocytes of growing rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **43**: 175-188.
- Ward R.V., Hembry R.M., Reynolds J.J. e Murphy G. (1991) The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the

- biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Biochem J*, **278**: 179-187.
- Wardale R.J. e Duance V.C. (1996) Collagen expression in chicken tibial dyschondroplasia. *J Cell Sci*, **109**: 1119-1131.
- Wasler M.M., Allen N.K., Mirocha C.J., Hanlon G. e Newman J.A. (1982) *Fusarium*-induced osteochondrosis (tibial dyschondroplasia) in chickens. *Vet Pathol*, **19**: 544-550.
- Watanabe H., Wada H., Itoh M., Kataoka M., Kido H. e Naruse T. (2002) Effect of heparinoid on the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Pharm Pharmacol*, **54**: 699-705.
- Watkins B.A. (1998) Regulatory effects of polyunsaturates on bone modeling and cartilage function. In Simopoulos A.P. (ed) The return of  $\omega$ 3 fatty acids into the food supply. I: Land-based animal food products and their health effects. *World Rev Nutr Diet*, **83**: 38-51.
- Watkins B.A., Whitehead C.C. e Duff S.R.I. (1991) Hydrogenated oil decreases tissue concentrations of n-6 polyunsaturated fatty acids and may contribute to dyschondroplasia in broilers. *Br Poult Sci Symp*, **32**: 1109-1119.
- Wedig J., Cowan A. e Hartung R. (1968) Some of the effects of tetramethyl thiuram disulfide (TMTD) on reproduction of the bobwhite quail. *Toxicol Appl Pharmacol*, **12**: 293-297.
- Weir E.C., Philbrick W.M., Amling M., Neff L.A., Baron R. e Broadus A.E. (1996) Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 10240-10245.
- Weiss A.P. e Dorfman H.D. (1986) S-100 protein in human cartilage lesions. *J Bone Joint Surg Am*, **68**: 521-526.
- Weiss C. (1973) Ultrastructural characteristics of osteoarthritis. *Fed Proc*, **32**: 1459-1466.
- Weng L.L., Li L.Z., Zhang Y.L., Lou R.L. e Zheng H. (2002) C-mycprotein expression upregulated by 2-(3-estrone-N-ethyl piperazine-methyl) tetracycline in bone. *Yao Xue Xue Bao*, **37**: 771-774.
- Westermarck J. e Kahari V.-M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumour invasion *FASEB J*, **13**: 781-792.
- Whitehead C.C. (1997) Dyschondroplasia in poultry. *Proc Nutr Soc*, **56**: 957-966.
- Whitehead C.C. (1992) Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry. *Poult Sci Symp*, **23**.
- Whittaker M. e Ayscough A. (2003) Matrix metalloproteinases and their inhibitors: current status and future challenges. *Celltransmissions*, **17**: 3-11 e 14.
- Wick W., Platten M. e Weller M. (2001) Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF $\beta$ . *J Neuro-Oncology*, **53**: 177-185.
- Wilkinson K.D. (1999) Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J Nutr*, **129**: 1933-1936.
- Will H., Atkinson S.J., Butler G.S., Smith B. e Murphy G. (1996) The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and

- initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem*, **271**: 17119-17123.
- Williams B., Waddington D., Solomon S. e Farquharson C. (2000) Dietary effects on bone quality and turnover, and Ca and P metabolism in chickens. *Res Vet Sci*, **69**: 81-87.
- Williams G.R., Robson H. e Shalet S.M. (1998) Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J Endocrinol*, **157**: 391-403.
- Wilsman N.J., Farnum C.E., Green E.M., Lieferman E.M. e Clayton M.K. (1996) Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *J Orthop Res*, **14**: 562-572.
- Wilson C.L., Heppner K.J., Labosky P.A., Hogan B.L. e Matrisian L.M. (1997) Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 1402-1407.
- Wise D.R. (1970) Comparison of the skeletal systems of growing broiler and laying strain chickens. *Br Poult Sci*, **11**: 333-339.
- Wise D.R. e Jennings A.R. (1972) Dyschondroplasia in domestic poultry. *Vet Rec*, **91**: 285-286.
- Wise D.R. e Nott H. (1975) Studies on tibial dyschondroplasia in ducks. *Res Vet Sci*, **18**: 193-197.
- Witten P.E. (1997) Enzyme histochemical characteristics of osteoblasts and mononucleated osteoclasts in a teleost fish with acellular bone (*Oreochromis niloticus*, Cichlidae). *Cell Tissue Res*, **287**: 591-599.
- Woessner J.F., Jr. (2002) MMPs and TIMPs: An Historical Perspective. *Mol Biotechnol*, **22**: 33-49.
- Wojcik C. (1999) Proteasomes in apoptosis: villains or guardians? *Cell Mol Life Sci*, **56**: 908-917.
- Wojcik C. (2002) Regulation of apoptosis by the ubiquitin and proteasome pathway. *J Cell Mol Med*, **6**: 25-48.
- Wojtowicz-Praga S. (1999) Clinical potential of matrix metalloprotease inhibitors. *Drugs R&D*, **1**: 117-129.
- Wolff D.A., Stevenson S. e Goldberg V.M. (1992) S-100 protein immunostaining identifies cells expressing a chondrocytic phenotype during articular cartilage repair. *J Orthop Res*, **10**: 49-57.
- Wong M.K. e Gottlieb A.I. (1990) Endothelial monolayer integrity: perturbation of F-actin filaments and the dense peripheral band-vinculin network. *Arteriosclerosis*, **10**: 76-84.
- Wong-Valle J., McDaniel G.R., Kuhlert D.L. e Bartles J.E. (1993) Divergent selection for incidence of tibial dyschondroplasia in broilers at seven weeks of age. *Poult Sci*, **72**: 421-428.
- Woodbury M.R., Feist M.S., Clark E.G. e Haigh J.C. (1999) Osteochondrosis and epiphyseal bone abnormalities associated with copper deficiency in bison calves. *Can Vet J*, **40**: 878-880.

- Woodward W.A. e Tuan R.S. (1999) N-Cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: stimulation by poly-L-lysine. *Dev Genet*, **24**: 178-187.
- Wu C.W., Mwale F., Tchetina E., Kojima T., Yasuda T. e Poole A.R. (2001) Cartilage matrix resorption in skeletogenesis. *Novartis Found Symp*, **232**: 158-166; discussão: 166-170.
- Wu C.W., Tchetina E.V., Mwale F., Hasty K., Pidoux I., Reiner A., Chen J, Van W. e Poole A.R. (2002) Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J Bone Miner Res*, **17**: 639-651.
- Wu J., Pines M., Gay C.V., Hurwitz S. e Leach R.M. Jr. (1996) Immunolocalization of osteonectin in avian tibial dyschondroplastic cartilage. *Dev Dyn*, **207**: 69-74.
- Wu W., Cook M.E., Chu Q. e Smalley E.B. (1990) Prevention of thiram-induced dyschondroplasia by copper. *Nutr Res*, **10**: 555-566.
- Wu W., Cook M.E., Chu Q. e Smalley E.B. (1993) Tibial dyschondroplasia of chickens induced by Fusarochromanone, a mycotoxin. *Avian Dis*, **37**: 302-309.
- Wu W., Cook M.E. e Smalley E.B. (1991) Decreased immune response and increased incidence of tibial dyschondroplasia caused by Fusaria grown on sterile corn. *Poult Sci*, **70**: 293-301.
- Wu W., Cook M.E. e Smalley E.B. (1988) Partial prevention of fusarochromanone-induced dyschondroplasia in the broiler chicks. *Poult Sci*, (Suppl 1) **67**: 193 (abs).
- Wuthier R.E. (1982) A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on the role of cells, mitochondria, and matrix vesicles. *Clin Orthop*, **169**: 219-242.
- Yalçın S., Akbas Y., Settar P. e Gonul T. (1996) Effect of tibial dyschondroplasia on carcass part weights and bone characteristics. *Br Poult Sci*, **37**: 923-927.
- Yalçın S., Ozkan S., Coskuner E., Bilgen G., Delen Y., Kurtulmus Y. e Tanyalcin T. (2001) Effects of strain, maternal age and sex on morphological characteristics and composition of tibial bone in broilers. *Br Poult Sci*, **42**: 184-190.
- Yamagiwa H., Tokunaga K., Hayami T., Hatano H., Uchida M., Endo N. e Takahashi H.E. (1999) Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone*, **25**: 197-203.
- Yamaza T., Goto T., Kamiya T., Kobayashi Y., Sakai H. e Tanaka T. (1998) Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur. *Bone*, **23**: 499-509.
- Yang M. e Kurkinen M. (1999) Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts. CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. *J Biol Chem*, **273**: 17893-17900.
- Yang Y. e Yu X. (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J*, **17**: 790-799.

- Yap A.S., Niessen C.M. e Gumbiner B.M. (1998) The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strenghtening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol*, **141**: 779-789.
- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S.-I., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N. e Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 3597-3602.
- Yew P.R. (2002) Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators. *J Cell Physiol*, **187**: 1-10.
- Yin X.M., Oltvai Z.N., Veisnovack D.J., Linette G.P. e Korsmeyer S.J. (1994) Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **1994**: 59387-59393.
- Yonemura Y., Endou Y., Kimura K., Fushida S., Bandou E., Taniguchi K., Kinoshita K., Ninomiya I., Sugiyama K., Heizmann C.W., Schafer B.W. e Sasaki T. (2000) Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Cancer Res*, **6**: 4234-4242.
- Yong V.W., Power C., Forsyth P. e Edwards D.R. (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Rev Neurosci*, **2**: 502-511.
- Yoshida A., Yoshida S., Ishibashi T., Kuwano M. e Inomata H. (1999) Suppression of retinal neovascularization by the NF-kappaB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**: 1624-1629.
- Yoshimine Y., Tsukuba T., Isobe R., Sumi M., Akamine A., Maeda K. e Yamamoto K. (1995) Specific immunocytochemical localization of cathepsin E at the ruffled border membrane of active osteoclasts. *Cell Tissue Res*, **281**: 85-91.
- Yoshioka M., Kubo T., Coutts R.D. e Hirasawa Y. (1998) Differences in the repair process of longitudinal and transverse injuries of cartilage in the rat knee. *Osteoarthritis Cartilage*, **6**: 66-75.
- Yu C.C. e Filipe M.I. (1993) Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *Histochem J*, **25**: 843-853.
- Yu M., Sato H., Seiki M., Spiegel S. e Thompson E.W. (1997) Calcium influx inhibits MT1-MMP processing and blocks MMP-2 activation. *FEBS Letters*, **412**: 568-472.
- Yui S., Nakatani Y. e Mikami M. (2003) Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull*, **26**: 753-760.
- Zachary I. e Gliki G. (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*, **49**: 568-581.

- Zelzer E., McLean W., Ng Y.S., Fukai N., Reginato A.M., Lovejoy S., D'Amore P.A. e Olsen B.R. (2002) Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*, **129**: 1893-1904.
- Zenmyo M., Komiya S., Kawabata R., Sasaguri Y., Inoue A. e Morimatsu M. (1996) Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. *J Pathol*, **180**: 430-433.
- Zhang X., Huang H., McDaniel G.R. e Giambone J.J. (1997) Comparison of several enzymes between normal physeal and tibial dyschondroplastic cartilage of broiler chickens. *Avian Dis*, **41**: 330-334.
- Zhang X., McDaniel G.R., Roland D.A. e Kuhlert D.L. (1999) Responses to ten generations of divergent selection for tibial dyschondroplasia in broiler chickens: growth, egg production, and hatchability. *Poult Sci*, **77**: 1065-1072.
- Zhao A., Wu Z.Q., Pollack M., Rollwagen F.M., Hirszel P. e Zhou X. (2000) Disulfiram inhibits TNF-alpha-induced cell death. *Cytokine*, **12**: 1356-1367.
- Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O.T. e Døskeland S.O. (1998) Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature*, **391**: 449-450.
- Zhou Z., Apte S.S., Soininen R., Cao R., Baaklini G.Y., Rauser R.W., Wang J., Cao Y. e Tryggvason K. (2000) Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1. *Proc Natl Acad Sci*, **97**: 4052-4057.
- Ziche M., Jones J. e Gullino P.M. (1982) Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, **69**: 475-482.
- Zimmer D.B., Cornwall E.H., Landar A. e Song W. (1995) The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*, **37**: 417-429.
- Zimmer D.B., Sadosky P.W., e Weber D.J. (2003) Molecular mechanisms of S100-target protein interactions. *Microsc Res Tech*, **60**: 552-559.
- Zymed Laboratories Inc.(2002) <http://www.zymed.com>