



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*

ÉVORA

2003

## 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 metafise. 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 g  $\pm$  34,3) e do grupo experimental (409,6 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 tíbia 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.