

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Pós-Graduação em Ciência Animal**

**FENÓTIPO E ATIVIDADE DE SÍNTESE DE CONDRÓCITOS ARTICULARES DE
RATOS NEONATOS EM CULTURA BI OU TRIDIMENSIONAL COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL**

Natalia Viana Tamiasso

**Belo Horizonte
2020**

Natalia Viana Tamiasso

**Fenótipo e atividade de síntese de condrócitos articulares de ratos neonatos em cultura
bi ou tridimensional com diferentes concentrações de etanol**

Defesa de tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência
Animal.

Área: Patologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Coorientadoras: Profa. Dra. Natália de Melo Ocarino e
Dra. Carla Maria Osório Silva

Belo Horizonte

2020

T158f Tamiasso, Natalia Viana.1991-
Fenótipo e atividade de síntese de condrócitos articulares de ratos neonatos em cultura bi ou tridimensional com diferentes concentrações de etanol/ Natalia Viana Tamiasso. 2020. 93f:il.

Orientadora: Rogéria Serakides
Coorientadoras: Natália de Melo Ocarino
Carla Maria Osório Silva

Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
Área de concentração: Patologia Animal
Inclui bibliografia f. 72- 80.

1- Ratos - Teses - 2 - Células - Teses - 3 - Patologia animal - Teses - I - Serakides, Rogéria - II – Ocarino, Natália de Melo – III – Silva, Carla Maria Osório - IV– Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO - NATÁLIA VIANA TAMIASSO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Patologia Animal.

Aprovada em 25 de setembro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Rogéria Serakides
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Amanda Maria Sena Reis

Dr.(a). Natália de Melo Ocarino

Dr.(a). Jankerle Neves Boeloni

Dr.(a). Louisiane de Carvalho Nunes

Dr.(a). Bruno Machado Bertassoli



Documento assinado eletronicamente por Rogéria Serakides, Presidente de comissão, em 25/09/2020, às 17:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Natália de Melo Ocarino, Professora do Magistério Superior, em 25/09/2020, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Amanda Maria Sena Reis, Professora do Magistério Superior, em 25/09/2020, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Jankerle Neves Boeloni, Usuário Externo, em 26/09/2020, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Louisiane de Carvalho Nunes, Usuário Externo, em 26/09/2020, às 19:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Bruno Machado Bertassoli, Usuário Externo, em 28/09/2020, às 10:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=301107&infra_sistema=... 1/2

03/10/2020

SEI/UFMG - 0270331 - Folha de Aprovação



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0270331 e o código CRC 7F645A59.



Dedicado à Fabricio Viana Tamiasso.

(Perto do fim você disse que queria
ao menos “me ver virar doutora”.

Foi disso que tirei forças para
chegar até aqui.)

Obrigada por tudo, irmão.

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer a muitas pessoas, tanto aquelas que me ajudaram durante a execução do curso propriamente dito quanto aquelas que me deram suporte para que eu chegasse até aqui, e a ordem na qual elas serão mencionadas não diz respeito a importância. Graças à contribuição de todos que fui capaz de reunir forças para continuar caminhando. Assim sendo, vou iniciar agradecendo minha orientadora Rogéria Serakides pelo apoio incondicional desde meu primeiro contato quando ainda era candidata à vaga de doutoranda. Serei eternamente grata por ter me recebido de braços abertos como orientada de doutorado, por ter me proporcionado um ano de muito aprendizado presencial na UFMG, pela compreensão quando a oportunidade de trabalho surgiu, pela empatia diante das minhas dificuldades e por ter me dado à mão durante a conclusão desse trabalho. Os ensinamentos durante esse período foram além daqueles relacionados ao aspecto puramente profissional e minha admiração pela pessoa que a professora é só cresceu. Obrigada por tudo!

Agradeço aos meus pais, Maria Luzia Viana Tamiasso e Eugenio Tamiasso, simplesmente por eles serem quem eles são. Agradeço por terem me dado a chance de estudar e mesmo diante das dificuldades sempre me estimularem a continuar. Agradeço por não terem me deixado desistir quando achei que não aguentava mais e por serem pessoas tão corretas em conduta. Meu amor por vocês é infinito e tenho muito orgulho de ter vocês como pais.

Agradeço ao meu irmão, Fabricio Viana Tamiasso, por ter sido meu espelho durante tantos anos. Aprendi com ele a gostar de animais, plantas e da natureza de forma geral; trilhei meu próprio caminho tendo meu irmão mais velho como referência. Sempre fomos muito diferentes e ao mesmo tempo muito parecidos em tudo. Não conheço nenhuma pessoa que tenha tido mais força para seguir em frente do que ele, é meu maior exemplo de como devemos encarar os problemas da vida: com coragem e força para fazer o que é necessário, sem perder a esperança em dias melhores. Obrigada por ter me estimulado a continuar estudando e por nunca ter deixado de acreditar nos meus sonhos. Eu te amo.

Agradeço à professora Carla Maria Osório Silva pela excelência com a qual me ensinou tudo que era necessário para o cultivo celular quando cheguei ao Núcleo de Células Tronco. Agradeço imensamente por ter sido essa fonte de luz durante meu doutorado, revelando os caminhos que eu precisava seguir para executar as tarefas que precisavam ser executadas. Quando comecei o doutorado era tudo novo para mim: a cidade, a Universidade, o grupo de trabalho, o tipo de laboratório. Precisei aprender tudo do zero e essa tarefa foi

muito mais fácil porque tive a ajuda da Carla, com seu jeito tão gentil e agradável de conviver. Muito obrigada por ter compartilhado o que sabia comigo, muito obrigada pelas inúmeras caronas e muito obrigada por ter aceitado a minha coorientação.

Agradeço à professora Amanda Maria Sena Reis por ter abraçado meu experimento junto comigo, me ensinando a executar diversas etapas. Tanta coisa aconteceu ao mesmo tempo, era tanta coisa para lidar, que sem essa ajuda eu não teria conseguido. Obrigada por ter sido professora, amiga e psicóloga. Esse suporte foi essencial para que eu chegasse até aqui, quando eu estava no limite as palavras que vieram da Amanda foram cruciais para que eu continuasse em frente. Muito obrigada!

Agradeço à professora Natália de Melo Ocarino pelos ensinamentos presenciais na UFMG, pela disponibilidade para ajudar sempre que eu a procurava e por ter caminhado junto comigo como minha coorientadora de doutorado. Admiro a tranquilidade que a professora tem quando algo sai do planejado, sendo capaz de pensar racionalmente na melhor solução mesmo sob estresse e urgência; terei essa conduta como exemplo de profissionalismo.

Agradeço aos professores Juneo Freitas Silva, Jankerle Neves Boeloni e Lorena Gabriela Rocha Ribeiro pelo suporte ao disponibilizar dados sobre padronização de procedimentos, pelos roteiros que serviram de base para a execução da minha pesquisa e pelos ensinamentos presenciais ou à distância. Agradeço também ao Doutor Diego Carlos Reis por se mostrar tão solícito a me auxiliar com a execução de protocolos.

Agradeço aos professores Athelson Stefanon Bittencourt e Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt, e ao colega de trabalho Yuri Favalessa Monteiro, pela parceria para execução de etapas do meu doutorado na UFES. Obrigada pela colaboração, pelo acesso às salas e aos equipamentos, e pela receptividade que tiveram comigo. Muito obrigada!

Agradeço aos meus colegas de trabalho, Jarbas dos Santos e Maria do Carmo Soares Sales, pela compreensão sem limites e apoio incondicional desde o meu primeiro dia de trabalho na UFES. Eles me mostraram como o Setor de Anatomia funciona e ajudaram para que minha transição de cidade fosse mais tranquila, e assim facilitaram muito a conciliação do trabalho com o doutorado. Jarbas e Maria do Carmo são para mim exemplos de conduta no ambiente de trabalho. Obrigada pelo suporte sem julgamentos nos dias que precisei.

Agradeço à minha colega de setor e atual chefe de Departamento, professora Juliana Hott de Fucio Lizardo, pelo suporte excepcional e humanidade ao lidar com seus subordinados. Os dois últimos anos da minha vida foram muito difíceis porque precisei lidar ao mesmo tempo com questões pessoais, profissionais e psicológicas; e aprendi nesse período

que somos seres muito dependentes uns dos outros. Passei a maior parte da vida acreditando que podemos resolver quase tudo sozinhos, e isso mudou completamente ao perceber que a atitude dos outros é capaz de melhorar muito a vida daqueles que estão ao redor. Uma das lições que levarei com a experiência da chefia da Juliana, em conjunto com a participação de outras pessoas, é que podemos fazer a vida do outro ser menos difícil se estivermos dispostos a ajudar. Muito obrigada pela compreensão.

Agradeço às técnicas do laboratório de histologia da Escola de Veterinária da UFMG, em especial Natalia Rosa da Silva e Valéria Felisberto Tavares, pelo auxílio na confecção das lâminas das minhas amostras. Elas foram mais um exemplo de que somos muito mais fortes se não caminhamos sozinhos. Meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço aos colegas do Núcleo de Células Tronco pela parceria quando eu frequentava diariamente o laboratório e também à distância depois. Compartilhamos risadas, tarefas, preocupações, estudos e rotina; cada um com seu jeito, cada um com algo diferente a acrescentar. Agradeço a todos que marcaram laboratórios e equipamentos em meu nome para que estivesse tudo reservado para o dia que eu fosse a Belo Horizonte. Obrigada a todos que passaram pelo NCT de 2017 a 2020, em especial aos que ficaram mais próximos: Fabiana, Fabrício, Camila, Débora, Lorena, Gabriela, Kênia e Bruno.

Agradeço ao Núcleo de Células Tronco da Escola de Veterinária da UFMG por toda a estrutura fornecida ao longo dos últimos anos, tanto em relação ao espaço físico dos laboratórios quanto à disponibilização dos materiais.

Agradeço às agências de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq por viabilizarem a realização deste trabalho e atuarem como incentivadoras da pesquisa científica no Brasil.

Agradeço à minha professora e ex-orientadora Louisiane de Carvalho Nunes pelo apoio para que eu me candidatasse ao curso de doutorado e pelas palavras de incentivo para que eu continuasse a seguir no caminho certo.

Agradeço aos amigos que me acolheram em Belo Horizonte assim que mudei e fizeram meus dias na cidade memoráveis: Talita, Breno, Daniela e Felipe. Obrigada pelo ano maravilhoso que foi 2017, no qual as preocupações pareciam distantes e o otimismo estava no máximo. Obrigada pela hospitalidade e pela amizade.

Agradeço aos colegas do Biotério Central da UFES, Rodolpho José da Silva Barros e José dos Santos Amaral, pelas orientações e pelo auxílio na execução do meu doutorado na UFES. Mais uma vez só tenho a agradecer pela receptividade e boa vontade com a qual fui tratada.

Agradeço aos colegas do Laboratório Multiusuário de Histotécnicas da UFES pelo auxílio durante o uso do laboratório. Agradeço ainda aos colegas Flávio Cunha Monteiro e Tadeu Ériton Caliman Zanardo pela disponibilidade e pela flexibilidade ao me atender durante o uso do freezer para armazenamento de amostras.

Agradeço aos colegas de trabalho, professor Eduardo Henrique Beber e professor Josemberg da Silva Baptista, pela solicitude ao ajudar em tudo o que era necessário para execução da minha pesquisa.

Agradeço à minha amiga Juliana Guadalupe Belmondes por ter aguentado a convivência durante um período tão difícil da minha vida. É fácil estar perto de alguém quando tudo está bem, mas não é todo mundo que é capaz de permanecer próximo quando os problemas aparecem. Obrigada por não ter se afastado, por ter me escutado, por não ter me julgado e por ter sido um elemento essencial no cuidado das minhas gatas durante a perda do meu irmão. Sua passagem por Vitória foi encerrada repentinamente, mas teria sido tudo mais complicado para mim se não fosse sua ajuda enquanto foi possível.

Agradeço à minha tia e madrinha Regina Marta Tamiasso pela hospitalidade durante minha fase de mudança para Vitória. Obrigada por me receber, hospedar, ajudar a encontrar um lar e contribuir com a montagem do meu apartamento. Muitas dificuldades estavam por vir depois disso e estar perto durante sua luta é um consolo para meu coração. Vai dar tudo certo!

Agradeço aos colegas da escalada que mesmo sem saber me ajudaram a manter a sanidade durante um período de muitas turbulências. A escalada foi minha válvula de escape e nada disso teria acontecido se eu não tivesse sido acolhida por tanta gente disposta a me levar pra rocha. Deixo meu agradecimento a todos que abriram as portas para mim, em especial Caio (por ter sido quem me mostrou o caminho inicial), Alexandra (por ter me colocado junto quando eu não conhecia ninguém), Henrique (pelas caronas de sempre e parceria nas esportivas), Joyce e Thadeu (por toda a boa vontade de me ensinar e levar junto para a rocha), Riva (pelo acolhimento e convites que quase nunca eu conseguia aceitar por motivos de força maior) e Sandro (por me mostrar o caminho das tradicionais e não ter desistido de mim mesmo com os traumas que eu causei ao me aventurar nesse estilo). Devo parte da minha lucidez e força para continuar seguindo em frente a vocês. Obrigada.

*“O objetivo é absolutamente secundário:
o que importa é a vida que se leva até chegar ao objetivo.
Decida como você quer viver e depois veja o que pode fazer
para viver da forma que escolheu.”*

Hunter S. Thompson

“Às vezes ouço passar o vento; e só de ouvir o vento passar, vale a pena ter nascido.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes concentrações de etanol sobre o fenótipo e atividade de síntese de condrócitos articulares de ratos neonatos em cultura bidimensional e tridimensional. Os condrócitos foram cultivados em meio condrogênico com diferentes concentrações de etanol: 0,0%v/v (controle); 0,05%v/v (8,6mM); 0,25%v/v (42,9 mM), e 0,5%v/v (85,7 mM). Após 7, 14 e 21 dias, os condrócitos sob cultura bidimensional foram submetidos aos testes do MTT e da atividade de fosfatase alcalina (FA). Após 21 dias de cultivo, os *pellets* de condrócitos, sob cultura tridimensional, foram processados pela técnica de inclusão em parafina e secções histológicas foram coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliação do diâmetro médio dos condrócitos e da porcentagem de células, núcleo, citoplasma e de matriz bem diferenciada. Foi também avaliada a porcentagem de áreas PAS+. Aos 21 dias, foi também avaliada a expressão dos transcritos gênicos para agrecan, Sox9 e colágeno II, pela técnica de RT-qPCR. Não houve diferença significativa entre grupos pelo ensaio do MTT. Mas, condrócitos cultivados com 0,25%v/v ou 0,5%v/v de etanol apresentaram redução significativa da atividade da FA aos 21 dias de cultivo. A coloração de PAS revelou que os *pellets* de condrócitos tratados com 0,5% v/v de etanol apresentaram maior porcentagem de citoplasma e de núcleo de condrócitos, mas com redução das áreas de matriz PAS+. Mas, neste grupo o tamanho dos condrócitos foi semelhante aos demais grupos. A expressão de agrecan no grupo tratado com 0,5% v/v de etanol foi significativamente menor em comparação ao controle. Nos grupos tratados com 0,25%v/v e 0,5%v/v de etanol, além da atividade da fosfatase alcalina, a porcentagem de cartilagem madura também foi significativamente menor em comparação ao controle. O grupo tratado com 0,05%v/v de etanol foi semelhante ao controle em todos os parâmetros avaliados. Conclui-se que o etanol atua diretamente sobre os condrócitos articulares de neonatos, alterando o fenótipo do condrócito e a sua atividade de síntese de matriz extracelular, com redução da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de matriz diferenciada e de matriz PAS+ e da expressão do transcrito gênico para agrecan, sendo estes efeitos dose-dependentes.

Palavras chave: álcool, cartilagem, neonato, rato

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of different concentrations of ethanol on phenotype and activity of articular chondrocyte synthesis of neonatal rats in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) culture. Chondrocytes were cultured in chondrogenic medium with different concentrations of ethanol: 0.0%v/v (control); 0.05%v/v (8.6mM); 0.25%v/v (42.9 mM), and 0.5%v/v (85.7 mM). Chondrocytes under 2D culture were subjected to MTT assay and alkaline phosphatase activity while chondrocytes under 3D culture were processed for paraffin inclusion and stained by periodic acid Schiff (PAS) to evaluate mean chondrocyte diameter and percentages of cells, nucleus, cytoplasm, well-differentiated matrix, and PAS+ areas. The expression of gene transcripts for aggrecan, *Sox9* and type II collagen was evaluated by RT-qPCR. There was no difference between groups by the MTT assay. However, chondrocytes cultured with 0.25%v/v and 0.5%v/v ethanol showed a significant reduction in alkaline phosphatase activity at 21 days of culture. PAS staining revealed that chondrocytes treated with 0.5%v/v ethanol had higher percentages of cytoplasm and nuclear areas, but with a reduction in PAS+ matrix area. The mean diameter of chondrocytes was similar between groups. The expression of aggrecan in the group treated with 0.5%v/v ethanol was lower in comparison to that in the control. In the groups treated with 0.25%v/v and 0.5%v/v ethanol, the alkaline phosphatase activity and percentage of differentiated cartilage was lower in comparison to that in the control. The group treated with 0.05%v/v ethanol was similar to the control in all parameters. Concluded that ethanol acted directly on articular chondrocytes of newborn rats, altering the chondrocyte phenotype and its synthesis activity, and these effects were dose-dependent.

Key words: alcohol, cartilage, newborn, rat

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

- Figura 1. Representação de embrião humano com cinco semanas de desenvolvimento evidenciando o início da formação dos membros. Adaptado de Grigoriou *et al.* (2017) 22
- Figura 2. Fatores ativadores e inibitórios do Sox9. As setas azuis representam fatores que aumentam a ação de Sox9, enquanto o traçado em vermelho indica fator inibitório para Sox9. As setas pretas indicam fatores estimulados por Sox9. TGF- β : fator de crescimento transformador beta. HIF1 α : fator induzido por hipóxia 1 alfa. FGF: fator de crescimento fibroblástico. Col2: colágeno II. WNT: via de sinalização WNT. Adaptado de Kozhemyakina *et al.* (2015) 24
- Figura 3. Etapas da ossificação endocondral de osso longo de camundongo. A) Início da formação das condensações mesenquimais no broto do membro no dia 11,5 embrionário (E11.5). B) As células precursoras se diferenciam em condrócitos e formam o molde cartilaginoso no dia 13,5 embrionário (E13.5). C) A formação do centro de ossificação primário na diáfise do osso ocorre no dia 15,5 embrionário (E15.5). D) A formação do centro de ossificação secundário na epífise só ocorre após o nascimento, no sétimo dia de vida pós-natal (P7). Adaptado de Kozhemyakina *et al.* (2015) 27
- Figura 4. Placa de crescimento de tíbia de rato ao nascimento, composta por três tipos de condrócitos: redondos, achatados e hipertróficos. A primeira semana de vida dos ratos neonatos equivalem, em desenvolvimento ósseo endocondral, ao último trimestre de gestação humana. Coloração HE, objetiva 10x 28
- Figura 5. Mecanismo de feedback envolvendo *Indian hedgehog* (Ihh), peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrP) e fator de crescimento transformador beta (TGF β) na regulação da proliferação e da hipertrofia dos condrócitos na placa de crescimento. As setas da cor preta indicam interações que induzem liberação, enquanto a linha vermelha indica interação inibitória 29
- Figura 6. Invasão vascular na epífise cartilaginosa. Devido a ausência de vasos, o centro da epífise encontra-se em hipóxia, resultando em estabilização do fator induzido por hipóxia (HIF) e expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) pelos condrócitos. HIF e VEGF atuam promovendo sobrevivência celular, enquanto a expressão de metaloproteínase de membrana tipo 1 (MT1-MMP) atua na degradação da matriz cartilaginosa para facilitar crescimento vascular. Adaptado de Stegen e Carmeliet (2018) 31
- Figura 7. Placa de crescimento de tíbia de rato com 17 dias de vida, evidenciando a estrutura composta por zonas bem delimitadas. Aos 17 dias de vida, os ossos dos ratos encontram-se em estágio de desenvolvimento equivalente ao nascimento em humanos. Coloração HE, objetiva 10x 32
- Figura 8. Esquema ilustrando a farmacocinética do etanol e as principais enzimas envolvidas no processo de metabolização. ADH: álcool desidrogenase. ALDH: aldeído desidrogenase. H₂O: água. CO₂: gás carbônico. A seta mais espessa

representa a maior participação de ADH na metabolização do etanol em relação às enzimas do citocromo P450 2E1. Adaptado de Jones (2011)	42
Figura 9. Conversão de MTT em formazan (média ± desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 7, 14 e 21 dias de cultivo	62
Figura 10. Atividade de fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 7, 14 e 21 dias de cultivo. *p<0,05. Redução significativa da atividade da fosfatase alcalina aos 21 dias nos grupos tratados com 0,5% e 0,25% de etanol em comparação ao controle	63
Figura 11. A) Porcentagem de áreas PAS+ nos <i>pellets</i> de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 21 dias de cultivo, sob cultivo tridimensional. *p<0,05 (Teste t de <i>Student</i>). B) Secções histológicas dos <i>pellets</i> de condrócitos articulares de ratos neonatos, sob cultivo tridimensional, aos 21 dias. Redução significativa da porcentagem de áreas PAS+ no grupo tratado com 0,5% de etanol em relação ao controle	64
Figura 12. Análise morfométrica nos <i>pellets</i> de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 21 dias de cultivo, sob cultivo tridimensional. A) Grupo tratado com 0,5% de etanol com maior porcentagem de citoplasma de condrócitos em comparação ao controle. B) Grupo tratado com 0,5% de etanol com maior porcentagem de núcleo de condrócitos em comparação ao controle. C) Grupo tratado com 0,5% de etanol com menor porcentagem de matriz diferenciada em comparação ao controle. D) Diâmetro médio dos condrócitos semelhante entre grupos. *p<0,05 (Teste t de <i>Student</i>)	65
Figura 13. Expressão dos transcritos gênicos (média ± desvio padrão) para agrecan, Sox9 e colágeno II pela técnica de RT-qPCR nos condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 21 dias de cultivo. A) Grupo tratado com 0,5% de etanol com redução significativa da expressão de agrecan em comparação ao controle. B) Expressão de Sox9 sem diferença entre grupos. C) Expressão de colágeno II sem diferença entre grupos. *p<0,05, (Teste t de <i>Student</i>)	66

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Reguladores importantes para manutenção e função da placa de crescimento	37
Tabela 2. Lista de transcritos gênicos e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-qPCR	61

LISTA DE ABREVIATURAS

2D: bidimensional
3D: tridimensional
ADH: álcool desidrogenase
ALDH: aldeído desidrogenase
BCIP: *5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*
BMP: proteína morfogenética óssea
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CFU-F: unidade formadora de colônia de células fibroblásticas
C_{máx}: concentração sanguínea máxima
COL: colágeno
CTM-MO: célula tronco mesenquimal da medula óssea
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA: ácido desoxirribonucleico
DPEC: dietil pirocarbonato
FA: fosfatase alcalina
FASD: espectro de desordens alcoólicas fetais
FGF: fator de crescimento fibroblástico
Flk-1: *Fetal liver kinase 1* (VEGFR2)
Flt1: receptor Fms tirosine quinase 1 (VEGFR1)
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HDAC: histona desacetilase
HE: hematoxilina e eosina
HIF: fator induzido por hipóxia
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina
Ihh: *Indian hedgehog*
MEC: matriz extracelular
MEF: *myocyte enhancer factor*
MMP: metaloproteinase
MO: Missouri
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NAD: dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBT: *nitro-blue tetrazolium chloride*
NY: Nova Iorque
PAS: ácido periódico de Schiff
PBS: solução tampão de fosfato padrão
PCR: reação em cadeia da polimerase
PEE: exposição pré-natal ao etanol
PTHrP: peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide
qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNA: ácido ribonucleico
ROS: espécies reativas de oxigênio
RT: transcriptase reversa
RUNX: fator de transcrição runt-relacionado
SDS: dodecil sulfato de sódio
Shh: *Sonic hedgehog*
SOX: SRY-box
SP: São Paulo

T3: triiodotironina

T4: tiroxina

TGF: fator de crescimento transformador

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

USA: Estados Unidos da América

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular

WNT: via de sinalização *Wingless*

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	18
REVISÃO DE LITERATURA	21
1. FORMAÇÃO E CRESCIMENTO ÓSSEOS	21
1.1 Formação óssea endocondral (pré-natal)	21
1.2 Crescimento ósseo endocondral (pós-natal)	31
2. ETANOL	39
2.1 Farmacocinética do etanol	40
2.1.1 Farmacocinética do etanol durante a gestação	45
2.1.2 Farmacocinética do etanol no feto	48
2.1.3 Farmacocinética do etanol durante a lactação	49
3. SÍNDROME DO ALCOOLISMO FETAL	51
4. EFEITOS DO ETANOL SOBRE COMPONENTES ÓSSEOS	54
MATERIAL E MÉTODOS	58
Isolamento e cultivo de condrócitos	58
Ensaio do MTT	59
Atividade de fosfatase alcalina	59
Análise histoquímica e morfométrica dos <i>pellets</i> de condrócitos	60
Avaliação da expressão relativa dos transcritos gênicos de <i>agrecan</i>, <i>Sox9</i> e colágeno II por RT-qPCR	60
Análise estatística	61
RESULTADOS	62
Ensaio do MTT e da atividade de fosfatase alcalina	62
Análise histoquímica e morfométrica dos <i>pellets</i> de condrócitos	63
Expressão relativa dos transcritos gênicos de <i>agrecan</i>, <i>Sox9</i> e colágeno II por RT-qPCR	66
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	80
Anexo A. Certificado de aprovação da CEUA-UFMG	80
Anexo B. Artigo científico publicado na revista <i>Cartilage</i>	81
Anexo C. Preparo do meio de cultivo indiferenciado (DMEM)	89
Anexo D. Preparo do meio de cultivo condrogênico (para 100 ml)	89
Anexo E. Preparo do meio condrogênico contendo etanol (para 100 ml)	89
Anexo F. Metodologia para processamento do <i>pellet</i> de condrócitos	89
Anexo G. Protocolo para gelatinizar lâminas	90
Anexo H. Protocolo de coloração por PAS	90
Anexo I. Extração de RNA total com trizol	91
Anexo J. Síntese do cDNA	91
Anexo K. RT-qPCR tempo real	92

INTRODUÇÃO

A condrogênese é um fenômeno complexo, que envolve várias etapas, sendo um dos primeiros eventos celulares que ocorre durante o desenvolvimento do esqueleto. A formação do esqueleto ocorre a partir das ossificações intramembranosa e endocondral (Karaplis, 2008), mas a maior parte dos ossos originam-se da formação óssea endocondral, na qual as células tronco mesenquimais diferenciam-se em condrócitos, formando um modelo cartilaginoso que será gradativamente substituído por osso (Adams *et al.*, 2007). Já durante o período pós-natal, ocorre proliferação, diferenciação e maturação dos condrócitos da placa epifisária e da cartilagem articular, o que determina o comprimento final do osso adulto (Mackie *et al.*, 2008).

Durante a embriogênese, no início da formação óssea endocondral, as células tronco mesenquimais se diferenciam em células progenitoras osteocondrais que, por sua vez, sofrem condensação e se diferenciam em condrócitos, sob o estímulo de moléculas da família do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e das vias de sinalização Wnt (Leboy, 2006; Yang, 2009). Os condrócitos se proliferam e expressam fatores de transcrição como o Sox9, que ativam genes alvos nas células condrogênicas, resultando em secreção de matriz extracelular rica em colágeno II, X, XI, além dos proteoglicanos como agrecan para formar um molde de cartilagem que antecede a formação óssea (Kronenberg, 2003; Tsumaki e Yoshikawa, 2005; Abarca-Buis *et al.*, 2006; Horton e Degrin, 2009).

O Sox9 é essencial para a sobrevivência celular, para a conversão das células condroprogenitoras em condrócitos, para a maturação de condrócitos (Ikegami *et al.*, 2011) e para a expressão de agrecan (Kronenberg, 2003) e de colágeno II, sendo este último, o principal componente da matriz extracelular (Shi *et al.*, 2015). Na vida pós-natal, o colágeno II, juntamente com o agrecan, são os principais responsáveis pela resistência da cartilagem frente às forças biomecânicas, o que faz com que a síntese adequada de ambos seja essencial para a manutenção da cartilagem (Ikeda *et al.*, 2014).

No entanto, se as etapas que determinam a formação e o crescimento ósseos endocondrais não estiverem devidamente reguladas e coordenadas, alterações do crescimento ósseo podem surgir como consequência deste descontrole (Yan *et al.*, 2012). Dentre as substâncias que são capazes de interferir com a formação e o crescimento ósseo endocondral, destaca-se o etanol (Snow e Keiver, 2007).

O consumo de bebidas alcoólicas por gestantes é um fator de risco para o feto, pois o etanol é capaz de atravessar livremente a placenta e entrar na circulação fetal por apresentar baixo peso molecular e boa solubilidade (Ni *et al.*, 2018). O etanol possui a capacidade de afetar mecanismos fisiológicos maternos necessários para o desenvolvimento do feto, como por exemplo, o controle da calcemia (Duggal *et al.*, 2007). Além disso, a exposição pré-natal ao etanol (PEE) é capaz de induzir um conjunto de alterações fetais conhecido como espectro de desordens fetais alcoólicas, que se caracteriza por anormalidades faciais, por disfunções estruturais ou funcionais do sistema nervoso central e por redução do crescimento ósseo (Dörrie *et al.*, 2014).

Uma limitação dos estudos em seres humanos é a dificuldade em afirmar que as alterações observadas nos indivíduos que sofreram a PEE são decorrentes exclusivamente do etanol, tendo em vista que sua associação a fatores ambientais e ao uso de outras drogas é frequente. Grande parte das mulheres que consome etanol durante a gestação também são tabagistas e o cigarro, por si só, já causa danos ao feto (Dörrie *et al.*, 2014). Por isso e pelas razões éticas que impedem que mulheres gestantes sejam incluídas em determinados experimentos, os modelos murinos têm sido bastante utilizados para esclarecer os danos causados pelo consumo de etanol no período pré-natal (Ni *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2018). Ratos com PEE apresentam diminuição no comprimento ósseo, bem como desorganização da placa epifisária, com diminuição da espessura da zona de repouso e aumento da zona hipertrófica (Snow e Keiver, 2007). Além disso, ratos com PEE também são mais predispostos à osteoartrite (Ni *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2018).

Muitas vezes, a redução do crescimento ósseo causada pela PEE não tem sido atribuída ao efeito direto do etanol. A redução do comprimento do fêmur de ratos com PEE, por exemplo, foi atribuída ao aumento nos níveis de glicocorticoides maternos e não ao efeito direto do etanol sobre o feto (Pan *et al.*, 2016). Além disso, acredita-se que a redução do crescimento ósseo possa ser decorrente da má nutrição em consequência da menor capacidade de sucção pelo filhote (Murillo-Fuentes *et al.*, 2001), associada à falha na ejeção do leite, devido ao efeito supressor do etanol sobre a liberação de ocitocina materna (Giglia, 2010).

Embora haja estudos demonstrando os efeitos diretos da adição de etanol em culturas de osteoblastos (Maran *et al.*, 2001), osteoclastos (Cheung *et al.*, 1995) e de células tronco mesenquimais (Gong e Wezeman, 2004), não há estudos que tenham investigado o efeito da adição de etanol sobre o fenótipo, a atividade enzimática e a atividade de síntese de

condrócitos articulares de neonatos. Nossa hipótese é que a redução do crescimento ósseo endocondral causada pela PEE, seja decorrente do efeito direto do etanol sobre os condrócitos. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo a utilização de um modelo experimental de cultura bidimensional e tridimensional, com a finalidade de avaliar, pela primeira vez, o efeito direto de diferentes concentrações de etanol adicionadas ao meio de cultura sobre o fenótipo do condrócito, sua atividade enzimática, sua atividade de síntese, bem como sobre a expressão de transcritos gênicos envolvidos na condrogênese, representados por Sox9, colágeno II e agrecan.

REVISÃO DE LITERATURA

1. FORMAÇÃO E CRESCIMENTO ÓSSEOS

Durante o desenvolvimento humano, a organogênese tem início na terceira semana de gestação e compreende o período no qual os três folhetos embrionários - ectoderma, mesoderma e endoderma - se diferenciam nos vários órgãos que compõem o organismo (Moore *et al.*, 2012). O sistema musculoesquelético está entre os sistemas que se formam durante esse período (Grigoriou *et al.*, 2017).

Os ossos podem ser formados por meio de dois processos distintos. Quando as células mesenquimais precursoras se diferenciam em tecido ósseo sem necessidade de um molde prévio, o processo é denominado ossificação intramembranosa. Esse mecanismo ocorre nos ossos chatos do crânio. Porém, quando as células mesenquimais precursoras formam um molde cartilaginoso que posteriormente é substituído por tecido ósseo, o processo é denominado ossificação endocondral. Esse tipo de ossificação ocorre na maioria dos ossos do esqueleto, como ossos longos dos membros, vértebras, ossos da base do crânio, dentre outros (Grigoriou *et al.*, 2017).

1.1 Formação óssea endocondral (pré-natal)

Apesar das vértebras e dos ossos longos serem formados por ossificação endocondral, a origem embrionária difere entre eles. As vértebras são formadas a partir dos somitos provenientes do mesoderma paraxial. Por outro lado, a formação dos membros em humanos tem início na quarta semana de gestação (Grigoriou *et al.*, 2017) a partir de células mesenquimais oriundas do mesoderma da placa lateral. Interações entre ectoderma e mesoderma resultam no surgimento do broto do membro (Ono e Kronenberg, 2018).

O broto do membro se origina de células mesenquimais indiferenciadas provenientes do mesoderma da placa lateral e do miótomo (Ono e Kronenberg, 2018), que formam uma projeção na parede ventrolateral do corpo. Essa projeção do mesoderma é recoberta pelo ectoderma que expressa fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) e dá origem à uma importante zona de sinalização chamada crista ectodérmica apical (Grigoriou *et al.*, 2017). Inicialmente a crista ectodérmica apical expressa principalmente FGF8, que estimula a

proliferação das células mesenquimais do broto do membro; ao mesmo tempo em que as células mesenquimais do broto do membro expressam FGF10 que atua na manutenção da crista ectodérmica apical. Assim, ocorre a formação de um mecanismo de *feedback* positivo que resulta no surgimento da zona de progresso em meio ao mesoderma do broto do membro (Pignatti *et al.*, 2014) (Fig. 1).

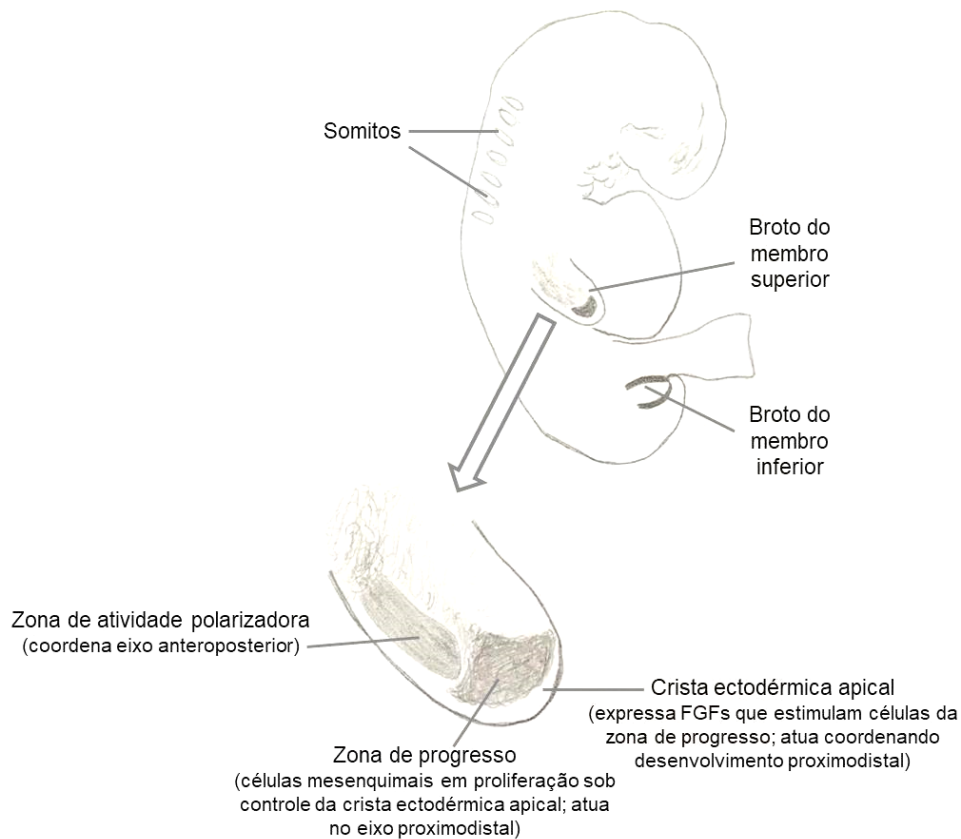


Figura 1. Representação de embrião humano com cinco semanas de desenvolvimento evidenciando o início da formação dos membros. Adaptado de Grigoriou *et al.* (2017).

O FGF expresso pela crista ectodérmica apical tem ação inibitória sobre o ácido retinóico produzido pelas células mesenquimais do broto proximal, ao mesmo tempo que o ácido retinóico inibe a ação do FGF. Com isso, há estímulo para distanciamento da crista ectodérmica apical das células mesenquimais proximais e a crista passa a se projetar distalmente. Assim, tem início o crescimento no eixo proximodistal, responsável pelo crescimento no sentido do úmero/fêmur em direção às falanges (Iber e Zeller, 2012).

Além do eixo proximodistal, cuja sinalização aparece primeiro, outros dois eixos coordenam o desenvolvimento do membro: o anteroposterior e o dorsoventral. Cada um dos três eixos possui mecanismos regulatórios próprios, porém, por possuírem mecanismos em comum, um acaba influenciando o desenvolvimento do outro (Grigoriou *et al.*, 2017). Assim, a sinalização proveniente dos FGFs expressa pela crista ectodérmica apical estimula a formação de outra área de sinalização no broto do membro, denominada zona de atividade polarizadora. A zona de atividade polarizadora é composta por células do mesoderma e expressa o *Sonic hedgehog* (Shh), sendo o principal centro de sinalização que coordena o crescimento do eixo ântero-posterior (Ono e Kronenberg, 2018).

A determinação do eixo dorsoventral, por sua vez, é regulada tanto por componentes do mesoderma quanto do ectoderma do broto do membro. Inicialmente, a sinalização Wnt-7a estimula células do ectoderma a expressarem LMX-1, que atua promovendo a localização dorsal dessas células. Por outro lado, as células do mesoderma localizadas na porção ventral do broto do membro expressam o fator de transcrição EN-1, que atua suprimindo a expressão de Wnt-7a e conseqüentemente a atividade de LMX-1, resultando na ação desse fator restrita ao mesoderma dorsal (Grigoriou *et al.*, 2017).

Reconhece-se que os mecanismos que envolvem a ossificação dos membros são complexos, dinâmicos e ainda estão longe de serem totalmente compreendidos. Ainda não se sabe o que leva as células do mesoderma da placa lateral a migrarem para locais específicos dando origem às condensações mesenquimais (Kozhemyakina *et al.*, 2015). Porém, sabe-se que as células mesenquimais indiferenciadas se agrupam por meio de estímulos provenientes das vias de sinalização que envolvem TGF- β , proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento fibroblástico e SOX9 (Ono e Kronenberg, 2018). As células que migram para os locais predestinados à formação óssea produzem matriz extracelular (MEC) composta principalmente por colágeno I, ácido hialurônico, tenascina e fibronectina. Porém, tais componentes da MEC impedem o íntimo contato entre as células e, então, à medida que a condensação se consolida, há aumento da atividade da hialuronidase, permitindo maior adesão celular. Dessa forma, as condensações são caracterizadas por grande quantidade de células mesenquimais indiferenciadas, em íntimo contato umas com as outras. A proximidade entre as células facilita as interações entre elas por meio de moléculas de adesão e junções gap, aumentando a resposta às vias de transdução de sinais que sinalizam o início da diferenciação condrogênica (DeLise *et al.*, 2000).

A seguir, as células das condensações vão se diferenciar em dois tipos celulares distintos: condrócitos e células pericondriais. A diferenciação condrogênica ocorre no centro da condensação, enquanto as células pericondriais assumem posição periférica. Essa diferenciação tem início quando as células mesenquimais indiferenciadas da condensação passam a produzir Sox9 (Ono e Kronenberg, 2018). Sox9 é considerado um dos fatores de transcrição mais importantes para a formação das condensações e diferenciação condrogênica, pois é essencial para a sobrevivência celular, para a conversão das células condroprogenitoras em condrócitos, para a maturação de condrócitos (Ikegami *et al.*, 2011), além de estimular a expressão de agregcan, colágeno II (Col2), colágeno IX (Col9) e colágeno XI (Col11) (Ono e Kronenberg, 2018) (Fig. 2).

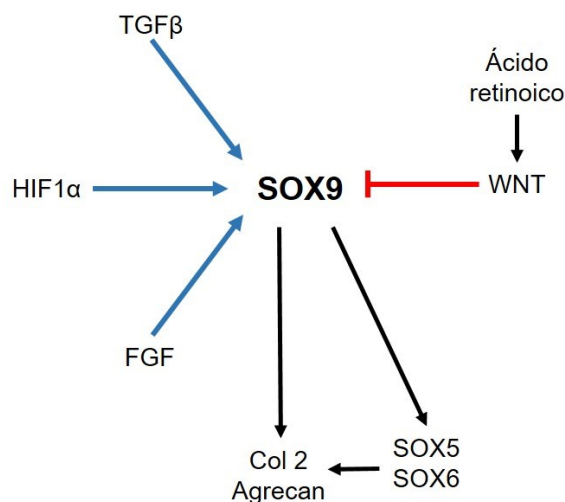


Figura 2. Fatores ativadores e inibitórios do Sox9. As setas azuis representam fatores que aumentam a ação de Sox9, enquanto o traçado em vermelho indica fator inibitório para Sox9. As setas pretas indicam fatores estimulados por Sox9. TGF- β : fator de crescimento transformador beta. HIF1 α : fator induzido por hipóxia 1 alfa. FGF: fator de crescimento fibroblástico. Col2: colágeno II. WNT: via de sinalização WNT. Adaptado de Kozhemyakina *et al.* (2015).

O ectoderma expressa Wnt que induz silenciamento do gene Sox9 por meio da metilação do DNA. Porém, a sinalização pelo FGF atua bloqueando as metiltransferases de atuarem sobre a região promotora de Sox9, promovendo assim a ativação do gene e a indução da

diferenciação condrogênica. Desta forma, observa-se aumento da expressão de Sox9 desde o início da formação das condensações, estimulada pelos FGFs expressos pela crista ectodérmica apical, e esse aumento induz a diferenciação condrogênica das células mesenquimais. O ácido retinóico produzido pelas células mesenquimais proximais estimula a sinalização Wnt e, portanto, tem ação antagonista sobre a expressão de Sox9 (Kozhemyakina *et al.*, 2015). Porém, com o crescimento do eixo próximo-distal, ocorre distanciamento dos centros de sinalização que guiam a ossificação endocondral de tais células produtoras de ácido retinóico, reduzindo assim a influência dessa via sobre as células em diferenciação (Iber e Zeller, 2012).

As áreas de condensações celulares e a cartilagem em desenvolvimento são avasculares e isso resulta em redução local da tensão de oxigênio e em hipóxia tecidual. Nessas condições, as células aumentam a expressão do fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF1 α) que atua como promotor da condrogênese, por aumentar a expressão de Sox9 e ativar mecanismos compensatórios para a hipóxia (Kozhemyakina *et al.*, 2015).

À medida que as células da região central das condensações se diferenciam, observa-se mudança no padrão de secreção da MEC, pois os condrócitos passam a produzir colágeno II, colágeno IX, colágeno XI, agrecan, dentre outros. Durante todo o processo de crescimento endocondral, os condrócitos atuam em uma sequência de eventos coordenados, que só são passíveis de ocorrer devido às variações morfológicas entre as populações celulares (DeLise *et al.*, 2000). Assim, os condrócitos não somente são componentes da cartilagem, como também secretam moléculas que regulam todo o processo de ossificação endocondral (Mackie *et al.*, 2011). Uma vez que ocorre diferenciação condrogênica com produção de matriz cartilaginosa, os condrócitos envolvidos por essa matriz passam a ter formato arredondado (DeLise *et al.*, 2000).

Na sexta semana de gestação, os condrócitos do molde proliferam-se em colunas paralelas, fazendo assim com que o molde aumente seu tamanho. A proliferação é controlada tanto por fatores sistêmicos quanto por fatores locais, dentre eles o *Indian hedgehog* (Ihh), hormônio do crescimento, fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) e peptídeo relacionado ao hormônio da paratireóide (DeLise *et al.*, 2000). Já na sétima semana, as células do centro do molde param de proliferar e passam pelo processo de maturação, caracterizado por hipertrofia celular, ao mesmo tempo em que as células da periferia, que formam o

pericôndrio, se diferenciam em osteoblastos que produzem matriz mineralizada ao redor do molde, chamada de colar ósseo (Gregoriou *et al.*, 2017).

Com a hipertrofia, observa-se também mudança no padrão de expressão dos condrócitos, que passam a expressar o fator de transcrição runt-relacionado 2 (Runx2). O Runx2 atua sobre essas células hipertróficas impedindo a permanência do fenótipo cartilaginoso, importante para diferenciação osteogênica e para a mineralização da matriz. Ainda, esse fator de transcrição induz a expressão de metaloproteinase 13 (MMP-13), que degrada a matriz condrogênica, etapa fundamental para que a cartilagem seja invadida por vasos sanguíneos (Komori, 2018). Simultaneamente, a expressão de fatores angiogênicos, principalmente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), pelos condrócitos hipertróficos gera forte quimiotaxia para as células endoteliais, que penetram a cartilagem e dão origem aos vasos sanguíneos (Sivaraj e Adams, 2016). Essa invasão vascular é essencial para o desenvolvimento ósseo, uma vez que esses vasos servirão como porta de entrada para células responsáveis pela fagocitose de condrócitos apoptóticos e para células osteoprogenitoras (Harper e Klagsbrun, 1999).

As células osteoprogenitoras que chegam por meio dos vasos neoformados se diferenciam em osteoblastos que passam a produzir matriz óssea que será mineralizada, enquanto os condrócitos hipertróficos passam por processo de apoptose e são gradativamente substituídos por osso (Kronenberg, 2003). Nesse ponto, forma-se o centro de ossificação primário, local que dará origem ao canal medular. O crescimento a partir do centro de ossificação primário segue do centro para as extremidades, de modo que toda a cartilagem da diáfise passa a ser substituída por tecido ósseo (DeLise *et al.*, 2000) (Fig. 3).

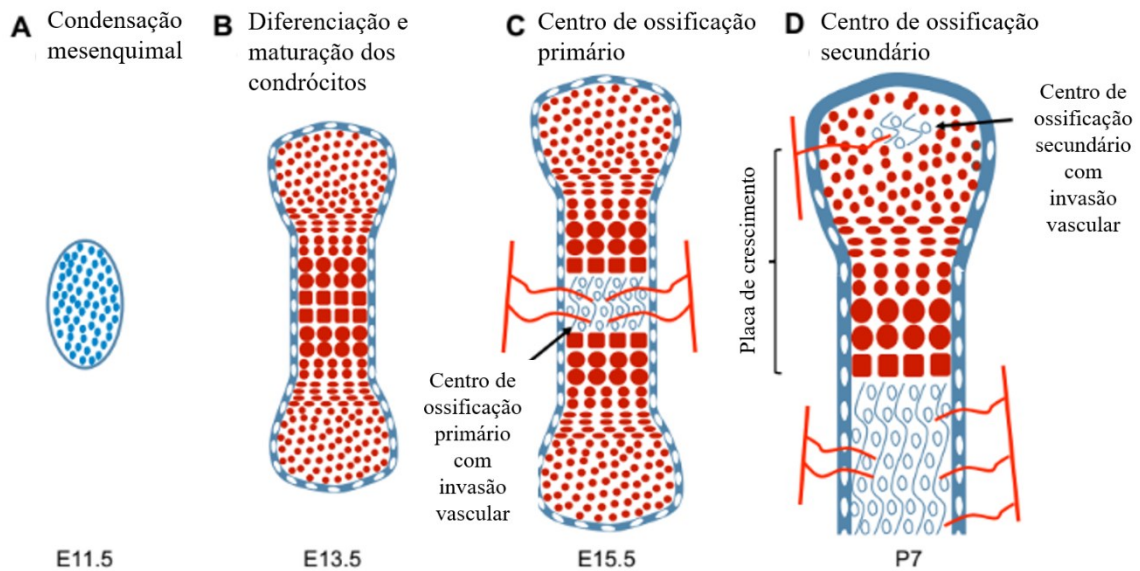


Figura 3. Etapas da ossificação endocondral de osso longo de camundongo. A) Início da formação das condensações mesenquimais no broto do membro no dia 11,5 embrionário (E11.5). B) As células precursoras se diferenciam em condrócitos e formam o molde cartilaginoso no dia 13,5 embrionário (E13.5). C) A formação do centro de ossificação primário na diáfise do osso ocorre no dia 15,5 embrionário (E15.5). D) A formação do centro de ossificação secundário na epífise só ocorre após o nascimento, no sétimo dia de vida pós-natal (P7). Adaptado de Kozhemyakina *et al.* (2015).

A placa de crescimento fetal é composta por três tipos de condrócitos: redondos, achatados e hipertróficos (Fig. 4). Os condrócitos redondos estão localizados mais perto das extremidades do molde cartilaginoso e são chamados de condrócitos periarticulares. Os condrócitos abaixo deles possuem formato achatado e assumem distribuição particular na qual uma célula localiza-se sobre a outra formando colunas paralelas. Tanto os condrócitos redondos quanto os achatados possuem atividade proliferativa. Porém, os condrócitos achatados eventualmente param de se proliferar e passam por mudanças morfológicas que geram sua diferenciação em condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos (Ono e Kronenberg, 2018).

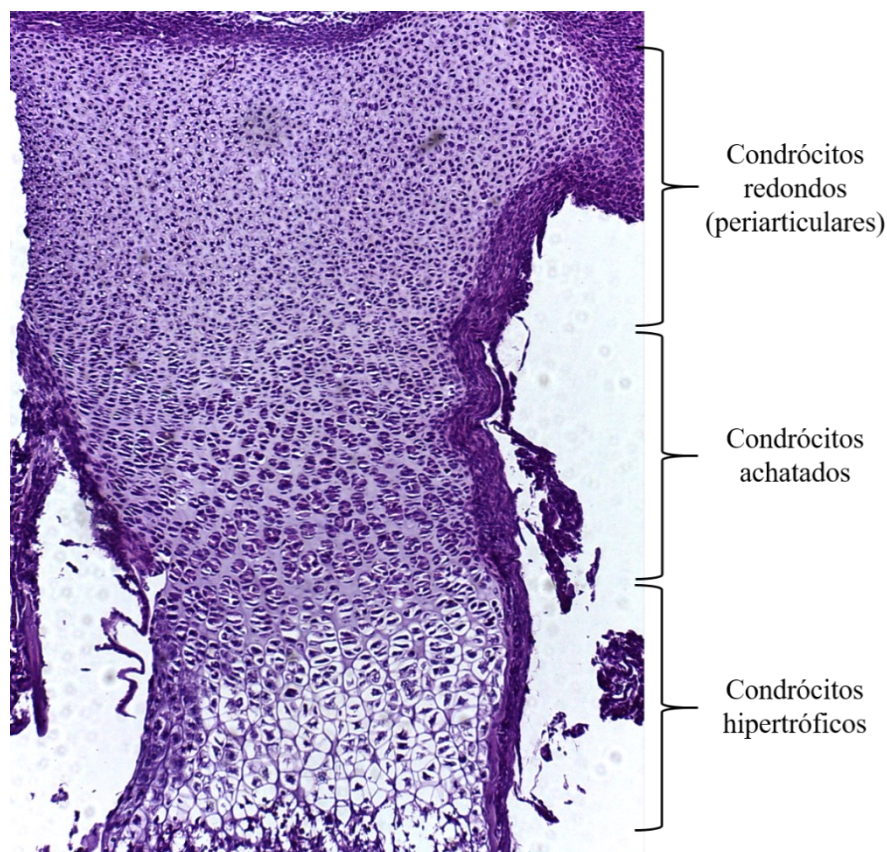


Figura 4. Placa de crescimento de tíbia de rato ao nascimento, composta por três tipos de condrócitos: redondos, achatados e hipertróficos. A primeira semana de vida dos ratos neonatos equivalem, em desenvolvimento ósseo endocondral, ao último trimestre de gestação humana. Coloração HE, objetiva 10x.

Os condrócitos redondos periarticulares produzem proteínas importantes para a manutenção do tecido de crescimento cartilaginoso, entre elas o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrP). O PTHrP é produzido pelos condrócitos periarticulares, mas seu receptor pode ser encontrado nos últimos condrócitos achatados proliferativos e condrócitos pré-hipertróficos (Ballock e O’Keefe, 2003). Assim, essa proteína atua de modo a manter a proliferação e retardar a diferenciação hipertrófica (Ono e Kronenberg, 2018). A ação do PTHrP é dependente da sinalização proveniente do Ihh e do TGF- β , formando um mecanismo de *feedback*. Quando a célula passa a ser hipertrófica ela expressa Ihh, que estimula a sinalização via TGF- β pelas células do pericôndrio por meio da interação com seus receptores Patched e Gli. Essa sinalização induzida por Ihh e TGF- β alcança as células periarticulares e as induz a produzirem mais PTHrP, retardando assim a hipertrofia (Ballock e O’Keefe,

2003). Além disso, o *Ihh*, expresso pelos condrócitos hipertróficos, estimula a diferenciação das células adjacentes, permitindo assim a progressão da maturação que até então era impedida em parte pela ação do PTHrP (Ono e Kronenberg, 2018). Dessa forma, a própria célula em hipertrofia serve como sinalizadora para aumentar a produção de PTHrP e retardar a evolução do processo (Ballock e O’Keefe, 2003). Esse mecanismo de *feedback* envolvendo PTHrP, *Ihh* e TGF- β é essencial para a manutenção da estrutura do tecido de crescimento cartilaginoso (Mak *et al.*, 2008) (Fig. 5).

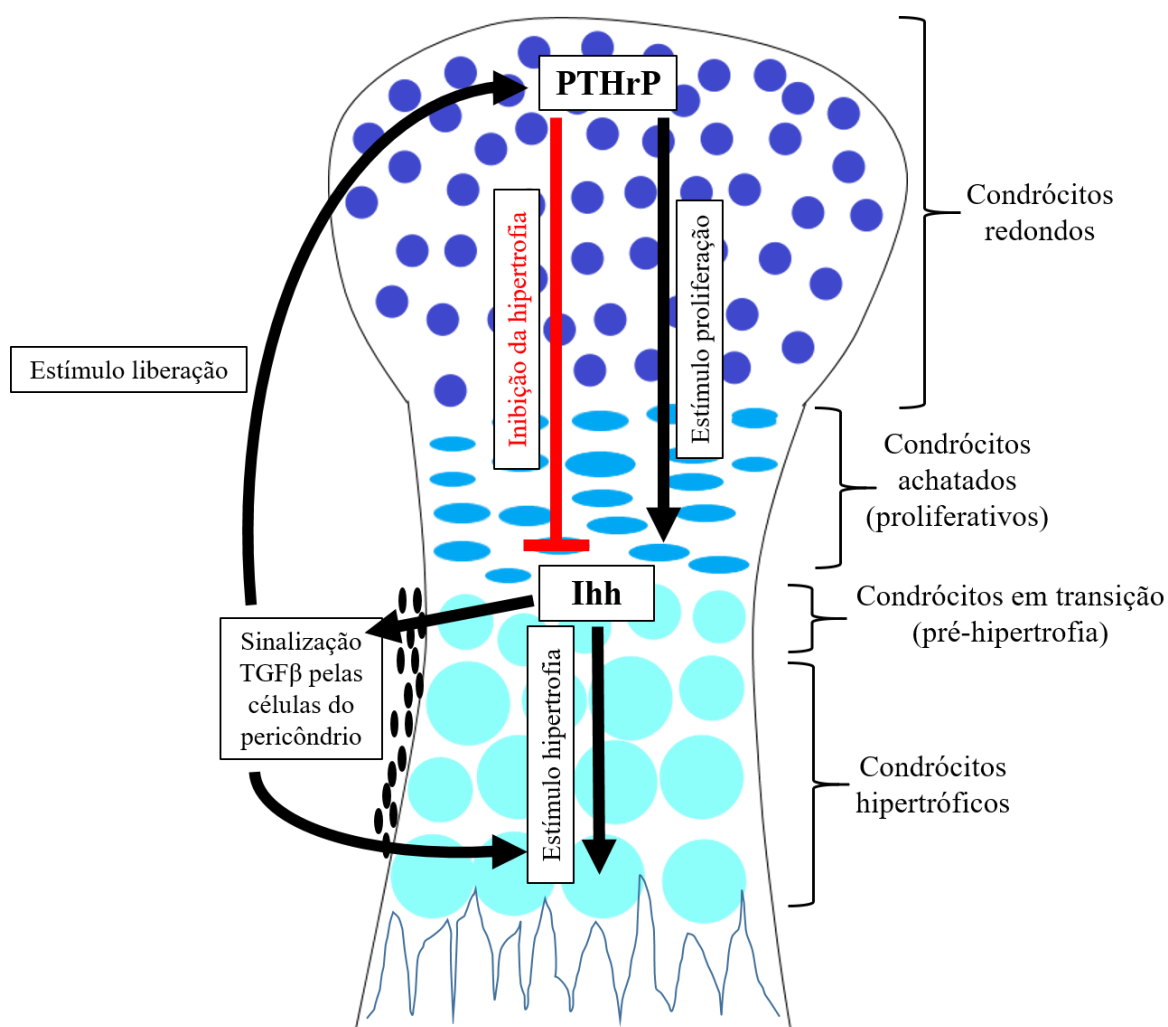


Figura 5. Mecanismo de feedback envolvendo *Indian hedgehog* (*Ihh*), peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrP) e fator de crescimento transformador beta (TGF β) na regulação da proliferação e da hipertrofia dos condrócitos na placa de crescimento. As setas da cor preta indicam interações que induzem liberação, enquanto a linha vermelha indica interação inibitória.

Ainda, Ihh expresso pelos condrócitos pré-hipertróficos na placa de crescimento pós-natal estimula a diferenciação das células do pericôndrio adjacente em osteoblastos, participando assim da formação do que posteriormente será o osso cortical (Ono e Kronenberg, 2018). Camundongos *Ihh*^{-/-} não formam o colar ósseo e o pericôndrio é composto predominantemente por células mesenquimais indiferenciadas, sem formação adequada de osso trabecular e cortical. Esses animais apresentam osteoblastos afuncionais, resultando em baixa expressão de Runx2 e osteocalcina (St-Jacques *et al.*, 1999).

Os condrócitos hipertróficos são os principais responsáveis pelo crescimento em comprimento do molde cartilaginoso, resultando em crescimento longitudinal do osso. Eles são importantes não só por aumentar o volume, mas também por expressarem componentes da MEC, como o colágeno X (Col10) e direcionarem a mineralização da MEC adjacente, além de secretarem fatores angiogênicos para indução de neovascularização. Ainda, os condrócitos hipertróficos iniciais expressam Ihh que regula a proliferação e a diferenciação, tanto em condrócitos quanto nas células do pericôndrio. Tudo isso faz com que essa população celular seja considerada reguladora-chave da ossificação endocondral (Ono e Kronenberg, 2018).

De modo semelhante ao que foi descrito para a formação do centro de ossificação primário, a região correspondente à epífise será invadida por vasos sanguíneos e dará origem ao centro de ossificação secundário (DeLise *et al.*, 2000). A formação do centro de ossificação secundário tem início quando condrócitos redondos do centro da epífise cartilaginosa passam pelo processo de hipertrofia, provavelmente em resposta à hipóxia local (Ono e Kronenberg, 2018). Por ser avascular, ocorre redução da tensão de oxigênio na região central do molde cartilaginoso, o que induz à expressão do fator induzido por hipóxia-1 α (HIF1 α), que conseqüentemente aumenta a liberação de VEGF (Stegen e Carmeliet, 2018). O resultado disso é a invasão vascular com a chegada de precursores osteogênicos (Ono e Kronenberg, 2018). Assim, tanto o HIF1 α quanto o VEGF atuam promovendo sobrevivência dos condrócitos do centro da epífise (Stegen e Carmeliet, 2018) (Fig. 6).

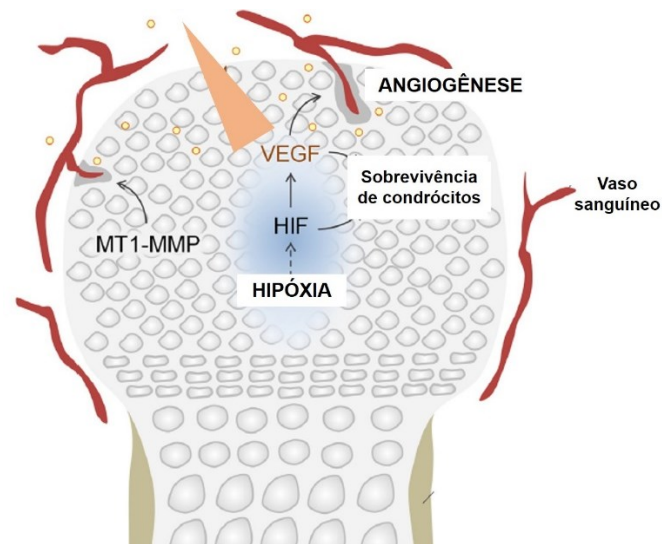


Figura 6. Invasão vascular na epífise cartilaginosa. Devido a ausência de vasos, o centro da epífise encontra-se em hipóxia, resultando em estabilização do fator induzido por hipóxia (HIF) e expressão de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) pelos condrócitos. HIF e VEGF atuam promovendo sobrevivência celular, enquanto a expressão de metaloproteinase de membrana tipo 1 (MT1-MMP) atua na degradação da matriz cartilaginosa para facilitar crescimento vascular. Adaptado de Stegen e Carmeliet (2018).

O centro de ossificação secundário é muito semelhante ao centro de ossificação primário, exceto que ele não tem pericôndrio adjacente e está rodeado por condrócitos (Ono e Kronenberg, 2018). Assim, o centro de ossificação secundário fica localizado em meio às duas cartilagens que permanecem após o nascimento: a placa de crescimento e a cartilagem articular (DeLise *et al.*, 2000).

1.2 Crescimento ósseo endocondral (pós-natal)

A placa de crescimento pós-natal, também chamada de placa epifisária, localiza-se entre o centro de ossificação primário e o centro de ossificação secundário. No geral é muito semelhante à placa de crescimento pré-natal, com algumas particularidades (Ono e Kronenberg, 2018). Uma das diferenças mais notáveis é a distribuição das células em zonas relativamente bem delimitadas, sendo elas zona de repouso, zona proliferativa, zona pré-hipertrófica e zona hipertrófica (Mackie *et al.*, 2011) (Fig. 7). Pode-se considerar que a placa

epifisária é um tecido transitório que serve de base para o crescimento ósseo, enquanto o osso é uma estrutura definitiva com funções metabólicas (Gerstenfeld e Shapiro, 1996).

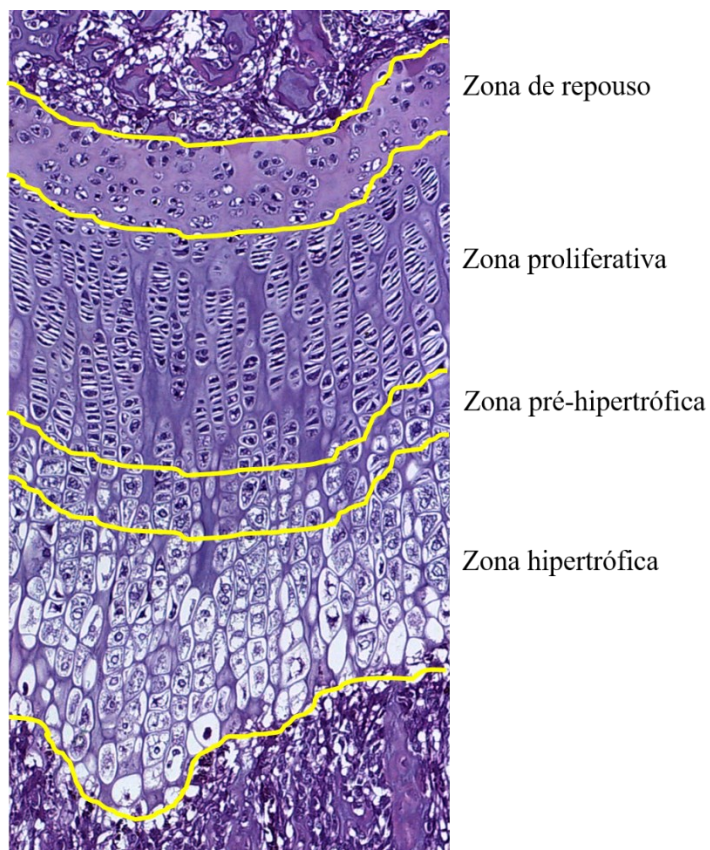


Figura 7. Placa de crescimento de tibia de rato com 17 dias de vida, evidenciando a estrutura composta por zonas bem delimitadas. Aos 17 dias de vida, os ossos dos ratos encontram-se em estágio de desenvolvimento equivalente ao nascimento em humanos. Coloração HE, objetiva 10x.

A zona de repouso somente aparece na placa de crescimento madura e fica localizada mais próxima do centro de ossificação secundário (Ono e Kronenberg, 2018). É caracterizada pela presença abundante de MEC, em quantidade relativamente maior do que condrócitos (Ballock e O'Keefe, 2003). Possui atividade proliferativa baixa e as suas células têm como principal função servir de reserva para os condrócitos achatados e proliferativos que formam a zona proliferativa adjacente (Ono e Kronenberg, 2018).

A proliferação ocorre de forma significativa na zona proliferativa e é controlada por fatores sistêmicos e locais (Ballock e O'Keefe, 2003). O principal fator sistêmico que controla a

proliferação dos condrócitos é o hormônio do crescimento, e seu efeito é mediado pela secreção de IGF-1 (Mackie *et al.*, 2011). Quantidades adequadas de hormônio do crescimento na circulação sistêmica resultam em aumento nos níveis de IGF-1 na placa de crescimento. Ainda, os hormônios tireoidianos participam do crescimento ósseo por estímulo à produção de hormônio do crescimento (Ballock e O’Keefe, 2003).

Na placa de crescimento, os condrócitos imaturos da zona de repouso e os condrócitos proliferativos secretam matriz rica em agrecan, Col2 e inibidores angiogênicos (Hall *et al.*, 2006). Ainda, nessas zonas há presença abundante de Col9 e Col11. O agrecan, principal representante dos proteoglicanos, é importante para conferir resistência osmótica contra cargas compressivas (Ballock e O’Keefe, 2003).

Ocorre um período de transição entre a proliferação e a hipertrofia, no qual os condrócitos são reconhecidos como condrócitos pré-hipertróficos (Mackie *et al.*, 2008). Essa fase de transição é muito importante, pois condrócitos proliferativos e os hipertróficos apresentam padrão de expressão bastante distintos, e essas alterações de expressão são capazes de modificar a estrutura e a composição da MEC adjacente e preparar o tecido para os próximos passos do crescimento ósseo (Mackie *et al.*, 2011). Reconhece-se que os fatores que controlam a progressão da placa de crescimento são muitos e os mecanismos são complexos, e tudo que se sabe até o momento está longe de ser um conhecimento definitivo sobre o assunto (Liu *et al.*, 2017).

A zona hipertrófica é caracterizada pelo aumento de volume celular, aumento da atividade da fosfatase alcalina e da síntese de colágeno X (Ballock e O’Keefe, 2003). Vale destacar que a mudança no padrão de expressão da MEC é uma característica importante da hipertrofia. Os condrócitos hipertróficos deixam de secretar predominantemente Col2 e passam a secretar Col10, sendo este último considerado um marcador específico da hipertrofia (Mackie *et al.*, 2011). Assim, Col10 é encontrado apenas nas áreas com diferenciação hipertrófica ou terminal (mineralizada). Por outro lado, Col2 e Col9 são expressos em todas as zonas da placa de crescimento, principalmente na zona proliferativa, e a expressão permanece na cartilagem articular após cessar o crescimento. Ainda sobre a produção de MEC, na zona hipertrófica e nas porções de cartilagem mineralizada, há redução da quantidade e da síntese de proteoglicanos. Isso indica que a diferenciação hipertrófica está acompanhada de remodelamento da MEC mediada por eventos proteolíticos (Gerstenfeld e Shapiro, 1996).

Além disso, condrócitos hipertróficos secretam MMP-13, que é a principal enzima responsável pela degradação do Col2 (Mackie *et al.*, 2011). Após a formação da placa de crescimento, apenas condrócitos hipertróficos terminais e osteoblastos expressam MMP-13, facilitando a invasão local de vasos sanguíneos neoformados em meio à matriz colagênica degradada (Stickens *et al.*, 2004) e permitindo o aumento de volume das células (Mackie *et al.*, 2008). A formação desses vasos é importante porque permite a entrada de células precursoras que darão origem a osteoblastos, osteoclastos e células hematopoéticas (Harper e Klagsbrun, 1999). Assim, em resumo, considera-se Ihh um marcador para condrócitos pré-hipertróficos, Col10 um marcador para condrócitos hipertróficos, e MMP-13 um marcador para condrócitos hipertróficos terminais (Liu *et al.*, 2017).

Outra característica dos condrócitos hipertróficos é a expressão de fatores pró-angiogênicos desde a vida pré-natal até o final da fase de crescimento. Em modelo experimental murino, por volta do dia 15 embrionário já é possível verificar a expressão de fatores pró-angiogênicos pelos condrócitos hipertróficos do centro do molde (Sivaraj e Adams, 2016). O VEGF é o principal responsável pela migração, proliferação e sobrevivência de células endoteliais durante a ossificação endocondral, bem como o responsável pela manutenção dos vasos neoformados (Hall *et al.*, 2006).

A expressão do receptor de VEGF chamado Flt1 é verificada tanto em condrócitos quanto em células endoteliais e osteoblastos, enquanto a expressão do receptor Flk1 é alta em condrócitos e células endoteliais, mas baixa em osteoblastos (Gerber *et al.*, 1999). VEGF, além de induzir angiogênese, promove degradação da matriz extracelular por induzir a liberação de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMT (Hall *et al.*, 2006), promover a sobrevivência de condrócitos (Zelzer *et al.*, 2004) e atuar na diferenciação e na atividade de osteoclastos (Dai e Rabie, 2007). Assim, o VEGF é considerado um mediador do crescimento ósseo não somente por promover a angiogênese mas também por coordenar a diferenciação das células da linhagem óssea (Chim *et al.*, 2013).

Os principais fatores sistêmicos envolvidos no controle da hipertrofia são os hormônios tireoidianos (Mackie *et al.*, 2011). Robson *et al.* (2000) verificaram que as células da zona de repouso e da zona proliferativa possuem receptores para hormônios tireoidianos, enquanto os condrócitos hipertróficos não possuem. Isso indica que células precursoras e condrócitos imaturos são os alvos primários desses hormônios na placa de crescimento. Ao avaliar os efeitos da suplementação de triiodotironina (T3) em meio de cultivo de condrócitos de ratos,

Robson *et al.* (2000) constataram que a T3 atua na conversão de condrócitos imaturos em hipertróficos, sem afetar a proliferação. Ainda, T3 é capaz de transformar células de reserva em condrócitos hipertróficos, sem a necessidade de passar por uma etapa prévia de proliferação. Assim, os hormônios tireoidianos podem, em situações específicas conforme a necessidade, recrutar condrócitos de reserva para a diferenciação hipertrófica contribuindo para formação óssea acelerada. Semelhante a esses resultados, Okubo e Reddi (2003) observaram que adição de tiroxina (T4) ao meio de cultivo de condrócitos de camundongos inibe a expressão de Sox9, e conseqüentemente estimula a hipertrofia e a expressão de Col10. Assim, reconhece-se que os hormônios tireoidianos são capazes de agir diretamente sobre a placa de crescimento, sem a necessidade de fatores intermediários.

O IGF-1 atua sobre a hipertrofia por promover aumento de volume celular. Essa promoção da hipertrofia, mediada por IGF-1, ocorre porque esse fator de crescimento é necessário para a nutrição celular. Camundongos *Igf-1^{-/-}* apresentam diferenciação normal, porém os condrócitos hipertróficos são menores do que o normal pela redução do aporte nutricional. Nesse sentido, entende-se que o IGF-1 aumenta a captação de glicogênio pelos condrócitos hipertróficos e aumenta a síntese proteica das células, promovendo então crescimento e produção de matriz. Justamente por serem células metabolicamente muito ativas, os condrócitos hipertróficos dependem do fornecimento adequado de glicose para manter suas funções de biossíntese em níveis normais (Wang *et al.*, 1999).

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são expressas durante o crescimento endocondral e desempenham diversas funções sobre o tecido ósseo. Sabe-se que as BMPs atuam promovendo síntese de MEC, tanto em condrócitos articulares quanto da placa epifisária, regulando a expressão e a atividade de fatores de transcrição e controlando a diferenciação condrogênica. Diferentes BMPs são expressas em diferentes zonas da placa de crescimento, o que sugere fortemente que suas funções diferem ao longo da maturação celular. Nesse sentido, ao avaliar a influência de BMPs sobre o crescimento endocondral, Caron *et al.* (2013) verificaram que BMP-2 estimula a hipertrofia, enquanto a BMP-7 a inibe. O efeito supressor da maturação que é exercido pela BMP-7 é mediado pelo fator de transcrição *Bapx1/Nkx3.2*, que atua impedindo a hipertrofia celular e mantendo o fenótipo cartilaginoso. Os autores verificaram que esse fator não responde ao aumento da expressão de BMP-2, mas aumenta em resposta ao estímulo pela BMP-7. Assim, BMPs atuam diretamente no controle da hipertrofia, exercendo atividade tanto pró quanto anti-hipertrófica.

O Runx2 é um fator de transcrição associado à progressão para o fenótipo ósseo. Esse fator é normalmente expresso no pericôndrio, bem como nos condrócitos hipertróficos, principalmente próximos à esponjosa primária (St-Jacques *et al.*, 1999). Assim, o Runx2 é um fator de transcrição importante na placa de crescimento, por coordenar a maturação dos condrócitos (Yoshida *et al.*, 2004) e induzir a hipertrofia (Liu *et al.*, 2017). Sua expressão é baixa nos condrócitos da zona de repouso e da zona proliferativa e elevada nos condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos, inibindo os condrócitos de adquirirem fenótipo permanentemente cartilaginoso e estimulando a expressão de proteínas importantes para a diferenciação terminal, incluindo Col10 e MMP-13 (Komori, 2018).

Runx2 atua diretamente na ativação da expressão de Col10 pelos condrócitos hipertróficos (Zheng *et al.*, 2003) e promove invasão vascular na região de diferenciação terminal através do estímulo para ativação de metaloproteinases que degradam a MEC e permitem a neoformação vascular (Johansson *et al.*, 1997). Essa invasão vascular permite a chegada de precursores de osteoblastos que serão responsáveis pela síntese de matriz óssea (Mackie *et al.*, 2008), e precursores osteoclásticos que vão atuar diretamente sobre a reabsorção da matriz cartilaginosa e o remodelamento ósseo (Mackie *et al.*, 2008). Ainda, Runx2 é expresso no pericôndrio e induz a diferenciação osteogênica para formação do osso cortical (Komori, 2018). Mutações ou ausência de Runx2 estão associadas a diversas alterações, dentre elas ossos curtos, osteopenia (Komori, 2018) e ineficiência da mineralização da matriz extracelular (Kronenberg, 2003). A Tabela 1 resume os principais reguladores da placa de crescimento e suas funções primordiais sobre os condrócitos.

Tabela 1. Reguladores importantes para manutenção e função da placa de crescimento.

Fator regulador	Atuação
BMPs	<ul style="list-style-type: none"> • Estímulo para síntese de MEC. • Estímulo ou inibição da hipertrofia.
FGF	<ul style="list-style-type: none"> • Ativação do gene Sox9.
Sox9	<ul style="list-style-type: none"> • Estímulo para diferenciação condrogênica. • Manutenção do fenótipo cartilaginoso. • Estímulo para expressão de MEC.
HIF1 α	<ul style="list-style-type: none"> • Indução da expressão de Sox9. • Estímulo para expressão de fatores pró-angiogênicos.
Ihh	<ul style="list-style-type: none"> • Estímulo para diferenciação hipertrófica e formação de osso cortical (em conjunto com PTHrP e TGFβ).
PTHrP	<ul style="list-style-type: none"> • Estímulo para proliferação. • Manutenção do fenótipo cartilaginoso e retardo da diferenciação hipertrófica (em conjunto com Ihh e TGFβ).
GH/IGF-1	<ul style="list-style-type: none"> • Promove proliferação. • Promove aumento de volume celular.
T3 e T4	<ul style="list-style-type: none"> • Estímulo para hipertrofia.
Runx2	<ul style="list-style-type: none"> • Indução de hipertrofia. • Indução de diferenciação terminal e osteogênica. • Estímulo para expressão de MMP-13, Col10 e VEGF.
MMP-13	<ul style="list-style-type: none"> • Promove degradação da matriz condrogênica.
VEGF	<ul style="list-style-type: none"> • Promove quimiotaxia para células endoteliais e neoformação vascular.

O controle da expressão gênica por mecanismos epigenéticos com capacidade de alterar o fenótipo dos indivíduos sem modificar o genoma também tem sido estudada na hipertrofia dos condrócitos (Sun e Beier, 2014). Nesse sentido, a estrutura da cromatina é importante porque controla a transcrição gênica e, assim, a acetilação de histonas pelas enzimas histona acetiltransferases expõe as sequências alvo do DNA. No entanto, a desacetilação de histonas pela histona desacetilases (HDAC) exerce efeito contrário. Nos condrócitos, a HDAC4 é expressa na zona pré-hipertrófica e atua como inibidor da atividade do Runx2, impedindo a progressão da hipertrofia e controlando o momento em que a cartilagem será substituída por osso (Vega *et al.*, 2004). Ainda, a HDAC3 é necessária para o aumento de volume dos condrócitos hipertróficos (Sun e Beier, 2014). A HDAC4 e outras histona desacetilases classe II estabelecem complexos com fatores de transcrição capazes de se ligar ao DNA, incluindo MEF2 (*myocyte enhancer factor-2*) que está relacionada com o desenvolvimento de células musculares e cardíacas. Em mamíferos, Mef2c é importante para o crescimento ósseo

endocondral no controle da hipertrofia inicial e na indução da expressão de Col10, Runx2 e VEGF. Assim, Mef2c promove hipertrofia e tem efeito inibitório sobre a ação da HDAC4, sendo capaz de controlar indiretamente a transcrição de genes que participam da ossificação (Arnold *et al.*, 2007).

Por fim, os condrócitos hipertróficos progridem para a diferenciação terminal. Essa etapa é caracterizada pela degradação da matriz condrogênica, seguida de invasão vascular, pela diferenciação de osteoblastos e osteoclastos a partir de células precursoras que chegam ao local pelos vasos neoformados, pela mineralização da MEC, pela morte e transdiferenciação de condrócitos terminais e pelo remodelamento do tecido (Mackie *et al.*, 2011). O local onde há presença tanto de cartilagem mineralizada quanto de matriz óssea é chamado de trabécula primária ou esponjosa primária, que irá sofrer remodelamento para dar origem ao osso trabecular ou à trabécula secundária (Ballock e O’Keefe, 2003). Nessa fase de maturação tardia há aumento da expressão de fatores que induzem a diferenciação óssea e a mineralização, dentre eles, o Runx2 e a fosfatase alcalina (Mackie *et al.*, 2011).

Outra característica associada aos condrócitos hipertróficos é expressão elevada de fosfatase alcalina (Gerstenfeld e Shapiro, 1996). A fosfatase alcalina (FA) é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de fosfomonoésteres, mecanismo que envolve a formação de fosfato a partir de reação com água em pH alcalino, gerando liberação de fosfato inorgânico (Golub e Boesze-Battaglia, 2007). Em vertebrados, os minerais depositados nos tecidos são compostos por hidroxiapatita. Na placa epifisária, a mineralização ocorre na zona hipertrófica, e a hidroxiapatita é formada nos condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos (Orimo, 2010). O gene da fosfatase alcalina é um dos primeiros a ser expresso durante o processo de mineralização, e a expressão de FA é considerada um dos principais mecanismos do controle da diferenciação osteoblástica (Golub e Boesze-Battaglia, 2007). O papel da FA na placa de crescimento é remover o pirofosfato extracelular, que é um reconhecido inibidor da mineralização (Mackie *et al.*, 2011). Assim, a FA serve como marcador da maturidade dos tecidos mineralizados e considera-se que a atividade dessa enzima é essencial para a progressão da cartilagem para tecido ósseo (Golub e Boesze-Battaglia, 2007).

Outro mecanismo pelo qual os condrócitos hipertróficos promovem mineralização é a liberação de vesículas de matriz. Essas vesículas são partículas extracelulares ligadas à membrana plasmática que são depositadas na MEC e servem como local para depósito de

hidroxiapatita. As vesículas de matriz apresentam atividade de FA e liberam MMP-9 e MMP-13 que atuam na degradação da matriz condrogênica (Ballock e O'Keefe, 2003).

Durante muitos anos, diversos autores consideraram que o destino final dos condrócitos hipertróficos era apenas morrer por apoptose. Porém, alguns pesquisadores questionaram se não poderia ocorrer transdiferenciação de condrócitos terminais em osteoblastos (Sun e Beier, 2014). Essa hipótese teve origem devido ao fato de condrócitos de áreas de cartilagem mineralizada compartilharem características moleculares comuns às de osteoblastos, tais como expressão dos genes da fosfatase alcalina, osteopontina, sialoproteína óssea, osteocalcina (Gerstenfeld e Shapiro, 1996) e colágeno I (Yang *et al.*, 2014). Para provar essa teoria, Yang *et al.* (2014) rastream condrócitos hipertróficos durante a formação óssea em modelo murino e constataram que essas células sobrevivem à transição entre cartilagem e osso porque se transformam em osteoblastos e osteócitos. Essa característica ocorre não apenas na vida embrionária, mas se mantém no crescimento pós-natal e no reparo de fraturas após parada do crescimento.

2. ETANOL

O etanol, conhecido comumente como álcool, é a substância tóxica mais consumida mundialmente e a intensidade do consumo depende de fatores como sexo, perfil socioeconômico, grau de escolaridade, idade dos indivíduos e aspectos culturais. Estima-se que mais da metade da população que vive na Europa, nas Américas e no Pacífico Ocidental faz uso de bebidas alcoólicas (WHO, 2018).

Além dos prejuízos causados ao próprio indivíduo, uma grande preocupação quando se trata do consumo de álcool é a possibilidade de danos causados a terceiros. Nesse sentido, um dos notórios transtornos induzidos pelo álcool é o espectro de desordens alcoólicas fetais (FASD), que ocorre quando há exposição *in utero* ao etanol em decorrência da ingestão de bebidas alcoólicas por gestantes. Os indivíduos acometidos apresentam anomalias que incluem má formação facial, retardo do crescimento e transtornos psicológicos (Dörrie *et al.*, 2014). Até o momento, não há nenhuma medida terapêutica capaz de reverter os danos causados pelo consumo de álcool materno (Ramadoss e Magness, 2012), nem certeza sobre a extensão das lesões em níveis moleculares (Fransquet *et al.*, 2016).

2.1 Farmacocinética do etanol

O etanol é uma molécula hidrossolúvel, pequena, sem cargas iônicas e que não precisa de carreador para ser transportada. Devido a essas características, é identificado no sangue quase imediatamente após o início do seu consumo e a distribuição pelos fluidos corpóreos é rápida (Jones, 2011; Zelner e Koren, 2013). A farmacocinética do etanol pode variar de acordo com o sexo do indivíduo e o período gestacional e lactação (Gordon *et al.*, 1985; Zelner e Koren, 2013).

Embora haja uma pequena absorção do etanol através da mucosa oral, a maior parte da absorção acontece no estômago e principalmente no intestino delgado por meio de difusão passiva. Como as bebidas alcoólicas já são consumidas em soluções aquosas, a absorção começa a ocorrer imediatamente após a ingestão. O tempo desde o início do consumo de álcool até o pico de concentração sanguínea (C_{max}) é chamado de t_{max} e geralmente ocorre 60 minutos após parar de beber. Contudo, há grande variação individual podendo variar de 5 até 120 minutos. Fatores que influenciam a absorção incluem velocidade de esvaziamento gástrico, presença de conteúdo alimentar e concentração alcoólica da bebida (Jones, 2011).

A taxa de esvaziamento gástrico é muito importante no controle da absorção do álcool para a corrente sanguínea, tendo em vista que o intestino delgado é o local onde há maior absorção de etanol. Qualquer fator que altere a velocidade de esvaziamento gástrico irá alterar a taxa de absorção (Oneta *et al.*, 1998). Por exemplo, hipoglicemia e uso de drogas que aceleram o esvaziamento gástrico são fatores que aceleram a absorção do etanol, enquanto a hipovolemia e o consumo de bebidas com alto valor calórico são fatores que retardam a absorção (Jones, 2011).

A presença de comida no estômago influencia muito na taxa de absorção do etanol, e a quantidade de comida é mais relevante do que o tipo de comida (carboidrato, proteína, gordura etc). Quando há alimento no estômago ocorre redução da absorção e consequente da distribuição para a circulação sistêmica, além de retardo no esvaziamento gástrico. Assim, espera-se um menor pico de concentração sanguínea de álcool em indivíduos que bebem após se alimentar (Holford, 1987).

De modo geral, o volume ingerido não influencia na curva de concentração sanguínea de etanol, desde que a dose de álcool seja a mesma. Bebidas com alto teor alcoólico atingem C_{max} mais rápido. Porém, se as bebidas tiverem em sua composição constituintes diferentes,

como por exemplo, quantidades diferentes de carboidratos, isso irá influenciar na velocidade de esvaziamento gástrico e conseqüentemente na taxa de absorção (Jones, 2011).

Após absorção no trato gastrointestinal, o álcool segue o fluxo sanguíneo em direção ao fígado, coração direito, pulmões, coração esquerdo e finalmente atinge a circulação sistêmica. A distribuição nos órgãos depende da irrigação sanguínea, sendo que órgãos muito vascularizados, como encéfalo, atingem a mesma concentração de álcool encontrada no sangue mais rápido do que órgãos menos vascularizados, como ossos (Zelner e Koren, 2013). Outro fator importante para a distribuição do álcool no organismo é a quantidade de água presente nos tecidos e nos fluidos corporais. Quanto mais água um tecido possui maior a concentração de etanol em relação ao sangue, uma vez que a molécula passa por difusão passiva de locais com menor quantidade de água para locais com maior percentual de água. Então fluidos como urina, suor, saliva e líquido cerebrospinal (quase 100% água) apresentam concentração de etanol maior do que a concentração encontrada no sangue (uma vez que o sangue apresenta aproximadamente 80% de água em sua composição). A quantidade de água disponível no organismo também justifica o motivo pelo qual mulheres atingem maior concentração sanguínea do que homens, uma vez que pessoas do sexo feminino tendem a ser menores, mais leves e com percentual menor de água. Assim, um indivíduo com menor percentual de água nos tecidos irá apresentar maior concentração de etanol no sangue. De modo semelhante, idosos apresentam maior concentração sanguínea de etanol do que adultos jovens, porque a quantidade de água nos tecidos reduz com o avançar da idade (Jones, 2011).

A metabolização do etanol ocorre no fígado por meio de mecanismos oxidativos e não-oxidativos. As principais enzimas envolvidas no processo oxidativo são a álcool desidrogenase (ADH) presente no citoplasma, a aldeído desidrogenase (ALDH) presente na mitocôndria e as enzimas conhecidas como citocromo P450 2E1 (ou CYP2E1) presentes no retículo endoplasmático (Matsumoto e Fukui, 2002). Há ainda uma pequena participação de enzimas catalase na metabolização do etanol, porém sua importância é pequena frente às outras enzimas (Zelner e Koren, 2013).

A ADH e o citocromo P450 2E1 atuam na conversão do etanol em acetaldeído, metabólito altamente reativo, que rapidamente é convertido em acetato pela ALDH. O acetato é transportado para fora do fígado, entra no ciclo de Krebs e gera gás carbônico e água (Fig. 8). Esse processo todo de quebra do etanol gera energia (7,1 kcal/g) e precisa da participação da

coenzima dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD^+) que é reduzida a NADH, prejudicando os processos celulares que necessitam de NAD^+ (Jones, 2011).

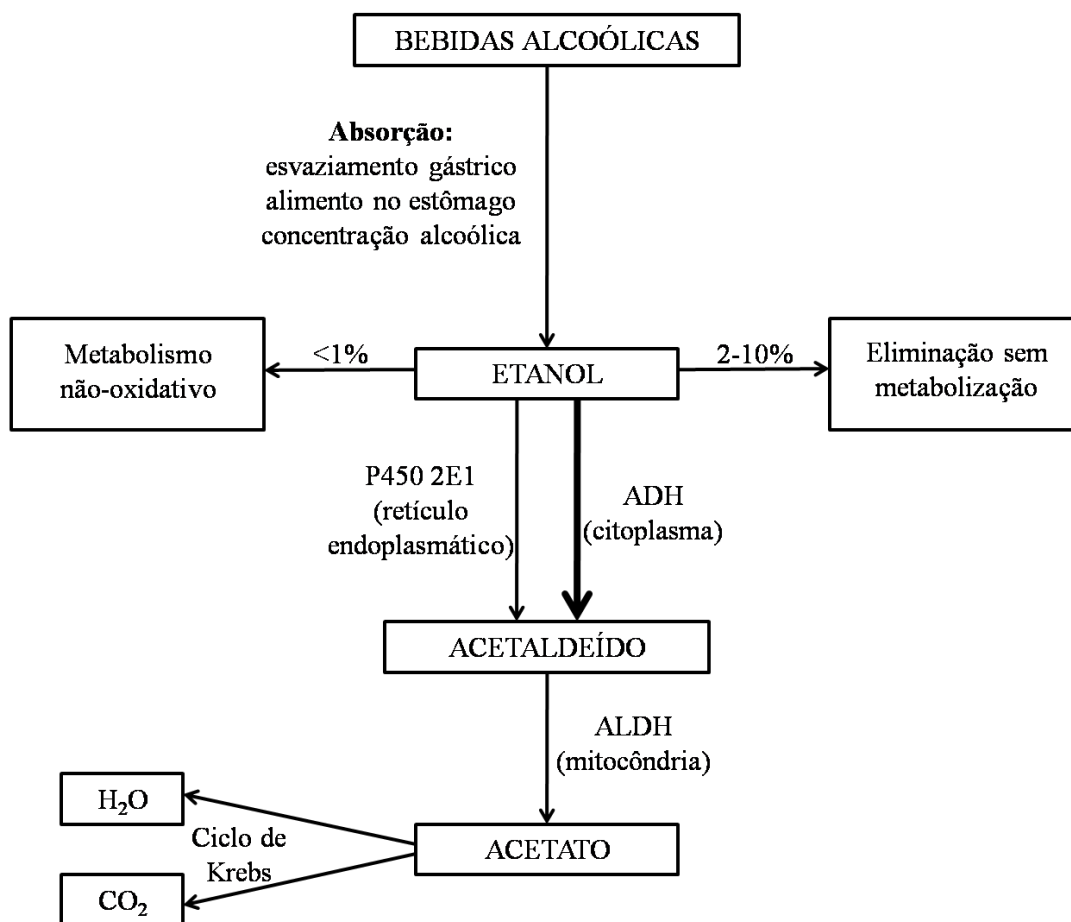


Figura 8. Esquema ilustrando a farmacocinética do etanol e as principais enzimas envolvidas no processo de metabolização. ADH: álcool desidrogenase. ALDH: aldeído desidrogenase. H_2O : água. CO_2 : gás carbônico. A seta mais espessa representa a maior participação de ADH na metabolização do etanol em relação às enzimas do citocromo P450 2E1. Adaptado de Jones (2011).

A enzima ADH é a principal responsável pela metabolização do etanol em acetaldeído. A família ADH possui diversas isoenzimas que variam entre as Classes I e VII, sendo a ADH-3 Classe I responsável por 96% do metabolismo e a ADH-1 Classe I responsável por 4%. A maior parte desse processo ocorre no fígado, e apenas cerca de 10% da metabolização ocorre em sítios extra hepáticos (Matsumoto e Fukui, 2002). ADH Classe IV é o único tipo que não

é encontrado no fígado, mas está presente na mucosa gástrica e parece estar envolvida na patogênica de cânceres gástricos induzidos pelo consumo crônico de etanol (Messner *et al.*, 2012).

As enzimas ADH Classe I presentes no fígado possuem constante de Michaelis (K_m) baixa, e isso significa que a concentração de substrato necessária para atingir metade da velocidade da reação é pequena. Ou seja, a enzima fica saturada rapidamente, logo após começar a beber, e a velocidade de reação atinge sua velocidade máxima (Jones, 2011).

As diferentes isoformas da enzima e os vários polimorfismos existentes resultam em variações individuais na metabolização do álcool de uma pessoa para outra e entre tecidos diferentes, justificando, ao menos em parte, porque há variação de toxicidade entre os indivíduos e o motivo de alguns órgãos serem mais suscetíveis aos danos do que outros (Zelner e Koren, 2013). Vale ressaltar que existem substâncias capazes de inibir a atividade de ADH, e conseqüentemente essas substâncias são capazes de prejudicar a metabolização do etanol, entre elas os pirazóis, a cimetidina e a ranitidina (Matsumoto e Fukui, 2002).

O sistema microsomal de oxidação do etanol tem como principal enzima o citocromo P450 2E1. Esse sistema ganha destaque durante o processo de metabolização do álcool em situações de alta concentração sanguínea de etanol, podendo chegar a ser responsável por até 40% da metabolização hepática. Ainda, a expressão de citocromo P450 2E1 aumenta com o uso crônico do etanol, justificando o motivo pelo qual alcoólatras apresentam taxa de eliminação aumentada em comparação a indivíduos que não fazem uso constante de álcool. A ativação do citocromo P450 2E1 causa estresse oxidativo e gera espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem iniciar a peroxidação de lipídeos. O estresse oxidativo causado pela ativação dessa enzima resulta em lesão celular hepática, e esse é um dos motivos pelo qual a ingestão de grande quantidade de etanol é tão prejudicial ao organismo (Matsumoto e Fukui, 2002).

Resumidamente, estresse oxidativo com pouca produção de ROS é benéfico porque estimula vias de reparo que limitam os danos teciduais. Porém, estresse oxidativo intenso, que resulta em grande quantidade de ROS, reduz a capacidade hepática de responder a insultos tóxicos, podendo levar à morte celular, e, ainda, pode alterar a expressão gênica por induzir hipometilação do DNA. Vale ressaltar que o fígado danificado é mais sensível ao estresse

oxidativo causado por fármacos e drogas, fazendo com que mesmo doses “seguras” causem estresse oxidativo exacerbado (Messner *et al.*, 2012).

A enzima ALDH é a principal responsável pela segunda parte da metabolização do etanol, representada pela conversão do acetaldeído em acetato (Zelzer e Koren, 2013). Em humanos, foram identificados doze genes ALDH (Messner *et al.*, 2012) que codificam dezenove enzimas (Koppaka *et al.*, 2012) presentes no citoplasma, nas mitocôndrias e no microsomo de diferentes tecidos, porém, a ALDH2 é a principal enzima mitocondrial responsável pela oxidação do acetaldeído no fígado e na mucosa do trato gastrointestinal (Messner *et al.*, 2012). Defeitos nessa enzima retardam a eliminação do acetaldeído, que é altamente tóxico (Zelzer e Koren, 2013), e o excesso de acetaldeído causa liberação de catecolaminas, dilatação de vasos sanguíneos do rosto, hiperemia na face e náusea. Ainda, o acúmulo de acetaldeído leva à formação de adutos proteicos que conseqüentemente inibem funções fisiológicas importantes para manutenção da homeostase (Messner *et al.*, 2012).

O metabolismo não-oxidativo representa uma pequena parte da via de metabolização do etanol e envolve a conjugação enzimática do etanol em substratos endógenos como ácidos graxos, fosfolípidios, sulfato e ácido glicurônico. Esses derivados não-oxidativos do metabolismo do etanol são denominados ésteres etílicos, fosfaditiletanol, sulfato de etila e etílico glucuronido. Dentre essas vias não-oxidativas, a mais estudada até o momento é a esterificação do etanol em ácidos graxos. Vale ressaltar que a via não-oxidativa de metabolização do etanol tem importância principalmente em situações de deficiência ou inibição do metabolismo oxidativo e pode ser responsável pelo aumento do peso corporal associado a deficiência crônica de ADH em alcoólatras. Ainda, a meia vida prolongada dos metabólitos não-oxidativos faz com que eles possam ser usados como biomarcadores do consumo de etanol (Zelner e Koren, 2013).

Há uma pequena porção do álcool ingerido que é metabolizado em primeira passagem diretamente no trato gastrointestinal, apesar de ainda ser controversa a real importância desse metabolismo dentro do quadro geral (Matsumoto e Fukui, 2002), pois é muito difícil distinguir o que é metabolismo hepático de primeira passagem do metabolismo gástrico de primeira passagem. Nesses casos, há remoção do álcool no estômago antes que ele alcance a circulação sistêmica e isso ocorre porque a mucosa gástrica tem atividade de ADH Classe IV, que possui K_m alto. Em alcoólatras e mulheres, a atividade de ADH gástrico é menor, tornando esses indivíduos mais vulneráveis aos efeitos negativos do álcool (Jones, 2011).

A maior parte do etanol ingerido é metabolizada conforme descrito anteriormente, mas uma pequena porção (2 a 10%) é eliminada intacta pela urina, suor e respiração. Há uma relação proporcional entre a quantidade ingerida e a quantidade excretada, sendo a quantidade eliminada maior à medida que a dose ingerida também aumenta (Jones, 2011).

A eliminação do etanol pela urina ocorre através da filtração glomerular, representando apenas 2% do álcool ingerido. A transpiração tem baixa capacidade de eliminar álcool, mas ainda assim é uma via interessante porque pode ser utilizada como uma maneira pouco invasiva para avaliar abstinência alcoólica em programas de reabilitação, por exemplo. Por fim, a quantidade de etanol eliminada pela respiração depende, além da concentração sanguínea de etanol, da taxa de ventilação pulmonar. Por exemplo, na concentração sanguínea de 1 g/L, o ar alveolar terá 0,5 mg/L de etanol. Assim, considerando a quantidade de ar que passa nos pulmões por minuto em um indivíduo saudável (252 L/h), há perda de cerca de 126 mg de etanol por hora via expiração, o que representa aproximadamente 2% do total eliminado (Holford, 1987; Jones, 2011).

2.1.1 *Farmacocinética do etanol durante a gestação*

Diversos fatores são capazes de alterar a farmacocinética do etanol, tais como gênero, hormônios esteróides sexuais, idade, hepatopatias e uso concomitante de outras drogas (Jones, 2011), fazendo com que o entendimento dessas alterações seja importante para elucidar o efeito tóxico do etanol em diferentes situações (Gordon *et al.*, 1985; Zelner e Koren, 2013). Um dos fatores fisiológicos que altera a farmacocinética de várias drogas é a gestação, uma vez que durante esse período ocorrem mudanças fisiológicas maternas e estabelecimento da unidade feto-placentária (Loebstein *et al.*, 1997). Estudos em humanos possuem limitações éticas e isso faz com que o modelo experimental animal seja adotado em grande parte das pesquisas atuais na área de toxicologia. Para tornar mais fácil a compreensão das alterações farmacocinéticas induzidas pela gestação, primeiro deve-se entender sobre a fisiologia normal da gestação e do desenvolvimento placentário (Rijk *et al.*, 2002), para depois ser capaz de extrapolar os dados obtidos no modelo animal para os humanos (Malassiné *et al.*, 2003).

O álcool é comumente consumido por mulheres e se consumido durante a gestação pode ter efeitos deletérios sobre o feto (Ramsay, 2010). A transferência de etanol pela placenta é livre,

o que significa que o álcool é encontrado no sangue fetal na mesma concentração que no sangue materno (Idänpään-Heikkilä *et al.*, 1972). Estima-se que 5 a 10% dos bebês com exposição *in utero* ao etanol desenvolvem lesões, mas esse valor provavelmente está subestimado (Ramsay, 2010) devido a dificuldade de diagnóstico clínico de muitas alterações (Fransquet *et al.*, 2016).

Sabe-se que o álcool é danoso ao feto ao longo de toda a gestação e a severidade dos danos depende do período gestacional, da dose consumida e da frequência de exposição (Ramsay, 2010), sendo mais comum ocorrer efeito teratogênico quando a exposição ocorre na fase embrionária (Mandal *et al.*, 2017). Ainda, o genoma dos pais contribui para a suscetibilidade dos fetos desenvolverem lesões. Por exemplo, mães que expressam maior quantidade de ADH apresentam menor concentração sanguínea de etanol e conseqüentemente a exposição fetal ao álcool é menor. Assim, exposições similares em indivíduos diferentes gera efeitos distintos devido a participação de componentes genéticos individuais, tanto fetais quanto maternos, na patogenia da FASD. Ainda, alterações epigenéticas induzidas no pai que consome álcool no período anterior à concepção são responsáveis por danos ao desenvolvimento fetal, apesar dos mecanismos exatos serem pouco conhecidos (Ramsay, 2010).

Apesar de todos os danos que o etanol pode causar na vida reprodutiva, existem poucos trabalhos abordando as implicações das mudanças fisiológicas e hormonais que ocorrem durante a gestação sobre a farmacocinética do etanol, ou sobre as mudanças no metabolismo materno induzidas pelo consumo crônico de etanol durante a gestação (Zelner e Koren, 2013). Os dados disponíveis até o momento serão abordados a seguir.

Qualquer mecanismo que altere a absorção gastrointestinal irá conseqüentemente interferir na absorção do etanol. Durante a gestação há aumento do nível de progesterona na corrente sanguínea e acredita-se que esse aumento resulte em redução da motilidade do trato gastrointestinal, com conseqüente aumento do tempo de esvaziamento gástrico e intestinal, resultando em absorção mais lenta do etanol (Lawson *et al.*, 1985). Ainda, grávidas secretam cerca de 40% menos ácido gástrico e apresentam produção de muco aumentada, o que gera aumento do pH estomacal e reduz a capacidade digestiva. Além disso, é comum a ocorrência de vômitos principalmente durante o primeiro trimestre e isso contribui para reduzir a concentração sanguínea das drogas (Loebstein *et al.*, 1997).

Mulheres possuem um pouco menos de água em sua composição corporal do que homens, o que faz com que o volume de distribuição do etanol seja menor e o pico de concentração sanguínea seja maior com a mesma dose alcoólica (Jones, 2011). Por outro lado, durante a gestação há expansão do volume plasmático em cerca de 50% (Soma-Pillay *et al.*, 2016), e isso altera o volume de distribuição do etanol resultando em menor pico de concentração sanguínea. Esse aumento do volume plasmático gera uma hipoalbuminemia relativa, enquanto o aumento de progesterona e outros hormônios satura os sítios de ligação das proteínas plasmáticas existentes, fazendo com que aumente a quantidade de droga livre na circulação. Porém, como o etanol não precisa de proteína carreadora, esse efeito não é relevante clinicamente (Loebstein *et al.*, 1997).

O efeito da gestação sobre a metabolização de drogas depende do tipo de droga. Em alguns casos, a progesterona estimula a atividade de enzimas microsossomais e isso resulta em aumento do metabolismo hepático, enquanto em outras situações tanto a progesterona quanto o estradiol podem reduzir a eliminação por inibição competitiva de enzimas (Loebstein *et al.*, 1997). Poucos estudos avaliaram a influência da gestação no metabolismo do álcool (Zelner e Koren, 2013), mas uma pesquisa realizada em ratas indica que aparentemente a metabolização é mais rápida e esse aumento não está relacionado à atividade da ADH hepática e nem do citocromo P450 2E1, sendo que esse último na verdade encontra-se diminuído. Porém, observa-se aumento da quantidade de mitocôndrias no fígado de gestantes e isso possivelmente aumenta a quantidade e conseqüentemente a atividade de ALDH. Além disso, é observado aumento de atividade de ADH4 gástrico, o que sugere aumento de metabolismo de primeira passagem. Esse aumento da metabolização gera aumento da taxa de eliminação, que resulta em menor tempo de exposição fetal ao etanol, fazendo com que esse talvez seja um mecanismo que justifique porque os ratos apresentam lesões menos severas de FASD do que humanos (Badger *et al.*, 2005).

Apesar da gestação aumentar o fluxo sanguíneo renal e conseqüentemente aumentar a taxa de filtração glomerular, o aumento da eliminação renal não é clinicamente relevante, então assume-se que a gestação não altera a eliminação de drogas por essa via (Loebstein *et al.*, 1997).

2.1.2 Farmacocinética do etanol no feto

A necessidade de ligação a proteínas plasmáticas é um fator crucial para determinar quais drogas possuem maior potencial para alcançar o feto, pois apenas drogas livres atravessam a barreira placentária (Loebstein *et al.*, 1997). Essa é uma informação importante, pois o etanol não necessita de carreador, apresenta-se livre na circulação e atravessa rapidamente a placenta, quando então atinge o compartimento fetal, resultando em concentração sanguínea fetal semelhante à concentração sanguínea materna (Zelner e Koren, 2013). Uma prova da transferência de etanol da mãe para o feto é a presença de álcool no líquido amniótico. Nava-Ocampo *et al.* (2004) demonstraram que, aos quatro meses de gestação, a quantidade de etanol transferida para o líquido amniótico é 60% menor do que a quantidade presente na circulação sanguínea materna, e essa concentração máxima demora mais para acontecer, porém, o álcool fica mais tempo no líquido amniótico do que no sangue materno, pois sua eliminação é complexa e depende de mecanismos inerentes à mãe. Dessa forma, a placenta atua como um reservatório de etanol prolongando seu contato com o feto.

Com relação ao sangue fetal, Idänpään-Heikkilä *et al.* (1972) verificaram que no momento do parto, as concentrações de álcool no sangue materno e no sangue fetal são praticamente iguais, e quatro horas após o nascimento, a taxa de eliminação do álcool no recém-nascido é cerca de metade da taxa de eliminação da mãe. Os autores acreditam que o retardo na eliminação ocorra em consequência da menor atividade enzimática associada à maior quantidade de água nos tecidos do neonato. Assim, não há dúvidas da transferência de etanol do sangue materno para os fluidos fetais (Idänpään-Heikkilä *et al.*, 1972; Nava-Ocampo *et al.*, 2004).

Em humanos, a capacidade fetal de metabolizar o álcool é limitada e varia durante o desenvolvimento. No primeiro trimestre da gestação humana, a atividade da ADH é muito baixa, mas aumenta de forma progressiva à medida que a gestação avança. Ainda assim, no segundo trimestre da gestação, a atividade enzimática é mínima e não é fisiologicamente relevante (Nava-Ocampo *et al.*, 2004). Mesmo dois meses após o nascimento, a atividade da ADH do neonato é apenas 25% da capacidade de um adulto, fazendo com que a concentração sanguínea seja maior devido a eliminação mais lenta (Haastrup *et al.*, 2014). Com relação a atividade do citocromo P450 2E1, há grande variação individual, mas em alguns fetos é detectável com 16 semanas de gestação. Essa variação individual poderia ser uma explicação para alguns indivíduos serem mais suscetíveis ao desenvolvimento de FASD do que outros.

Ao nascimento, a taxa de eliminação do etanol no neonato é cerca da metade da capacidade de eliminação no adulto (Zelner e Koren, 2013).

De modo semelhante ao que é observado em humanos, os fetos de ratos também possuem capacidade de metabolização reduzida, e a atividade de ADH só é detectável no final da gestação bem próximo ao parto. Ao nascimento, a atividade da ADH representa cerca de 20% da atividade de um adulto (Través *et al.*, 1995).

2.1.3 *Farmacocinética do etanol durante a lactação*

Ao final da gestação, há aumento do volume e da atividade secretória da glândula mamária, que apresenta-se completamente ativa no dia do parto. Em ratas, ocorre aumento da atividade glandular até o dia 11 de lactação, quando então começa a declinar, e no dia 22 após o parto a glândula apresenta características de inatividade devido ao desmame dos filhotes. Jones e Stewart (1984) demonstraram que o consumo materno de etanol em modelo murino retarda a maturação da glândula mamária, evidenciado por lóbulos pouco delimitados, ácinos pequenos e secreção com aspecto granular no dia do parto. Porém, o tecido glandular aumenta sua atividade durante a lactação e no dia 22 após o parto, a mama apresenta características de plena atividade, que se mantém até o dia 72 após o parto. Apesar das alterações histológicas do tecido mamário, não houve diferença no crescimento dos filhotes durante o período analisado. Isso indica que o etanol afeta o desenvolvimento normal da glândula mamária durante a gestação e a lactação, sem que isso tenha efeito sobre o desenvolvimento dos filhotes.

Em humanos, o etanol passa livremente para o leite materno e é encontrado na mesma concentração do sangue da mãe (Kesäniemi, 1974). Diferentemente, em modelo murino a quantidade de álcool no leite depende da dose e também do tempo decorrido entre a ingestão e a coleta da amostra. Assim, a concentração de etanol no leite é maior do que no sangue materno poucas horas após a exposição aguda ao álcool, mas depois reduz para cerca de 65% da concentração sanguínea (Guerra e Sanchis, 1986). Alguns estudos avaliaram a possibilidade da atividade enzimática no próprio tecido mamário ser responsável pela redução da transferência de álcool do sangue materno para o leite, tendo em vista que há expressão de ADH na mama. Contudo, a metabolização por esse tecido é mínima (Guerra e Sanchis, 1986) e, na verdade, observa-se efeito contrário porque concentrações alcoólicas

acima de 10mM inibem a atividade enzimática de ADH do tecido mamário, sendo um indicativo de que o papel dessa enzima na glândula mamária provavelmente está limitado à metabolização de baixas quantidades de álcool produzidas apenas em processos fisiológicas, sem atividade em situações patológicas (Triano *et al.*, 2003).

Com relação ao metabólito acetaldeído, a concentração no leite de ratas é sempre menor do que no sangue, independente se a exposição é aguda ou crônica, atingindo proporções de 35-45% da quantidade encontrada na circulação (Guerri e Sanchis, 1986). Um mecanismo proposto para a transferência de acetaldeído do sangue para o leite é a redução da atividade enzimática de ALDH durante a lactação associada a maior velocidade de oxidação do etanol, resultando em acúmulo do metabólito. Porém, a concentração fetal de acetaldeído é menor do que a concentração materna, indicando que há algum gradiente envolvido nas trocas entre sangue materno e fetal. Ainda assim, não é possível dizer que mesmo essa quantidade relativamente baixa de acetaldeído não seja capaz de gerar toxicidade (Gordon *et al.*, 1985). Por outro lado, em humanos não há transferência de acetaldeído para o leite e isso sugere que a mama consegue eliminar esse metabólito altamente reativo, mas não se sabe como isso é realizado (Kesäniemi, 1974).

Aparentemente, a disponibilidade sistêmica do etanol durante a lactação é menor (Pepino *et al.*, 2007) e isso pode ser em consequência de uma menor C_{max} de etanol no sangue materno (Haastrup *et al.*, 2014), associada ao retardo da absorção devido a redução da motilidade gastrointestinal (Pepino *et al.*, 2007). A taxa de eliminação do etanol no leite materno segue a mesma proporção da eliminação no sangue, e isso indica que o leite não tem capacidade de armazenar etanol (Lawton, 1985). Porém, ainda existem controvérsias devido a distinção de resultados entre os trabalhos publicados (Pepino *et al.*, 2007; Haastrup *et al.*, 2014) e isso evidencia a necessidade de mais estudos sobre a forma como a lactação e todos os processos fisiológicos que acontecem durante esse período influenciam a farmacocinética do etanol (Pepino *et al.*, 2007). Ainda assim, apesar da quantidade de etanol ingerida pelo filho através do leite ser pequena, os efeitos da exposição contínua são potencialmente danosos ao desenvolvimento (Haastrup *et al.*, 2014).

Não há dúvidas de que a amamentação é extremamente benéfica ao bebê e à mãe, sendo associada ao menor risco de desenvolvimento de doenças no filho e menor risco de câncer de mama na mãe. Acredita-se que esses benefícios sejam resultado de alterações epigenéticas, apesar dos mecanismos exatos serem pouco conhecidos (Verduci *et al.*, 2014). No entanto, a

amamentação também pode trazer prejuízos ao lactente por vias epigenéticas, uma vez que durante a lactação os órgãos e os tecidos do recém-nascido ainda estão em desenvolvimento, fazendo com que esse período tenha potencial para ser tão vulnerável aos efeitos nocivos do etanol quanto a gestação (Guerra e Sanchis, 1986). Nesse sentido, Fransquet *et al.* (2016) relataram que bebês alimentados com leite de mães que consomem pequenas a moderadas quantidades de álcool durante a lactação apresentam aumento do padrão de metilação do gene DRD4, responsável pela expressão de um dos principais receptores da dopamina. Apesar do aumento da metilação do gene não ter causado alteração clínica evidente nos neonatos, os autores sugerem que o consumo leve ou moderado de álcool durante a lactação, provavelmente é capaz de gerar danos que são difíceis de serem diagnosticados ao nascimento.

3. SÍNDROME DO ALCOOLISMO FETAL

O álcool é uma substância comprovadamente capaz de gerar danos a diferentes órgãos, entre eles os ossos. Em adultos, o consumo frequente de bebidas alcoólicas é apontado como causa de osteoporose (Guo *et al.*, 2013) e de retardo na consolidação de fraturas (Roper *et al.*, 2016), por induzir menor diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos e antagonizar a via Wnt, necessária para a diferenciação das linhagens osteoprogenitoras. Além disso, a ingestão de etanol é apontada como fator predisponente para o desenvolvimento de osteoartrite, por estimular vias catabólicas que aumentam a produção de enzimas que degradam a matriz da cartilagem articular e por reduzir a expressão proteica de mediadores anti-inflamatórios nas articulações (Kc *et al.*, 2015). Em crianças, a exposição pré-natal ao etanol resulta em um espectro de desordens alcoólicas fetais (*fetal alcohol spectrum disorders* – FASD) que se caracteriza por anormalidades faciais, retardo do crescimento e disfunções estruturais ou funcionais do sistema nervoso central (Dörrie *et al.*, 2014).

Mesmo com todos esses riscos reconhecidos, a ingestão de etanol por mulheres gestantes é bastante comum (Dörrie *et al.*, 2014) e estima-se que, no Brasil, 1500 a 3000 novos casos de FASD sejam diagnosticados a cada ano (Centro de Informação Sobre Saúde e Etanol, 2017). Uma limitação dos estudos em humanos é a dificuldade em afirmar que as alterações observadas nos indivíduos que sofreram a exposição pré-natal ao etanol sejam decorrentes do

etanol, tendo em vista que fatores ambientais e o uso concomitante de outras drogas é frequente.

Percebe-se que grande parte das mulheres que consomem etanol durante a gestação também são tabagistas e o cigarro por si só já seria capaz de causar danos ao feto (Dörrie *et al.*, 2014). Assim, mesmo que o alcoolismo não ocorra espontaneamente em animais, trata-se de um problema de grande impacto social em humanos, sendo necessária a utilização de um modelo animal experimental, a fim de excluir outros fatores, comumente associados ao alcoolismo, a exemplo do tabagismo, permitindo esclarecer os mecanismos envolvidos na toxicidade do uso exclusivo de etanol (Maran *et al.*, 2001).

Vale ressaltar que os prejuízos causados pela PEE acompanharão o indivíduo ao longo da vida, possivelmente devido ao envolvimento de vias epigenéticas na patogênese das lesões causadas pelo etanol (Boschen *et al.*, 2018). Isso aumenta as razões pelas quais a identificação dos mecanismos exatos envolvidos no FASD se torna tão importante (Ramadoss e Magness, 2012). O etanol causa alterações epigenéticas por mecanismos como aumento da relação NADH/NAD⁺ e formação de espécies reativas de oxigênio (Zakhari, 2013). Mas, o estudo da epigenética na patogenia de FASD ainda é um campo emergente (Lussier *et al.*, 2017). Não há atualmente nenhuma terapia que possa reverter os danos causados pela PEE e identificar precocemente os indivíduos acometidos é um grande desafio (Lussier *et al.*, 2017). Além disso, o desenvolvimento neurológico tem sido o foco da maior parte dos trabalhos sobre PEE e FASD (Parkington *et al.*, 2014), havendo necessidade de expandir os conhecimentos sobre a patogênese das lesões em outros órgãos, a exemplo do sistema esquelético (Ramadoss e Magness, 2012).

Em crianças, a PEE causa anormalidades faciais, retardo do crescimento e disfunções estruturais e funcionais do sistema nervoso central (Dörrie *et al.*, 2014). A metabolização do etanol aumenta o estresse oxidativo no organismo (Das e Vasudevan, 2007), e existem evidências de que esse é um dos mecanismos pelos quais o consumo materno de álcool prejudica o desenvolvimento neurológico fetal (Brocardo *et al.*, 2011), mesmo em dose não teratogênica (Miller *et al.*, 2013).

Mas, há também alterações placentárias importantes que podem justificar, pelo menos em parte algumas das alterações evidenciadas na FASD. Ao considerar o efeito do etanol sobre o perfil angiogênico da placenta, Ventureira *et al.* (2015) revelaram que a exposição

perigestacional ao álcool inibe a vascularização inicial da decídua de ratas por desregular o sistema VEGF/Kdr, gerando redução na expressão de VEGF com restrição do crescimento feto-placentário. Além disso, Lazic *et al.* (2011) concluíram que fetos de ovelhas que consumiram etanol durante a gestação apresentam redução na expressão de VEGF, Flt-1, Flk-1, HIF-1 α e HIF-2 α no tecido pulmonar, o que resultou em retardo do desenvolvimento dos pulmões, ao nascimento. No entanto, Gu *et al.* (2001) observaram aumento da expressão de VEGF nas culturas de células da artéria coronária de cães adultos tratadas com etanol. Os autores levantam a possibilidade de a hipóxia induzida pelo etanol ser a via de sinalização que direciona o aumento de VEGF.

Apesar das alterações ósseas também fazerem parte do espectro de desordens alcoólicas fetais, há poucos estudos sobre o tema, principalmente sobre a patogênese dessas alterações. Sabe-se que a exposição pré-natal ao etanol é capaz de alterar a estrutura da cartilagem de crescimento da tíbia de ratos, uma vez que ocorre redução na espessura da zona de repouso e aumento da espessura da zona hipertrófica, resultando em ossos mais curtos (Snow e Keiver, 2007). Esses dados sugerem que a PEE afeta os estágios tardios do crescimento ósseo. Mas, Day *et al.* (2002) constataram que o retardo do crescimento ósseo se mantém ao longo da vida, sendo observado em crianças e adolescentes até 14 anos após o nascimento, especialmente se a mãe ingeriu bebida alcoólica no primeiro trimestre de gestação.

Em outro estudo, ratos com PEE apresentam fêmur mais curto do que o normal, porém, esse resultado foi atribuído ao aumento nos níveis de glicocorticoides maternos e não ao efeito direto do etanol sobre o feto (Pan *et al.*, 2016). Além disso, utilizando modelo murino, constatou-se que o etanol afeta o desenvolvimento ósseo de formas diferentes, sendo a ulna, o rádio, a tíbia e o sacro os ossos mais sensíveis, o que sugere que o efeito tóxico do etanol não seja homogêneo no organismo. Apesar de se saber que o etanol altera as cartilagens de crescimento, seus efeitos sobre os condrócitos, bem como a patogênese das alterações ósseas causadas por ele não são conhecidos. Em ratos adultos, ao considerar os efeitos do consumo de álcool sobre os constituintes da matriz extracelular de ossos, Iwaniec e Turner (2013) verificaram que não houve alteração nos níveis de mRNA de colágeno I. Mas a expressão de colágeno, Sox9, agrecan e outros fatores de transcrição, importantes durante a formação e o crescimento endocondral não têm sido investigadas em culturas de condrócitos extraídos das cartilagens de crescimento e expostos ao etanol *in vitro*, um dos objetivos deste estudo, a fim

de elucidar os mecanismos pelos quais o etanol atua diretamente sobre os condrócitos, sem a interferência das vias de metabolização e de outros fatores.

4. EFEITOS DO ETANOL SOBRE COMPONENTES ÓSSEOS

Há muito tempo é reconhecido que o consumo frequente de álcool causa alterações ósseas, entretanto, os mecanismos responsáveis pelos danos observados permanecem pouco esclarecidos. Ainda assim, é consenso que a ingestão de etanol resulta em redução da massa óssea, fazendo com que os indivíduos apresentem quadro de osteopenia (Maran *et al.*, 2001). Apesar dos esforços para esclarecer os eventos envolvidos na toxicidade do etanol, os estudos são dificultados devido à impossibilidade de isolar apenas os efeitos tóxicos do etanol em humanos, tendo em vista a grande quantidade de fatores intrínsecos e extrínsecos que podem atuar de modo concomitante potencializando ou amenizando as alterações induzidas pelo álcool (Di Rocco *et al.*, 2019). Assim, os estudos *in vitro* surgem como uma alternativa que possibilita a avaliação isolada dos efeitos diretos do etanol sobre as células e podem fornecer respostas importantes para entender o que ocorre no organismo (Ramadoss e Magness, 2012).

O tecido ósseo é formado por três tipos celulares: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos são as células responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz extracelular, enquanto os osteócitos são células que participam da síntese de moléculas importantes para a manutenção da matriz óssea. Por outro lado, os osteoclastos são as células que realizam a reabsorção do osso para que seja substituído pelo tecido neoformado. Assim, pode-se afirmar que o osso é uma estrutura metabolicamente ativa que precisa de constante equilíbrio entre formação e reabsorção para manutenção da viabilidade e funcionalidade (Junqueira e Carneiro, 2013), de modo que não ocorra aumento e nem diminuição do tecido ósseo além dos parâmetros fisiológicos (Mackie *et al.*, 2011). Assim, considerando a observação clínica de que o consumo de álcool causa redução da massa óssea, é natural que essas células tenham sido alvo de grande parte dos estudos *in vitro* sobre os efeitos tóxicos do etanol (Friday e Howard, 1991; Cheung *et al.*, 1995; Maran *et al.*, 2001).

Para avaliar os efeitos diretos do etanol sobre formação e reabsorção óssea, Farley *et al.* (1985) cultivaram células extraídas da calvária de frangos em diferentes concentrações de etanol e observaram que a exposição ao meio de cultura contendo álcool resultou em aumento da proliferação celular sem, no entanto, aumentar o número de células maduras; aumento da

reabsorção óssea; e redução da responsividade das células à agentes que estimulam a formação óssea. Para os autores desse trabalho as alterações observadas poderiam estar relacionadas com alterações na fluidez de membrana celular, porém, não foi realizado nenhum ensaio específico para testar tal possibilidade. Alguns anos mais tarde, Cheung *et al.* (1995) cultivaram células extraídas de ossos longos de frangos em diferentes concentrações alcoólicas e observaram aumento dose-dependente da reabsorção osteoclástica; com isso, os autores presumiram que talvez o etanol afete precursores osteoclásticos, induzindo aumento da reabsorção.

Ao considerar modelo experimental humano, Friday e Howard (1991) cultivaram células ósseas humanas provenientes de pacientes cirúrgicos com quadro de doença articular degenerativa, sem histórico de abuso de etanol, em diferentes concentrações alcoólicas. O resultado encontrado foi uma inibição dose-dependente da proliferação e da função celulares, constatadas através de redução na síntese de DNA e redução da atividade de fosfatase alcalina. Dessa forma, os autores concluíram que o etanol causa efeitos diretos sobre as células ósseas que resultam em redução da formação óssea, justificando assim o quadro de osteopenia que ocorre clinicamente em alcoólatras. Por outro lado, cultivo de osteoblastos humanos de linhagem fetal imortalizada submetidos a meios alcoólicos resultou em conclusões distintas, uma vez que nesse trabalho não foi observada alteração no crescimento celular. Porém, houve redução da atividade de FA e da expressão de Coll de maneira dose-dependente. Dessa forma, os autores constataram que o álcool afeta indicadores de diferenciação osteoblástica sem afetar o número de células, diferente do que é observado *in vivo* (Maran *et al.*, 2001). Outra abordagem já realizada foi avaliação do efeito do etanol sobre linhagem de osteossarcoma humano. Observou-se que doses baixas de etanol inicialmente aumentaram o número de células da cultura, mas após 72 horas houve redução da quantidade de células em todas as concentrações estudadas. Não foi possível determinar se esse efeito ocorreu devido à menor taxa de mitose ou aumento de morte celular. Além disso, o etanol resultou em aumento inicial da atividade de fosfatase alcalina, mas redução da atividade após 72 horas de cultivo. Outro achado foi o aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase. Em conjunto, esses dados levaram os autores a concluir que doses baixas de etanol podem até não causar danos após exposição inicial, mas se aumentar o tempo de exposição os efeitos passam a ser perceptíveis em qualquer concentração. Esse achado destaca o fato de que o tempo de exposição ao álcool influencia no efeito sobre o organismo (Vignesh *et al.*, 2006).

Além dos osteoblastos diferenciados, os precursores osteoblásticos também foram alvo de estudos, principalmente células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO). Giuliani *et al.* (1999) realizaram cultivo de CTM-MO extraídas tanto de camundongos quanto de humanos, em diferentes concentrações de álcool, e notaram que o etanol reduz a formação de unidades formadoras de colônias de células fibroblásticas (CFU-F), que são precursores de linhagens ósseas. Ainda, os autores cultivaram CTM-MO de humanos com e sem histórico de alcoolismo e verificaram que nos alcoólatras a formação de CFU-F é menor. Com isso, sugere-se que o etanol exerce efeito direto sobre a osteoblastogênese inicial por reduzir a quantidade de precursores provenientes da medula óssea. De modo semelhante, Gong e Wezeman (2004) cultivaram CTM-MO humanas em meios de diferenciação osteogênica contendo diferentes concentrações alcoólicas e o resultado foi menor proliferação e aumento de morte celular, ambos dose-dependente. Ainda, nesse trabalho foi avaliada a expressão de Runx2, mas esse fator não foi alterado pela presença de etanol no meio; e a atividade de fosfatase alcalina apresentou-se reduzida. Os autores do trabalho acreditam que o etanol não altera eventos necessários para o início da diferenciação osteogênica e provavelmente atua em etapas finais do processo, afetando a produção de MEC calcificada.

Além da osteopenia observada em alcoólatras, a ingestão frequente de álcool está relacionada com suscetibilidade ao desenvolvimento de outras lesões no sistema musculoesquelético, tal como a osteoartrite (Ni *et al.*, 2015). Assim, o interesse dos estudos se estendeu do tecido ósseo para outros tecidos que formam o esqueleto, como é o caso da cartilagem. Em estudos com condrócitos, Kulyk e Hoffman (1996) cultivaram células indiferenciadas, em sistema de monocamada, provenientes do broto da asa de embriões de galinhas e observaram que a administração de álcool no meio de cultura potencializa a capacidade de diferenciação condrogênica dessas células, uma vez que foram observados aumento da expressão de Col2 e de agregan, além de maior formação de cartilagem induzida pelo álcool. Entretanto, os autores não esclareceram se o álcool atuou sobre as células precursoras indiferenciadas potencializando a diferenciação condrogênica ou sobre células já diferenciadas potencializando a síntese dos componentes da MEC. Por outro lado, recentemente Qin *et al.* (2018) estabeleceram um modelo *in vitro* de cultivo de condrócitos humanos em monocamada para avaliação de necrose da cabeça do fêmur induzida por álcool no qual foi possível constatar que o etanol reduz a proliferação e a viabilidade celular, enquanto aumenta a diferenciação osteogênica da cartilagem articular. Tais dados foram revelados através da redução da expressão de Col2, agregan e Sox9, e aumento de Runx2 e atividade de FA. Esses

resultados sugerem que o álcool acelera a degradação da cartilagem por induzir hipertrofia e ossificação. Vale ressaltar que os trabalhos envolvendo o tecido cartilaginoso são bem mais escassos do que aqueles envolvendo osteoblastos e as informações disponíveis apresentam resultados contraditórios que carecem de maiores dados para comprovar ou refutar possíveis mecanismos envolvidos na toxicidade do etanol sobre essas células.

Os resultados divergentes entre os estudos na área evidenciam que há muito tempo se sabe que o álcool afeta o tecido ósseo, mas descobrir os mecanismos é uma tarefa desafiadora (Maran *et al.*, 2001). Entre as dificuldades destacam-se a impossibilidade de isolar fatores e as questões éticas envolvendo estudos em humanos. Outro entrave encontra-se no fato de que estudos *in vivo* são capazes de demonstrar os efeitos do etanol sobre os ossos, mas não distinguem o efeito tóxico direto dos mecanismos indiretos. Dessa forma, o modelo experimental torna-se necessário (Ramadoss e Magness, 2012), mas deve-se sempre levar em consideração as distinções entre os modelos experimentais, a possibilidade de o álcool ser um agente que causa múltiplos danos simultâneos que resultam na alteração morfológica e funcional final, e variações individuais de suscetibilidade ou resistência ao álcool (Cheung *et al.*, 1995; Maran *et al.*, 2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animal da UFMG (CEUA/UFMG), sob o protocolo nº119/2016.

Isolamento e cultivo de condrócitos

Foram utilizados 10 filhotes de ratos neonatos Wistar com três dias de idade. Os animais foram submetidos à eutanásia utilizando sobredose (150 mg/kg) de Tiopental (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brasil), por via intraperitoneal. Foi realizada antisepsia com álcool 70% e povidona-iodo na pele dos membros posteriores e em seguida os fêmures foram dissecados dos tecidos musculares e conectivos com instrumental estéril, dentro de fluxo laminar e lavados em tampão fosfato salino (PBS) 0,15M estéril.

Secções de cartilagem foram imediatamente colhidas das extremidades distal e proximal do fêmur. Para o isolamento dos condrócitos, os fragmentos de cartilagem foram lavados, no fluxo laminar com PBS 0,15M. Posteriormente, a cartilagem foi digerida por um período de 18 horas por meio de incubação com colagenase tipo 1 a 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) acrescida de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* baixa glicose (DMEM-Low glicose) (Gibco, Invitrogen, NY, USA) com 5% de soro fetal bovino (Invitrogen, NY, USA) (Chen *et al.*, 2010; Hellingman *et al.*, 2011).

Após 12 horas, as suspensões de condrócitos foram centrifugadas por 10 minutos a 1400 g e lavadas com PBS a 0,15M. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas e cultivadas em garrafas T25 com meio condrogênico, constituído por DMEM baixa glicose, acrescido de 1% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen, NY, USA) e suplementado com ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), insulina (Biobras, SP, Brasil), transferrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, as culturas foram lavadas com PBS 0,15M para remoção das células não aderidas.

Após a segunda passagem, dependendo do tipo de ensaio, as células foram transferidas para placas de 24 poços (2x10⁴ células/poço), 6 poços (1x10⁵ células/poço), garrafas T25 (1x10⁶

células/garrafa) ou para tubos cônicos de plástico com capacidade para 15 mL (1×10^6 células/tubo), onde foram cultivadas em sistema bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). Após dois dias de cultura, o meio condrogênico foi substituído por meio condrogênico contendo diferentes concentrações de etanol (Merck, Millipore Corporation, Alemanha): 0,05%; 0,25%; 0,5%, semelhante ao protocolo estabelecido por Maran *et al.* (2001), mimetizando o consumo leve, moderado e intenso de etanol, respectivamente. Dessa forma, foram constituídos três grupos tratados com etanol e um grupo controle cultivado em meio condrogênico idêntico ao dos grupos tratados, porém isento de etanol. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana.

Ensaio do MTT

Ao término de 7, 14 e 21 dias de cultivo, os condrócitos de todos os grupos, sob cultura 2D em placas de 24 poços, foram submetidos ao teste de conversão do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) em cristais de formazan. Esse é um método quantitativo de avaliação da atividade da enzima succinato desidrogenase em células viáveis, onde a enzima presente na mitocôndria converte o substrato MTT em cristais de formazan (Mosmann, 1983). O meio foi substituído por 210 μ L de meio com soro fetal bovino 1% em cada poço e 170 μ L de MTT (5mg/mL). A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio e então foi realizado acréscimo de 210 μ L de SDS-10% HCl que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as amostras foram analisadas na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm. A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo experimental.

Atividade da fosfatase alcalina

Ao término de 7, 14 e 21 dias de cultivo, os condrócitos de todos os grupos, sob cultura 2D em placas de 24 poços, foram lavadas com PBS 0,15M e em cada poço foram acrescentados 200 μ L de solução de BCIP/NBT (1 mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4 mL de NBT {nitro- blue tetrazolium chloride} e 3,3 mL de BCIP {5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt}). As amostras permaneceram 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em

seguida, adicionou-se 210 μ L de solução detergente SDS 10% HCl para incubação *overnight*. Posteriormente, as amostras foram analisadas na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm. A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo experimental.

Análise histoquímica e morfométrica dos *pellets* de condrócitos

Ao término de 21 dias de cultivo, os *pellets* de condrócitos de todos os grupos, sob cultura 3D em tubos cônicos de 15 mL, foram lavados com PBS 0,15M e fixados com paraformaldeído 4%. Em seguida, os *pellets* foram processados para inclusão em parafina (Assis *et al.*, 2018) e posteriormente seccionados em micrótomo a 5 μ m. As secções histológicas foram colocadas sob lâminas de vidro gelatinizadas (Bloise *et al.*, 2009) e coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para determinação da porcentagem de áreas de matriz cartilaginosa PAS+. Ainda, foi determinada a porcentagem de citoplasma e de núcleo de condrócitos e de áreas de cartilagem bem diferenciada, caracterizada por ninhos de condrócitos alojados dentro de lacunas e envoltos por grande quantidade de matriz, semelhante ao tecido da cartilagem articular. Essas análises foram realizadas com auxílio de uma gráticula com 121 pontos acoplada a ocular de um microscópio óptico, em aumento de 40x. Foi utilizada a média de dois campos distintos para obtenção dos valores finais para cada *pellet*. Também foi analisado o tamanho dos condrócitos pela medida do diâmetro médio. Imagens de cinco campos das secções histológicas de cada *pellet*, em objetiva de 100x, foram capturadas com auxílio de uma câmera fotográfica Leica ICC50, acoplada ao microscópio Leica DM500. As imagens foram analisadas em software LAS EZ 3.4. Foram medidos dois diâmetros de cada célula, de um total de 20 células por *pellet*. Os valores do diâmetro médio foram dados em micrômetros. Todas as variáveis morfométricas foram avaliadas em seis *pellets* por grupo.

Avaliação da expressão relativa dos transcritos gênicos de agrecan, Sox9 e colágeno II por RT-qPCR

A PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foi realizada nas culturas de condrócitos de todos os grupos, aos 21 dias de cultivo em garrafas T25. Foi realizada a avaliação quantitativa da expressão de agrecan, Sox9 e de colágeno II.

Resumidamente, 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III Platinum Two-Step qPCR kit com SYBR Green (Invitrogen, NY, USA). A RT-qPCR foi realizada em um termociclador SmartCycler II (Cepheid, Carpinteria). A primeira etapa de amplificação foi iniciada com a transcrição reversa por 120 segundos a 50°C, seguido por PCR com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Ao final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores C_T . A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde os valores das amostras foram calculados em relação a valores de GAPDH C_T . Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 2). A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplica para cada grupo experimental.

Tabela 2. Lista de transcritos gênicos e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-qPCR.

Gene	Iniciadores (sequência 5'-3')	Nº de acesso
GAPDH	forward: CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_002046
Agrecan	forward: CACACGCTACACACTGGACT reverse: TCACACTGGTGGGAAGCCATC	NM_022190.1
Colágeno II	forward: GTTCACGTACACTGCCCTGA reverse: AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	NM_012929.1
Sox9	forward: CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC reverse: GTTCTTCACCGACTTCCTCCG	NW_0473432

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste estatístico t de *Student* utilizando o pacote computacional GraphPad®. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Ensaio do MTT e da atividade da fosfatase alcalina

Não houve diferença significativa entre as médias de nenhum dos grupos tratados com etanol e o grupo controle com relação à atividade enzimática mitocondrial avaliada pelo ensaio do MTT (Fig. 9). No entanto, embora a adição de etanol na concentração de 0,05% não tenha alterado significativamente a atividade da fosfatase alcalina em nenhum dos tempos de cultivo, os condrócitos cultivados em meios contendo 0,25% ou 0,5% de etanol apresentaram redução significativa da atividade de FA aos 21 dias (Fig. 10).

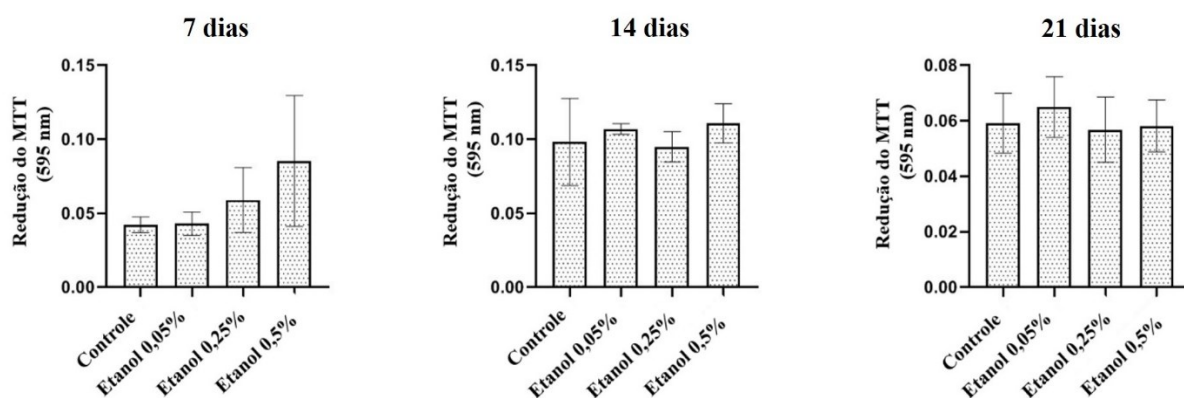


Figura 9. Conversão de MTT em formazan (média \pm desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 7, 14 e 21 dias de cultivo.

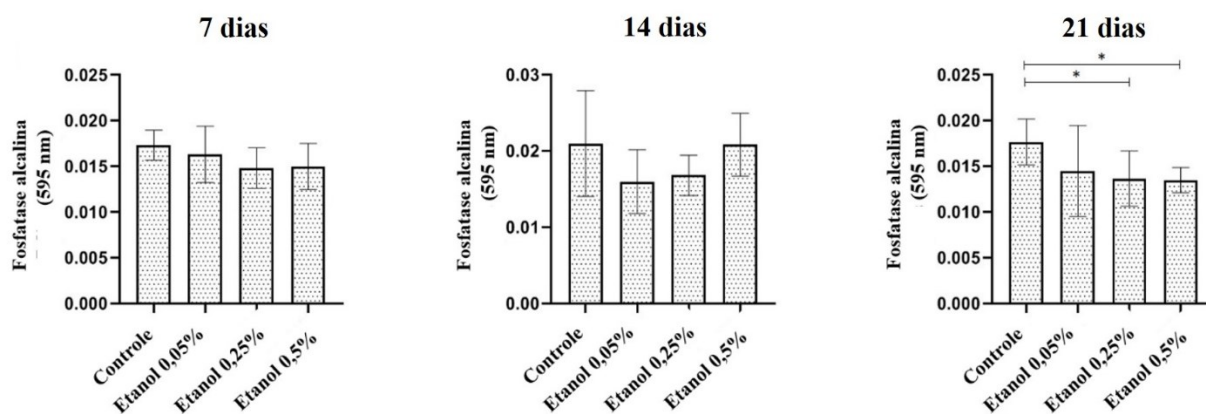


Figura 10. Atividade de fosfatase alcalina (média \pm desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 7, 14 e 21 dias de cultivo. * $p < 0,05$ (Teste t de *Student*). Redução significativa da atividade da fosfatase alcalina aos 21 dias nos grupos tratados com 0,5% e 0,25% de etanol em comparação ao controle.

Análise histoquímica e morfométrica dos *pellets* de condrócitos

Os *pellets* de condrócitos dos grupos tratados tinham tamanhos semelhantes ao do grupo controle (dados não demonstrados). Em todos os *pellets*, independente do grupo, havia áreas de aglomerados de condrócitos envoltos por pequena quantidade de matriz, bem como áreas bem diferenciadas de cartilagem semelhantes à do tecido articular, onde condrócitos se alojavam dentro de lacunas de tamanhos variados e estavam envoltos por grande quantidade de matriz condrogênica. Em todos os *pellets*, em porcentagens variadas de acordo com o grupo, havia áreas com marcação PAS+ e PAS-. Os *pellets* de condrócitos tratados com 0,5% de etanol apresentaram porcentagem significativamente menor de marcação PAS+ em comparação ao controle (Fig. 11).

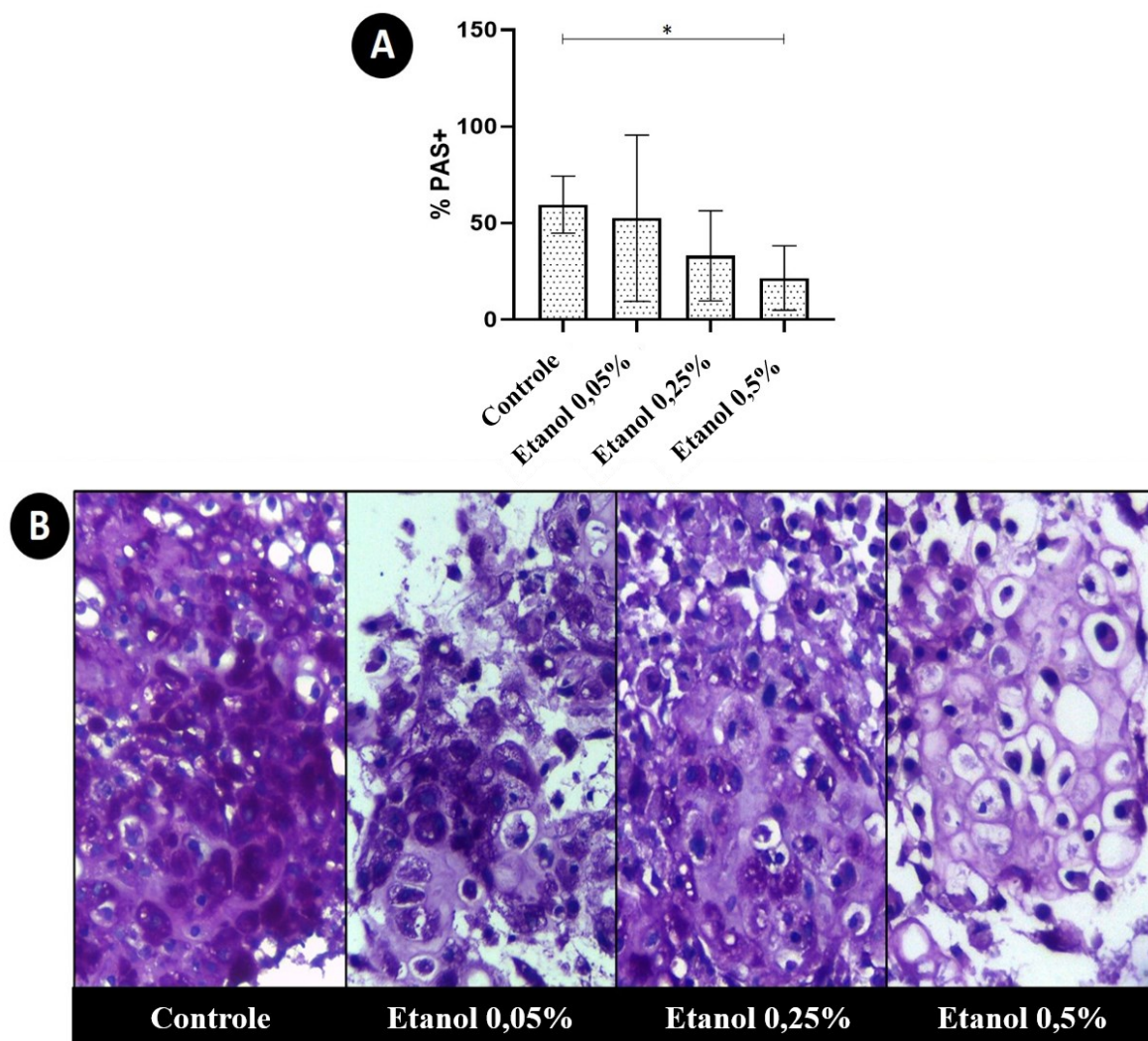


Figura 11. A) Porcentagem de áreas PAS+ nos *pellets* de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 21 dias de cultivo, sob cultivo tridimensional. * $p < 0,05$ (Teste t de Student). B) Secções histológicas dos *pellets* de condrócitos articulares de ratos neonatos, sob cultivo tridimensional, aos 21 dias. Redução significativa da porcentagem de áreas PAS+ no grupo tratado com 0,5% de etanol em relação ao controle.

Em relação aos percentuais de citoplasma, núcleo e áreas de cartilagem bem diferenciada, o grupo tratado com 0,5% de etanol apresentou porcentagem de matriz condrogênica bem diferenciada significativamente menor em comparação ao controle. Ainda, em relação aos percentuais de núcleo e citoplasma dos condrócitos, o grupo tratado com 0,5% de etanol apresentou percentuais significativamente maiores em comparação à porcentagem observada

nos *pellets* do grupo controle. No entanto, o tamanho médio dos condrócitos não diferiu significativamente entre grupos. Não houve diferença significativa entre a avaliação morfométrica dos *pellets* do grupo tratado com a menor concentração de etanol (0,05%) e o grupo controle (Fig. 12).

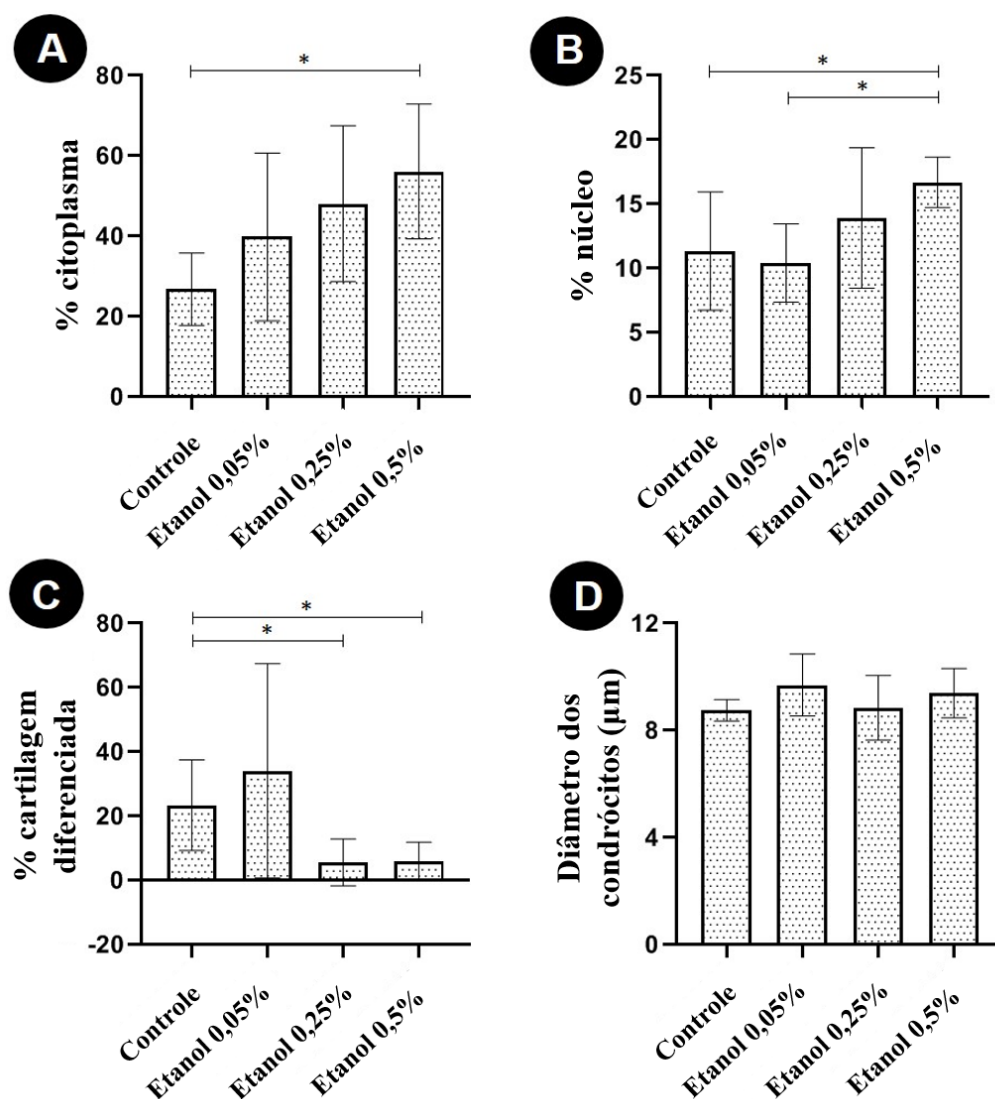


Figura 12. Análise morfométrica nos *pellets* de condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 21 dias de cultivo, sob cultivo tridimensional. A) Grupo tratado com 0,5% de etanol com maior porcentagem de citoplasma de condrócitos em comparação ao controle e ao grupo leve. B) Grupo tratado com 0,5% de etanol com maior porcentagem de núcleo de condrócitos em comparação ao controle. C) Grupos tratados com 0,25% e 0,5% de etanol com menor porcentagem de matriz diferenciada em comparação ao controle. D) Diâmetro médio dos condrócitos semelhante entre grupos. * $p < 0,05$ (Teste t de Student).

Expressão relativa dos transcritos gênicos de agrecan, Sox9 e colágeno II por RT-qPCR

Quanto à análise da expressão dos transcritos gênicos para agrecan, Sox9 e colágeno II, realizada aos 21 dias de cultivo, somente os condrócitos tratados com a maior concentração de etanol (0,5%) apresentaram redução significativa da expressão de agrecan, em comparação ao grupo controle. Nenhuma das concentrações de etanol testadas alterou significativamente a expressão de Sox9 e de colágeno II (Fig. 13).

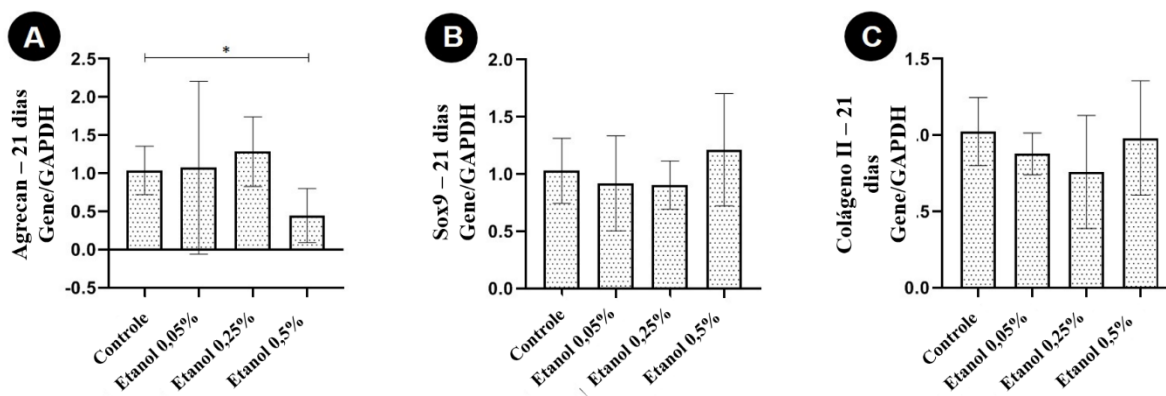


Figura 13. Expressão dos transcritos gênicos (média \pm desvio padrão) para agrecan, Sox9 e colágeno II pela técnica de RT-qPCR nos condrócitos articulares de ratos neonatos cultivados sem etanol (controle) e com diferentes concentrações de etanol (0,05%, 0,25% e 0,5%) aos 21 dias de cultivo. A) Grupo tratado com 0,5% de etanol com redução significativa da expressão de agrecan em comparação ao controle. B) Expressão de Sox9 sem diferença entre grupos. C) Expressão de colágeno II sem diferença entre grupos. * $p < 0,05$, (Teste t de *Student*).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, que condrócitos articulares de neonatos cultivados em meio contendo 0,5% de etanol, apresentam redução significativa da atividade de fosfatase alcalina, das porcentagens de marcação PAS+ e de cartilagem bem diferenciada e da expressão de agrecan. Os resultados demonstram também que os efeitos são dependentes das concentrações de etanol, havendo na concentração intermediária de etanol (0,25%), somente redução da atividade da fosfatase alcalina e da porcentagem de cartilagem bem diferenciada e na menor concentração de etanol (0,05%), nenhuma alteração dos parâmetros avaliados.

A redução da atividade da FA causada pelo efeito direto do etanol sobre os condrócitos é muito relevante para a ossificação endocondral, uma vez que, *in vivo*, na placa de crescimento de ratos, observa-se aumento progressivo da expressão da FA à medida que ocorre a maturação do condrócito, ou seja, da zona de repouso em direção à zona hipertrófica (Miao e Scutt, 2002). O aumento da atividade da FA em condrócitos hipertróficos, juntamente com aumento da produção de colágeno X, condrocalcina, osteopontina e osteonectina, indica que a maturação do tecido está chegando ao final (Staines *et al.*, 2013), já que a FA é uma metaloenzima que promove a mineralização (Sharma *et al.*, 2014). No presente estudo, foi observada redução da atividade enzimática aos 21 dias em condrócitos cultivados com 0,5% e 0,25% de etanol. Resultado semelhante foi observado em culturas de células tronco mesenquimais da medula óssea de humanos tratadas com concentrações semelhantes de etanol usadas aqui (Gong e Wezeman, 2004). Sendo assim, a redução da atividade da FA pode ser um indicativo de que o etanol impede ou retarda a maturação dos condrócitos, uma vez que a atividade aumentada dessa enzima indica estágio final de maturação celular.

O etanol interfere na atividade de síntese dos condrócitos de modo dose-dependente. Enquanto baixas concentrações de etanol não alteram significativamente a síntese de matriz PAS+, *pellets* de condrócitos tratados com a maior concentração de etanol apresentaram menor porcentagem de marcação PAS+. A coloração de PAS foi escolhida por ser uma forma simples e eficaz de demonstrar a presença de glicoproteínas e proteoglicanos. Nosso estudo utilizou sistema de cultivo 3D, que tem a vantagem de manter o fenótipo cartilaginoso por várias semanas em meio apropriado (Bassleer *et al.*, 1986). Uma possível justificativa para a menor produção de matriz extracelular pode ser a interferência do etanol na maturação dos

condrócitos. Além disso, Qin *et al.* (2018) encontraram evidências de que o consumo crônico de etanol induz diferenciação osteogênica nos condrócitos da cartilagem articular de humanos adultos. Além de promover dediferenciação, o etanol também reduziu a expressão gênica de TGF- β , importante para a diferenciação condrogênica.

Verificou-se que a adição de 0,5% de etanol ao meio de cultura promoveu aumento no percentual de citoplasma dos condrócitos. Num primeiro momento, esse achado pode sugerir que o etanol induz hipertrofia celular. No entanto, essa suspeita foi afastada pela mensuração do diâmetro médio dos condrócitos, que permitiu concluir que não houve, entre grupos, diferença significativa no tamanho do condrócito. Sendo assim, é possível que o aumento da porcentagem de citoplasma e também de núcleo de condrócitos no grupo tratado com 0,5% de etanol tenha ocorrido, uma vez que a síntese de matriz cartilaginosa reduziu.

Outro dado observado no nosso estudo foi a menor quantidade de áreas com cartilagem bem diferenciada nos *pellets* tratados com 0,25% e 0,5% de etanol, o que é compatível com os achados de que o etanol interfere com vias essenciais para a diferenciação cartilaginosa (Roper *et al.*, 2016). Esse resultado permite sugerir que o etanol altera o fenótipo do condrócito evidenciado pela menor síntese de matriz extracelular (redução de áreas PAS positivas e menor expressão de agrecan) e pela redução da maturação dos condrócitos (redução nas áreas de cartilagem bem diferenciada). Em osteoblastos, Maran *et al.* (2001) encontraram redução na expressão de indicadores de diferenciação óssea como osteonectina e colágeno I causados pelo etanol.

A técnica de RT-qPCR revelou que há menor expressão gênica de agrecan em condrócitos tratados com 0,5% de etanol. O agrecan é o principal proteoglicano estrutural da matriz extracelular e atua favorecendo interações célula-célula e célula-matriz, além de lubrificar e conferir resistência à articulação (Kiani *et al.*, 2002). Assim, a redução da expressão do transcrito para agrecan compromete consideravelmente a função articular e pode ser um indicativo de perda das características fenotípicas próprias dos condrócitos (Stewart *et al.*, 2000), e isso pode predispor à osteoartrite (Qin *et al.*, 2018). A redução da expressão de agrecan pode explicar a redução da porcentagem de matriz PAS+, e conseqüentemente de proteoglicanos, no grupo tratado com 0,5% de etanol.

Por outro lado, o etanol não alterou significativamente a expressão do transcrito gênico para Sox9 e colágeno II, em nenhuma das concentrações estudadas. O Sox9 é um fator de

transcrição essencial para a diferenciação condrogênica inicial, para proliferação celular e para a transcrição de genes que induzem a expressão de colágeno II e de outros constituintes da matriz extracelular (Kronenberg, 2003). Na condrogênese fetal, as áreas de condensação mesenquimal, com expressão de Sox9, são os locais onde posteriormente haverá síntese de cartilagem, dando origem ao molde cartilaginoso que será substituído por osso (DeLise *et al.*, 2000). Assim, como a expressão gênica de Sox9 não diferiu significativamente entre grupos, sugere-se que o etanol atue diretamente sobre as etapas tardias da maturação dos condrócitos. Além disso, é possível que essa seja a razão pela qual o colágeno II também não tenha diferido entre grupos, uma vez que o Sox9 induz a expressão de colágeno II.

Qin *et al.* (2018) encontraram redução na expressão gênica de Sox9 e de colágeno II em condrócitos extraídos de humanos com histórico de consumo diário de etanol por um período de 20 anos. Porém, a metodologia utilizada por Qin *et al.* (2018) é diferente da utilizada no presente estudo, uma vez que os condrócitos foram extraídos de indivíduos adultos que faziam uso de etanol, não tendo sido o etanol adicionado à cultura e os condrócitos articulares extraídos de neonatos, como no presente estudo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o etanol atua diretamente sobre os condrócitos articulares de neonatos, alterando o fenótipo do condrócito e a sua atividade de síntese, com redução da atividade da fosfatase alcalina, redução da síntese de matriz diferenciada e de áreas PAS+, e redução da expressão de agrecan, sendo este efeito dose-dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA-BUIS, RF; CÁZARES, DG; MONROY, JC. Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de la extremidad de los vertebrados. *Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicas*, v.9, p.78-89, 2006.
- ADAMS, S.L.; COHEN, A.J.; LASSOVA, L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J. Cell Physiol.*, v.213, p.635-641, 2007.
- ARNOLD, M.A.; KIM, Y.; CZUBRYT, M.P. *et al.* MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev. Cell*, v.12, p.377-389, 2007.
- ASSIS, H.A.; ELERT, N.C.; AZEVEDO, A.L.B.P. *et al.* Dose-dependent effect of triiodothyronine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from the bone marrow of female rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.70, p.89-100, 2018.
- BADGER, T.M.; HIDESTRAND, M.; SHANKAR, K. *et al.* The effects of pregnancy on ethanol clearance. *Life Sci.*, v.77, p.2111-2126, 2005.
- BALLOCK, R.T.; O'KEEFE, R.J. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res. Part C: Embryo Today*, v.69, p.123-143, 2003.
- BASSLEER, C.; GYSEN, Ph.; FOIDART, J.M. *et al.* Human chondrocytes in tridimensional culture. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.*, v.22, p.113-119, 1986.
- BLOISE, E.; COUTO, H.L.; MASSAI, L. *et al.* Differential expression of follistatin and FLRG in human breast proliferative disorders. *BMC Cancer*, v.9, p.1-10, 2009.
- BOSCHEN, K.E.; KELLER, S.M.; ROTH, T.L. *et al.* Epigenetic mechanisms in alcohol- and adversity-induced developmental origins of neurobehavioral functioning. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.66, p.63-79, 2018.
- BROCARD, P.S.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R. The role of oxidative stress in the fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Res. Rev.*, v.67, p.209-225, 2011.
- CARON, M.M.J.; EMANS, P.J.; CREMERS, A. *et al.* Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. *Osteoarthritis Cartilage*, v.21, p.604-613, 2013.
- Centro de Informação sobre Saúde e Etanol (CISA). Síndrome alcoólica fetal. Disponível em: <<http://www.cisa.org.br/artigo/4763/sindrome-alcoolica-fetal.php>> Acesso em: 01 ago. 2017.
- CHEN, K.S.; TATARCZUCH, Y.A.; HUANG, H.H. *et al.* Identification of light and dark hypertrophic chondrocytes in mouse and rat chondrocyte pellet cultures. *Tissue Cell*. v.44, p.124-128, 2010.
- CHEUNG, R.C.; GRAY, C.; JOBES, S.J. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone*, v.16, p.143-147, 1995.
- CHIM, S.M.; TICKNER, J.; CHOW, S.T. *et al.* Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.24, p.297-310, 2013.

DAI, J.; RABIE, A.B. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J. Dent. Res.*, v.86, p.937-950, 2007.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.*, v.81, p.177-187, 2007.

DAY, N.L.; LEECH, S.L.; RICHARDSON, G.A. *et al.* Prenatal alcohol exposure predicts continued deficits in offspring size at 14 years of age. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.26, p.1584-1591, 2002.

DELISE, A.M.; FISCHER, L.; TUAN, R.S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*. v.8, p.309-334, 2000.

DI ROCCO, G.; BALDARI, S.; PANI, G.; TOIETTA, G. Stem cells under the influence of alcohol: effects of ethanol consumption on stem/progenitor cells. *Cell. Mol. Life. Sci.*, v.76, p.231-244, 2019.

DÖRRIE, N.; FÖCKER, M., FREUNSCHT, I. *et al.* Fetal alcohol spectrum disorders. *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry*, v.23, p.863-875, 2014.

DUGGAL, S.; SIMPSON, M.E.; KEIVER, K. Effect of chronic ethanol consumption on the response of parathyroid hormone to hypocalcemia in the pregnant rat. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.31, p.104-112, 2007.

FARLEY, J.R.; FITZSIMMONS, R.; TAYLOR, A.K. *et al.* Direct effects of ethanol on bone resorption and formation in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.238, p.305-314, 1985.

FRANSQUET, P.D.; HUTCHINSON, D.; OLSSON, C.A. *et al.* Perinatal maternal alcohol consumption and methylation of the dopamine receptor DRD4 in the offspring: the Triple B study. *Environ. Epigenet.*, v.2, dvw023, 2016.

FRIDAY, K.E.; HOWARD, G.A. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism*, v.40, p.562-565, 1991.

GERBER, H.P.; VU, T.H.; RYAN, A.N. *et al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.*, v.5, p.33-42, 1999.

GERSTENFELD, L.C.; SHAPIRO, F.D. Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implications of the complex functions of the hypertrophic chondrocytes during endochondral bone development. *J. Cell. Biochem.*, v.62, p.1-9, 1996.

GIGLIA, R.C. Alcohol and lactation: an updated systematic review. *Nutr. Diet.*, v.67, p.237-243, 2010.

GIULIANI, N.; GIRASOLE, G.; VESCOVI, P.P. *et al.* Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.23, p.381-385, 1999.

GOLUB, E.E.; BOESZE-BATTAGLIA, K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr. Opin. Orthop.*, v.18, p.444-448, 2007.

- GONG, Z.; WEZEMAN, F.H. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.28, p.468-479, 2004.
- GORDON, B.H.J.; BARAONA, E.; MIYAKAWA, H. *et al.* Exaggerated acetaldehyde response after ethanol administration during pregnancy and lactation in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.9, p.17-22, 1985.
- GRIGORIOU, E.; TROCLE, A.; DORMANS, J.P. *The growth plate: embryologic origin, structure, and function* (seção XXIII, capítulo 140, p.1421-1429). In: POLIN, R.A. *et al.* Fetal and Neonatal Physiology, e2, Filadélfia: Elsevier, 2017.
- GU, J.W.; ELAM, J.; SARTIN, A. *et al.* Moderate levels of ethanol induce expression of vascular endothelial growth factor and stimulate angiogenesis. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, v.281, p.R365-R372, 2001.
- GUERRI, C.; SANCHIS, R. Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following ethanol administration. *Life Sci.*, v.38, p.1543-1556, 1986.
- GUO, J.L.; QU, C.Y.; BAI, F. *et al.* Relations between alcoholism and osteoporosis or femoral head necrosis. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, v.34, p.732-735, 2013.
- HAASTRUP, M.B.; POTTEGARD, A.; DAMKIER, P. Alcohol and breastfeeding. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, v.114, p.168-173, 2014.
- HALL, A.P.; WESTWOOD, F.R.; WADSWORTH, P.F. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. *Toxicol. Pathol.*, v.34, p.131-147, 2006.
- HARPER, J.; KLAGSBRUN, M. Cartilage to bone - Angiogenesis leads the way. *Nat. Med.*, v.5, p.617-618, 1999.
- HELLINGMAN, C.A.M.D.; DAVIDSON, E.N.B.; KOEVOET, W. *et al.* Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of smad1/5/8p prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng. Part A*, v.17, p. 121-128, 2011.
- HOLFORD, N.H.G. Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clin. Pharmacokinet.*, v.13, p.273-292, 1987.
- HORTON, WA; DEGNIN, CR. FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinology Metabolism*, v.20, p.341-348, 2009.
- IBER, D.; ZELLER, R. Making sense-data-based simulations of vertebrate limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.22, p.570-577, 2012.
- IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, J.; JOUPPIA, P.; AKERBLUM, H.K. *et al.* Elimination and metabolic effects of ethanol in mother, fetus, and newborn infant. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.112, p.387-393, 1972.
- IKEDA, Y.; ITO, K.; IZUMI, Y. *et al.* A candidate enhancer element responsible for high-level expression of the aggrecan gene in chondrocytes. *J. Biochem.*, v.156, p.21-28, 2014.

IKEGAMI, D.; AKIYAMA, H.; SUZUKI, A. *et al.* Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development*, v.138, p.1507-1519, 2011.

IWANIEC, U.T.; TURNER, R.T. Intraperitoneal injection of ethanol results in drastic changes in bone metabolism not observed when ethanol is administered by oral gavage. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v.37, p.1271-1277, 2013.

JOHANSSON, N.; KERE-SAARIALHO, U.; AIROLA, K. *et al.* Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev. Dynam.*, v.208, p.387-397, 1997.

JONES, A.W. Pharmacokinetics of ethanol - Issues of forensic importance. *Forensic. Sci. Ver.*, v.23, p.92-136, 2011.

JONES, W.L.; STEWART, D.B. Effects of orally-administered ethanol on mammary gland morphology and functional efficiency in lactating rats. *Exp. Path.*, v.20, p.205-213, 1984.

KANIS, J.A.; JOHANSSON, H.; JOHNNELL, O. *et al.* Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos. Int.*, v.16, p.737-742, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARAPLIS, AC. Embryonic development of bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation. *Principles of Bone Biology*, 3 ed. 2008.

KC, R.; VOIGT, R.; ELLMAN, M.B. *et al.* Chronic alcohol consumption induces osteoarthritis-like pathological changes in an experimental mouse model. *Arthritis. Rheumatol.*, v.67, p.1678-1680, 2015.

KESÄNIEMI, Y.A. Ethanol and acetaldehyde in the milk and peripheral blood of lactating women after ethanol administration. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*, v.81, p.84-86, 1974.

KIANI, C; CHEN, I; WU, YJ. *et al.* Structure and function of aggrecan. *Cell. Research.*, v.12, p.19-32, 2002.

KOMORI, T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem. Cell. Biol.*, v.149, p.313-323, 2018.

KOPPAKA, V.; THOMPSON, D.C.; CHEN, Y. *et al.* Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol. Rev.*, v.64, p.520-539, 2012.

KOZHEMYAKINA, E.; LASSAR, A.B.; ZELZER, E. A pathway to boné: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development*, v.142, p.817-831, 2015.

KRONENBERG, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, v.423, p.332-336, 2003.

- KULYK, W.M.; HOFFMAN, L.M. Ethanol exposure stimulates cartilage differentiation by embryonic limb mesenchyme cells. *Exp. Cell. Res.*, v.223, p.290-300, 1996.
- LAWSON, M.; KERN, F. Jr.; EVERSON, G.T. Gastrointestinal transit time in human pregnancy: prolongation in the second and third trimesters followed by postpartum normalization. *Gastroenterology*, v.89, p.996-999, 1985.
- LAWTON, M.E. Alcohol in breast milk. *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynaec.*, v.25, p.71-73, 1985.
- LAZIC, T.; SOW, F.B.; GEELLEN, A.V. *et al.* Exposure to ethanol during the last trimester of pregnancy alters the maturation and immunity of the fetal lung. *Alcohol*, v.45, p.673-680, 2011.
- LEBOY, PS. Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1068, p.14-18, 2006.
- LIU, C.F.; SAMSA, W.E.; ZHOU, G. *et al.* Transcriptional control of chondrocyte specification and differentiation. *Semin. Dev. Cell. Biol.*, v.62, p.34-49, 2017.
- LOEBSTEIN, R.; LALKIN, A.; KOREN, G. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. *Clin. Pharmacokin.*, v.3, p.328-343, 1997.
- LUSSIER, A.A.; WEINBERG, J.; KOBOR, M.S. Epigenetics studies of fetal alcohol spectrum disorder: where are we now? *Epigenomics*, v.9, p.291-311, 2017.
- MACKIE, E.J.; AHMED, Y.A.; TATARCZUCH, L. *et al.* Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v.40, p.46-62, 2008.
- MACKIE, E.J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J. Endocrinol.*, v.211, p.109-121, 2011.
- MAK, K.K.; KRONENBERG, H.M.; CHUANG, P. *et al.* Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development*, v.135, p.1947-1956, 2008.
- MALASSINÉ, A.; FRENDO, J.L.; EVAIN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum. Reprod. Update*, v.9, p.531-539, 2003.
- MANDAL, C.; HALDER, D.; JUNG, K.H. *et al.* Gestational alcohol exposure altered DNA methylation status in the developing fetus. *Int. J. Mol. Sci.*, v.18, e1386, 2017.
- MARAN, A.; ZHANG, M.; SPELSBERG, T.C. *et al.* The dose-response effects of ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. *J. Bone Miner. Res.* v.16, p.270-276, 2001.
- MATSUMOTO, H.; FUKUI, Y. Pharmacokinetics of ethanol: a review of the methodology. *Addict. Biol.*, v.7, p.5-14, 2002.

MESSNER, D.J.; MURRAY, K.F.; KOWDLEY, K.V. Mechanisms of hepatocyte detoxification. In: JOHNSON, L.R. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Volume 2. 5.ed. Cambridge: Academic Press, 2012. cap.55, p.1507-1527.

MIAO, D.; SCUTT, A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J. Histochem. Cytochem.*, v.50, p.333-340, 2002.

MILLER, L.; SHAPIRO, A.M.; CHENG, J. *et al.* The free radical spin trapping agent phenylbutylnitron reduces fetal brain DNA oxidation and postnatal cognitive deficits caused by in utero exposure to a non-structurally teratogenic dose of ethanol: a role for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, v.60, p.223-232, 2013.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N.; TORCHIA, M.G. *Embriologia básica*. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p. 55-63, 1983.

MURILLO-FUENTES, L.; ARTILLO, R.; CARRERAS, O. *et al.* Effects of maternal chronic alcohol administration in the rat: lactation performance and pup's growth. *Eur. J. Nutr.*, v.40, p.147-154, 2001.

NAVA-OCAMPO, A.A.; VELÁZQUES-ARMENTA, Y., BRIEN, J.F. *et al.* Elimination kinetics of ethanol in pregnant women. *Reproductive Toxicol.*, v.18, p.613-617, 2004.

NI, Q.; WANG, L.; WU, Y. *et al.* Prenatal ethanol exposure induces the osteoarthritis-like phenotype in female adult offspring rats with a post-weaning high fat diet and its intrauterine programming mechanisms of cholesterol metabolism. *Toxicol. Letters.*, v.238; p.117-125, 2015.

NI, Q.; LU, K.; LI, J. *et al.* Role of TGF β signaling in maternal ethanol-induced fetal articular cartilage dysplasia and adult onset of osteoarthritis in male rats. *Toxicol. Sci.*, v. 164, p.179-190, 2018.

OKUBO, Y.; REDDI, H. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.306, p.186-190, 2003.

ONETA, C.M.; SIMANOWSKI, U.A.; MARTINEZ, M. *et al.* First pass metabolism of ethanol is strikingly influenced by the speed of gastric emptying. *Gut*, v.43, p.612-619, 1998.

ONO, N.; KRONENBERG, H.M. *Developmental biology of musculoskeletal tissues for tissue engineers* (capítulo 1, p1-24). In: STODDART M.J. *et al.* *Developmental biology and musculoskeletal tissue engineering: Principles and applications*. Academic Press, 2018.

ORIMO, H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon. Med. Sch.*, v.77, p.4-12, 2010.

PAN, Z.; ZHANG, X.; SHANGGUAN, Y. *et al.* Suppressed osteoclast differentiation at the chondro-osseous junction mediates endochondral ossification retardation in long bones of Wistar fetal rats with prenatal ethanol exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.305, p.234-241, 2016.

- PARKINGTON, H.C.; KENNA, K.R.; SOZO, F. *et al.* Maternal alcohol consumption in pregnancy enhances arterial stiffness and alters vasodilator function the varies between vascular beds in fetal sheep. *J. Physiol.*, v.592, p.2591-2603, 2014.
- PEPINO, M.Y.; STEINMEYER, A.L.; MENNELLA, J.A. Lactational state modifies alcohol pharmacokinetics in women. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v.31, p.909-918, 2007.
- PIGNATTI, E.; ZELLER, R.; ZUNIGA, A. To BMP or not to BMP during vertebrate limb bud development. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, v.32, p.119-127, 2014.
- QIN, X.; JIN, P.; JIANG, P. *et al.* A human chondrocyte-derived in vitro model of alcohol-induced and steroid-induced femoral head necrosis. *Med. Sci. Monit.*, v.24, p.539-547, 2018.
- RAMADOSS, J.; MAGNESS, R.R. Vascular effects of maternal alcohol consumption. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, v.303, p.H414-H421, 2012.
- RAMSAY, M. Genetic and epigenetic insights into fetal alcohol spectrum disorders. *Genome Med.*, 2:27, 2010.
- RIJK, E.P.C.T.; ESCH, E.V.; FLIK, G. Pregnancy dating in the rat: Placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol. Pathol.*, v.30, p.271-282, 2002.
- ROBSON, H.; SIEBLER, T.; STEVENS, D.A. *et al.* Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology.*, v.141, p.3887-3897, 2000.
- ROPER, P.M.; ABBASNIA, P.; VUCHKOVSKA, A. *et al.* Alcohol-related deficient fracture healing is associated with activation of FoxO transcription factors in mice. *J. Orthop. Res.*, v.34, p.2106-2115, 2016.
- STAINES, K.A.; POLLARD, A.S.; MCGONNELL, I.M. *et al.* Cartilage to bone transitions in health and disease. *J. Endocrinol.*, v.219, p.1-12, 2013.
- SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indican. J. Clin. Biochem.*, v.29, p.269-278, 2014.
- SHI, S.; WANG, C.; ACTON, A.J. *et al.* Role of Sox9 in growth factor regulation of articular chondrocytes. *J. Cell. Biochem.*, v.116, p.1391-1400, 2015.
- SIMPSON, M.E.; DUGGAL, S.; KEIVER, K. Prenatal ethanol exposure has differential effects on fetal growth and skeletal ossification. *Bone*, v.36, p.521-532, 2005.
- SIVARAJ, K.K.; ADAMS, R.H. Blood vessel formation and function in bone. *Development*, v.143, p.2706-2715, 2016.
- SNOW, M.E.; KEIVER, K. Prenatal ethanol exposure disrupts the histological stages of fetal bone development. *Bone*, v.41, p.181-187, 2007.
- SOMA-PILLAY, P.; NELSON-PIERCY, C.; TOLPPANEN, H. *et al.* Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc. J. Afr.*, v.27, p.89-94, 2016.

ST-JACQUES, B.; HAMMERSCHMIDT, M.; MCMAHON, A.P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes. Dev.*, v.13, p.2072-2086, 1999.

STEGEN, S.; CARMELIET, G. The skeletal vascular system - Breathing life into bone tissue. *Bone*, v.115, p.50-58, 2018.

STEWART, M.C.; SAUNDERS, K.M.; BURTON-WURSTER, N. *et al.* Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, Bone Morphogenetic Protein 2, and serum supplementation. *J. Bone. Miner. Res.*, v.15, 2000.

STICKENS, D.; BEHONICK, D.J.; ORTEGA, N. *et al.* Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*, v.131, p.5883-5895, 2004.

SUN, M.M.; BEIER, F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease. *Birth Defects Res. C.*, v.102, p.74-82, 2014.

TRAVÉS, C.; CAMPS, L.; LÓPEZ-TEJERO, D. Liver alcohol dehydrogenase activity and ethanol levels during chronic ethanol intake in pregnant rats and their offspring. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.52, p.93-99, 1995.

TRIANO, E.A.; SLUSHER, L.B.; ATKINS, T.A. *et al.* Class I alcohol dehydrogenase is highly expressed in normal human mammary epithelium but not in invasive breast cancer: Implications for breast carcinogenesis. *Cancer Res.*, v.63, p.3092-3100, 2003.

TSUMAKI, N; YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Reviews.*, v.16, p.279-285, 2005.

VEGA, R.B.; MATSUDA, K.; OH, J. *et al.* Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*, v.119, p.555-566, 2004.

VENTUREIRA, M.R.; SOBARZO, C.M.A.; NAITO, M. *et al.* Early placental angiogenesis-vascularization and VEGF/KDR receptor expression during mouse organogenesis after pregestational alcohol consumption. *Abstracts/Placenta*, v.36, p.491, 2015.

VERDUCI, E.; BANDERALI, G.; BARBERI, S. *et al.* Epigenetic effects of human breast milk. *Nutrients*, v.6, p.1711-1724, 2014.

VIGNESH, R.C.; DJODY S.S.; JAYASUDHA, E. *et al.* Effect of ethanol on human osteosarcoma cell proliferation, differentiation and mineralization. *Toxicology*, v.220, p.63-70, 2006.

WANG, J.; ZHOU, J.; BONDY, C.A. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *FASEB J.*, v.13, p.1985-1990, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global status report on alcohol and health 2018*. Geneva, 2018.

YAN, Q.; FENG, Q.; BEIER, F. Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.20, p.144-151, 2012.

YANG, Y. Skeletal Morphogenesis during embryonic development. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, v.19, p.197-218, 2009.

YANG, L.; TSANG, K.Y.; TANG, H.C. *et al.* Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.111, p.12097-12102, 2014.

YOSHIDA, C.A.; YAMAMOTO, H.; FUJITA, T. *et al.* Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.*, v.18, p.952-963, 2004.

ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res.*, v.35, p.6-16, 2013.

ZELNER, I; KOREN, G. Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.*, v.20, e259-e265, 2013.

ZELZER, E.; MAMLUK, R.; FERRARA, N. *et al.* VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development*, v.131, p.2161-2171, 2004.

ZHENG, Q.; ZHOU, G.; MORELLO, R. *et al.* Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J. Cell. Biol.*, v.162, p.833-842, 2003.

ANEXO A - Certificado de aprovação da CEUA-UFMG.**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Senhor(a) Professor(a) Rogéria Serakides,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Efeitos in vivo e in vitro do etanol na viabilidade, atividade de síntese e na expressão de fatores de transcrição condrogênicos em condrobl, submetido a esta comissão pelo protocolo 119 / 2016, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 04/07/2016.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 05/07/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Ethanol Alters Phenotype and Synthesis Activity of Rat Neonatal Articular Chondrocytes Grown in 2- and 3-Dimensional Culture

CARTILAGE

1-8

© The Author(s) 2019

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/1947603519870862

journals.sagepub.com/home/CAR



Natalia Viana Tamiasso¹, Carla Maria Osório Silva¹,
Amanda Maria Sena Reis², Natália Melo Ocarino¹,
and Rogéria Serakides¹

Abstract

Objective. We sought to evaluate the effect of different concentrations of ethanol on phenotype and activity of articular chondrocyte synthesis of neonatal rats in 2-dimensional (2D) and 3-dimensional (3D) culture. **Methods.** Chondrocytes were cultured in chondrogenic medium with different concentrations of ethanol: 0.0% v/v (control); 0.05% v/v (8.6 mM); 0.25% v/v (42.9 mM), and 0.5% v/v (85.7 mM). Chondrocytes under 2D culture were subjected to MTT assay, while chondrocytes under 3D culture were processed for paraffin inclusion and stained by periodic acid Schiff (PAS) to evaluate mean chondrocyte diameter and percentages of cells, nucleus, cytoplasm, well-differentiated matrix, and PAS+ areas. The expression of gene transcripts for aggrecan, Sox9, and type II collagen was evaluated by real-time quantitative polymerase chain reaction. **Results.** There was no difference between groups by the MTT assay. PAS staining revealed that chondrocytes treated with 0.5% v/v ethanol had higher percentages of cytoplasm and nuclear areas, but with a reduction in PAS+ matrix area. The mean diameter of chondrocytes was similar between groups. The expression of aggrecan in the group treated with 0.5% v/v ethanol was lower in comparison to that in the control. In the groups treated with 0.25% v/v and 0.5% v/v ethanol, the percentage of differentiated cartilage was lower in comparison with that in the control. The group treated with 0.05% v/v ethanol was similar to the control in all parameters. **Conclusions.** Ethanol acted directly on *in vitro* cultured articular chondrocytes of newborn rats, altering the chondrocyte phenotype and its synthesis activity, and these effects were dose dependent.

Keywords

alcohol, cartilage, newborn, rat

Introduction

Chondrogenesis is a complex phenomenon, involving several stages, being one of the first cellular events that occurs during skeletal development. The formation of the skeleton occurs from intramembranous and endochondral ossifications¹; however, most bones originate from the endochondral bone formation, in which the mesenchymal stem cells differentiate into chondrocytes, forming a cartilaginous mold that will be gradually replaced by bone.² During the postnatal period, proliferation, differentiation, and maturation of the chondrocytes of the epiphyseal plate and the articular cartilage determine the final length of adult bones.³ Sox9 is essential for cell survival, conversion of chondroprogenitor cells into chondrocytes, chondrocyte maturation,⁴ aggrecan expression,⁵ and for type II collagen expression, the latter being the main component of the extracellular matrix.⁶

However, if the steps that determine endochondral bone formation and growth are not properly regulated and coordinated, changes in bone growth may arise as a consequence of this lack of control.⁷ Among the substances that are able to interfere with endochondral bone formation and growth, ethanol stands out.⁸ The consumption of alcoholic beverages

¹Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal (NCT-TCA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brazil

Corresponding Author:

Rogéria Serakides, Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal (NCT-TCA) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte, Av. Antônio Carlos 6627, Caixa Postal 567, campus Pampulha da UFMG, Belo Horizonte, MG CEP 30123-970, Brazil.

Email: serakidesufmg@gmail.com

by pregnant women is a risk factor for the fetus, since ethanol is able to pass freely across the placenta and enter the fetal circulation because of its low molecular weight and high solubility.⁹ Ethanol has the ability to affect maternal physiological mechanisms necessary for fetal development, such as the control of calcemia.¹⁰ In addition, prenatal ethanol exposure (PEE) is capable of inducing a set of fetal changes known as fetal alcohol spectrum disorders (FASD), which are characterized by facial abnormalities, structural or functional dysfunction of the central nervous system, and reduction in bone growth.¹¹

A limitation of studies in humans is the difficulty in stating that the observed changes in the individuals who suffered PEE are exclusively due to ethanol, since its association with environmental factors and the use of other drugs is frequent.¹¹ Besides, ethical reasons prevent pregnant women from being included in certain experiments; therefore, murine models have been widely used to clarify the damage caused by ethanol consumption in the prenatal period.^{9,12} Rats with PEE have decreased bone length as well as disorganization of the epiphyseal plaque, with reduced resting zone thickness and increased hypertrophic zone.⁸ In addition, rats with PEE are predisposed to osteoarthritis.^{9,12} Often, the reduction of bone growth caused by PEE is not attributed to the direct effects of ethanol. The reduction in femur length of rats with PEE, for example, is attributed to increased maternal glucocorticoid levels and not to direct effects of ethanol on the fetus.¹³ In addition, it is believed that the reduction in bone growth may be caused by malnutrition due to the diminished suckling ability of the pup¹⁴ associated with milk ejection failure due to the suppressive effect of ethanol on the release of maternal oxytocin.¹⁵

Although there are studies demonstrating the direct effects of ethanol on cultures of osteoblasts,¹⁶ osteoclasts,¹⁷ and mesenchymal stem cells,¹⁸ there are no reports of studies that investigated the effects of ethanol addition on the phenotype, viability, and activity of articular chondrocytes in neonates. We hypothesized that the reduction of endochondral bone growth caused by PEE is due to direct effects of ethanol on chondrocytes. The present work proposes the use of an experimental model of 2- and 3-dimensional (2D and 3D, respectively) cultures, with the objective of evaluating, for the first time, the direct effects of different concentrations of ethanol in the culture medium on chondrocyte phenotype, synthetic activity, as well as expression of gene transcripts involved in chondrogenesis, as represented by *Sox9*, type II collagen, and aggrecan.

Methods

All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal de Minas Gerais, under protocol number 119/2016.

Isolation and Culture of Chondrocytes

Ten 3-day-old Wistar rats were used. The animals were subjected to euthanasia using an overdose (150 mg/kg) of Thiopental (Thiopentax, Cristália, Itapira, SP, Brazil) intraperitoneally. Antisepsis was performed on the skin of the hind limbs with 70% alcohol and povidone-iodine (PVPI); then, the femurs were dissected from the muscle and connective tissues with sterile instruments in a laminar flow cabinet and washed in 0.15 M sterile phosphate buffered saline (PBS).

Cartilage sections were immediately harvested from the distal and proximal ends of the femur. For isolation of chondrocytes, the cartilage fragments were washed with 0.15 M PBS. Cartilage was then digested by overnight incubation with 0.4% collagenase type 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) plus Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (DMEM-low glucose) (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) with 5% fetal bovine serum (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).^{19,20}

After 12 hours, the chondrocyte suspensions were centrifuged for 10 minutes at 1400 rpm and washed with 0.15 M PBS. After centrifugation, cells were resuspended and cultured in T25 flasks with chondrogenic medium consisting of DMEM-low glucose plus 1% fetal bovine serum (Gibco, Invitrogen) and supplemented with ascorbic acid (Sigma-Aldrich), dexamethasone (Sigma-Aldrich), insulin (Biotras, São Paulo, Brazil), transferrin (Sigma-Aldrich), (Sigma-Aldrich), and bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). The cells were incubated at 37°C with 5% CO₂. After 24 hours, cultures were washed with 0.15 M PBS to remove nonadherent cells.

After the second passage, depending on the type of assay, the cells were transferred to 24-well plates (2×10^4 cells/well), 6 wells (1×10^5 cells/well), T25 flasks (1×10^6 cells/bottle), or to plastic tapered tubes with capacity for 15 mL (1×10^6 cells/tube), where they were cultured in 2D or 3D systems. After 2 days of culture, the chondrogenic medium was replaced by chondrogenic medium containing different concentrations of ethanol: 0.05% v/v (8.6 mM); 0.25% v/v (42.9 mM), and 0.5% v/v (85.7 mM), similar to a previously established protocol,¹⁶ mimicking the mild, moderate and intense consumption of ethanol, respectively. Thus, three groups were treated with ethanol and one control group was cultured in chondrogenic medium identical to that of the treated groups, but free of ethanol. The culture medium was changed 3 times per week.

All analyses (MTT assay, reverse transcription-polymerase chain reaction [RT-PCR], and pellet morphometry) were performed simultaneously. Chondrocytes from the articular cartilage of 10 newborn rats of 5 different litters were used to obtain heterogeneity. A chondrocyte pool of these cells from all the rats was prepared. The same pool of cells was used for all the analyses (MTT assay, RT-PCR,

and pellet morphometry). Each group consisted of 6 wells (MTT) or 6 pellets (RT-PCR and morphometry).

MTT Assay

At the end of 7, 14, and 21 days of culture, the chondrocytes of all groups under 2D culture in 24-well plates were subjected to an assay of the conversion of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Invitrogen, Camarillo, CA, USA, catalog number: M6494) into formazan crystals. This is a quantitative method of evaluating succinate dehydrogenase enzyme activity in viable cells, where the enzyme present in mitochondria converts the MTT substrate to formazan crystals.²¹ The medium was replaced with 210 μ L of medium with 1% fetal bovine serum in each well and 170 μ L of MTT (5 mg/mL). The plate was incubated for 2 hours in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Formazan crystals were observed under a microscope and then 210 μ L of SDS (sodium dodecyl sulfate) with 10% HCl was added, which remained overnight in an incubator at 37°C with 5% CO₂. Cell debris were cleared from the MTT assay samples before measuring the absorbance at 595 nm. Subsequently, the samples were analyzed in a plate reader at a wavelength of 595 nm. The mean and standard deviation were determined for 6 wells/group.

Histochemical and Morphometric Analysis of Chondrocyte Pellets

At the end of 21 days of culture, the chondrocyte pellets of all groups under 3D culture in 15 mL conical tubes were washed with 0.15 M PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. The pellets were then processed into paraffin blocks²² and subsequently sectioned into 5- μ m slices using a microtome. The histological sections were placed under gelatinized glass slides²³ and stained by the periodic acid Schiff (PAS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to determine the percentage of PAS+ cartilaginous matrix. Also, the percentage areas of cytoplasm and nuclei of chondrocytes and well-differentiated cartilage areas were determined. The well-differentiated cartilage was characterized by chondrocyte groupings housed within gaps and surrounded by a large quantity of matrix, similar to articular cartilage tissue. These analyzes were carried out using a graticule with 121 points coupled to the eyepiece of an optical microscope, with a magnification of 40 \times . The average of 2 distinct fields was used to obtain the final values for each pellet. The size of the chondrocytes was also analyzed by mean diameter measurements.

The measures were carried out by blinded readers. The pellet was serially sectioned, and the central histological section was used for analysis. The central section was used for all the analyses and for all groups. To analyze the percentages of cells, nucleus, cytoplasm, well-differentiated

matrix, and PAS+ areas, two fields were used under a 40 \times objective lens, thereby analyzing the entire central section of the pellet. To analyze the chondrocyte diameter, images of five fields of the histological central section of each pellet, under a 100 \times objective lens, were captured with the aid of a Leica ICC50 camera coupled to a Leica DM500 microscope. The images were analyzed using LAS EZ 3.4 software. Diameters of chondrocytes with well-defined cytoplasmic boundaries were measured.

All morphometric variables were evaluated for 6 pellets per group, that is, 6 pellets were used for each group ($n = 6$), making it total 24 pellets.

Evaluation of the Expression of Aggrecan, Sox9, and Type II Collagen

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed on 3D cultures of chondrocytes in all groups after 21 days of culture in T25 flasks. Quantitative evaluation of aggrecan, Sox9, and collagen type II expression was performed.

Briefly, 1 μ g of RNA was used for cDNA synthesis using the SuperScript III Platinum Two-Step qPCR kit with SYBR Green (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). RT-qPCR was performed on a SmartCycler II thermal cycler (Cepheid, Carpinteria, CA, USA). The first step of amplification was initiated with reverse transcription for 120 seconds at 50°C, followed by PCR with the following parameters: 45 cycles of 15 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the end of each assay, the fluorescence data were analyzed for C_T values. Gene expression was calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ C_T} method, where the sample values were calculated in relation to GAPDH C_T values. The primers were designed based on the *Rattus norvegicus* mRNA sequence (Table 1). The mean and standard deviation were determined for 6 pellets/group ($n = 6$), making it 24 pellets in total.

Statistical Analysis

The design was entirely randomized, and for each variable, the mean and standard deviation were determined. Analysis of variance was performed, and comparisons of means were performed by Student *t* test using the GraphPad computational package. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

Results

MTT Assay

There was no significant difference between the means of any of the groups treated with ethanol and the control group with respect to cell viability as assessed by the MTT assay (Fig. 1).

Table 1. List of Gene Transcripts and Nucleotide Sequence of the Primers for Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.

Gene	Primer (Sequence 5'-3')	Accession Number
GAPDH	forward: CAACTCCCTCAAGATTGTCAAGCA reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_002046
Aggrecan	forward: CACACGCTACACACTGGACT reverse: TCACACTGGTGAAGCCATC	NM_022190.1
Type II collagen	forward: GTTCACGTACACTGCCCTGA reverse: AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	NM_012929.1
Sox9	forward: CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC reverse: GTTCTTCACCGACTTCCTCCG	NW_0473432

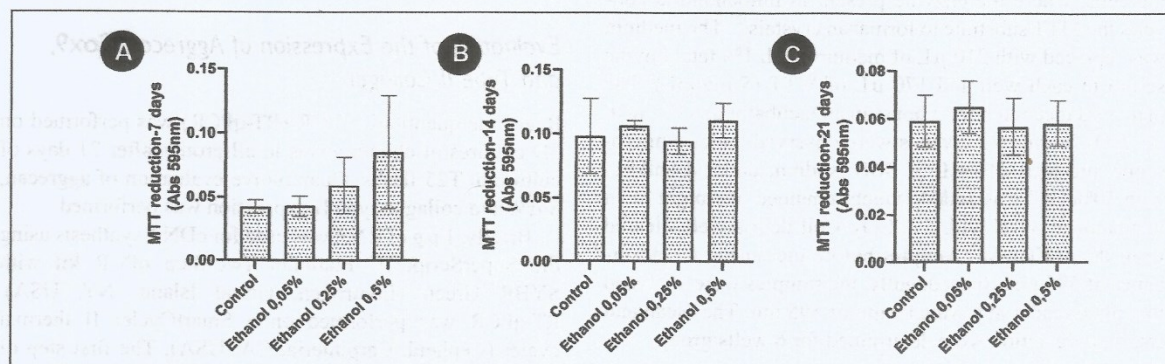


Figure 1. Conversion of MTT to formazan (mean \pm standard deviation) in 2-dimensional cultures of articular chondrocytes from newborn rats without ethanol (control) and with different concentrations of ethanol (0.05% v/v [8.6 mM]; 0.25% v/v [42.9 mM], and 0.5% v/v [85.7 mM]) after 7, 14, and 21 days of culture. * $P < 0.05$ (Student *t* test).

Histochemical and Morphometric Analysis of Chondrocyte Pellets

Chondrocyte pellets from the treated groups had similar sizes to the control group (data not shown). In all pellets, regardless of group, there were areas of chondrocyte clusters enveloped by a small amount of matrix, as well as well differentiated areas of cartilage similar to articular tissue, where chondrocytes were located within gaps of varying sizes and were enveloped by large quantities of chondrogenic matrix. In all pellets, although the percentages varied according to the group, there were areas of PAS+ and PAS- matrix. Chondrocytes treated with 0.5% ethanol had a significantly lower percentage of PAS+ matrix in comparison with the control (Fig. 2). In this group treated with 0.5% ethanol, it was possible to verify that the percentage of well-differentiated chondrogenic matrix was also significantly lower in comparison with the control (Fig. 3). However, the percentages of nuclei and cytoplasmic areas of the chondrocytes in the pellets of this group were significantly higher in comparison to the percentages observed in the pellets of the control group. However, mean chondrocyte size did not differ significantly between groups (Fig. 3).

The percentage of well-differentiated cartilaginous matrix was also significantly lower in the group treated with

the moderate concentration of ethanol, that is, 0.25%. However, in this group, the percentage of PAS+ areas, as well as the other parameters evaluated, were similar to those of the control group (Fig. 2). There was no significant difference between the morphometric evaluation of the pellets of the group treated with the lowest concentration of ethanol (0.05%) and the control group.

Expression of Aggrecan, Sox9, and Type II Collagen

In relation to the expression of gene transcripts for aggrecan, Sox9, and collagen type II, performed after 21 days of 3D culture, only chondrocytes treated with the highest concentration of ethanol (0.5%) showed a significant reduction in aggrecan expression in comparison with that in the control group. None of the ethanol concentrations tested significantly altered the expression of Sox9 and type II collagen (Fig. 4).

Discussion

The results of the present study demonstrated, for the first time, that articular chondrocytes of newborn rats cultured

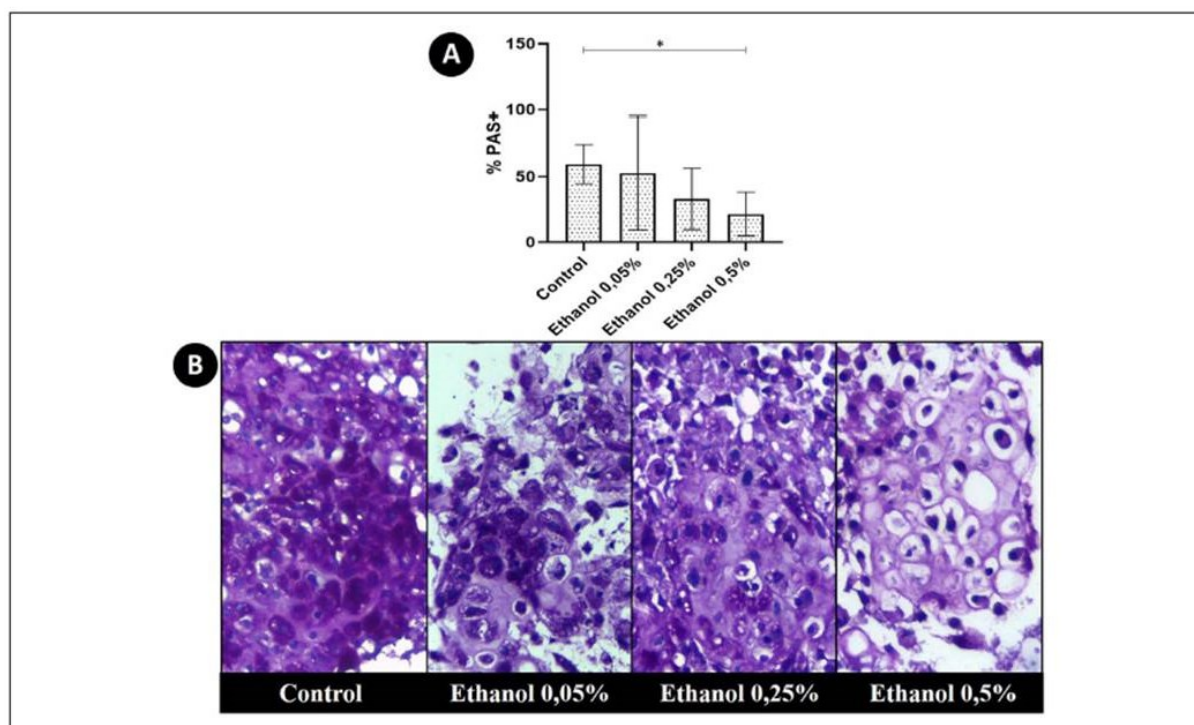


Figure 2. (A) Percentage of periodic acid Schiff+ (PAS+) areas in articular chondrocyte pellets of newborn rats without ethanol (control) and with different concentrations of ethanol (0.05% v/v [8.6 mM]; 0.25% v/v [42.9 mM], and 0.5% v/v [85.7 mM]) at 21 days of 3-dimensional culture. * $P < 0.05$ (Student t test). (B) Histological sections of articular chondrocyte pellets from newborn rats, under 3-dimensional culture, at 21 days. There was a significant reduction in the percentage of PAS+ areas in the group treated with 0.5% of ethanol in comparison to the control.

in chondrogenic medium containing 0.5% v/v ethanol present significant reduction in percentage of PAS+ chondrogenic matrix, percentage of well-differentiated cartilage, and expression of aggrecan. The results also showed that such effects depend on the ethanol concentration, with 0.25% v/v exhibiting reduction only of percentage of well-differentiated cartilage, and that the lowest concentrations of ethanol (0.05% v/v) had no effects in terms of the parameters evaluated.

Ethanol interferes in the activity of chondrocyte synthesis in a dose-dependent manner. While low concentrations of ethanol did not significantly alter PAS+ matrix synthesis, chondrocyte pellets treated with the highest ethanol concentration synthesized a lower percentage of PAS+ matrix. PAS staining was chosen as a simple and effective way to demonstrate the presence of proteoglycans. Our study used a 3D culture system, which has the advantage of maintaining the cartilaginous phenotype for several weeks in appropriate medium.²⁴ A possible reason for the diminished production of proteoglycans in the extracellular matrix may be the interference of ethanol in chondrocyte maturation. It was found evidence that chronic ethanol

consumption induces osteogenic differentiation in articular cartilage chondrocytes of adult humans. In addition to promoting dedifferentiation, ethanol also reduced the gene expression of transforming growth factor- β (TGF- β), which is important for chondrogenic differentiation.²⁵

It was found that the addition of 0.5% v/v ethanol to the culture medium promoted an increase in the percentage of cytoplasm in chondrocytes. At first, this finding may suggest that ethanol induces cellular hypertrophy. However, this suspicion was resolved by measuring the mean diameter of the chondrocytes, which allowed the conclusion that there was no significant difference in chondrocyte size between groups. Thus, it is possible that the increase in the percentage of cytoplasm and also chondrocyte nuclei in the group treated with 0.5% v/v of ethanol occurred because the synthesis of cartilaginous matrix was reduced.

Another finding observed in our study was the smaller number of areas with well-differentiated cartilage in groups treated with 0.25% v/v and 0.5% v/v of ethanol, which is compatible with the finding that ethanol interferes with pathways essential for cartilaginous differentiation.²⁶ This result suggested that ethanol changes the phenotype of

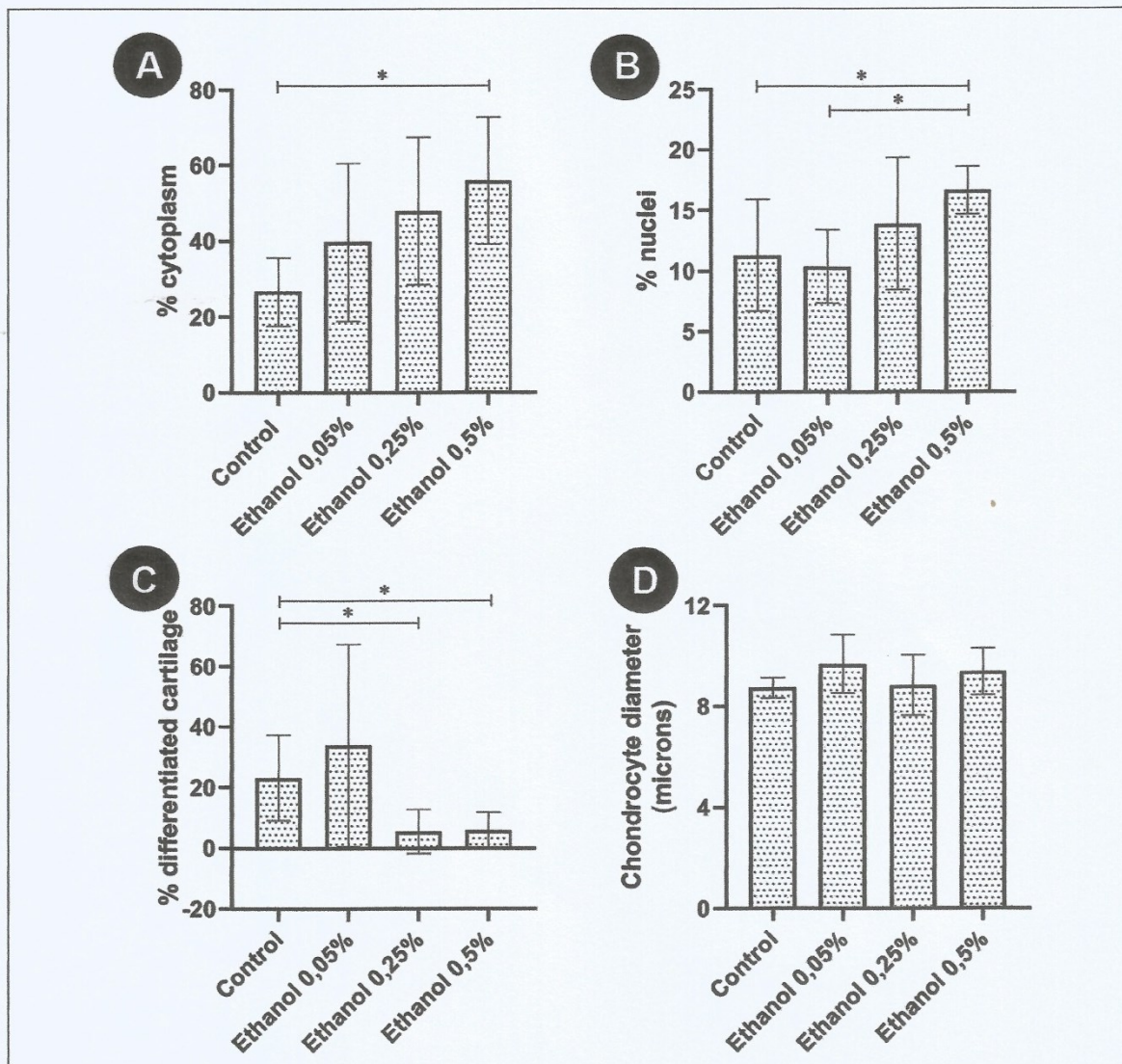


Figure 3. Morphometric analysis of articular chondrocyte pellets of newborn rats cultured without ethanol (control) and with different concentrations of ethanol (0.05% v/v [8.6 mM]; 0.25% v/v [42.9 mM], and 0.5% [85.7 mM]) after 21 days of 3-dimensional culture. **(A)** Group treated with 0.5% ethanol exhibiting a higher percentage of chondrocyte cytoplasm in comparison with the control. **(B)** Group treated with 0.5% ethanol with a higher percentage of chondrocyte nuclei in comparison with the control. **(C)** Group treated with 0.5% ethanol with lower percentage of differentiated matrix in comparison with the control. **(D)** The mean diameter of chondrocytes was similar between groups. * $P < 0.05$ (Student *t* test).

chondrocytes, as evidenced by the lower synthesis of proteoglycans in the extracellular matrix (reduction of PAS+ areas and decreased aggrecan expression) and reduction of chondrocyte maturation (reduction in well-differentiated cartilage areas). In osteoblasts, it was found a reduction in the expression of bone differentiation markers such as osteonectin and type I collagen caused by ethanol.¹⁶

RT-qPCR results revealed that there was less aggrecan gene expression in chondrocytes treated with 0.5% v/v ethanol. Aggrecan is the main structural proteoglycan of the extracellular matrix, and acts by promoting cell-cell and cell-matrix interactions, besides lubricating and conferring resistance to the joint.²⁷ Thus, reduction in aggrecan expression considerably compromises joint function and may be

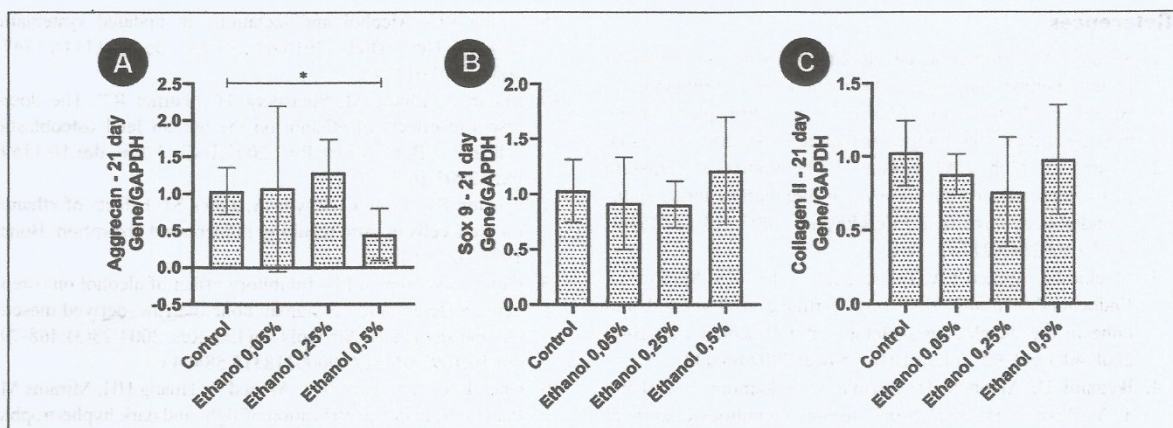


Figure 4. Expression of gene transcripts (mean \pm standard deviation) of aggrecan, *Sox9*, and type II collagen by the real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique in articular chondrocyte of newborn rats cultured without ethanol (control) and with different concentrations of ethanol (0.05% v/v [8.6 mM]; 0.25% v/v [42.9 mM], and 0.5% v/v [85.7 mM]) after 21 days of 3-dimensional culture. (A) Group treated with 0.5% ethanol with a significant reduction of aggrecan expression as compared with control. (B) *Sox9* expression showed no difference between groups. (C) Expression of type II collagen showed no difference between groups. * $P < 0.05$ (Student t test).

indicative of loss of chondrocyte phenotypic characteristics,²⁸ and this may predispose individuals to osteoarthritis.²⁵ The decrease in aggrecan expression may explain the reduction in the percentage of PAS+ matrix, and consequently of proteoglycans, in the group treated with 0.5% v/v ethanol.

Ethanol did not significantly alter the expression of the gene transcript for *Sox9* and type II collagen at any of the studied concentrations. *Sox9* is an essential transcription factor for initial chondrogenic differentiation, cell proliferation, and for the transcription of genes that induce the expression of type II collagen and other extracellular matrix constituents.⁵ In fetal chondrogenesis, the areas of mesenchymal condensation, which expresses *Sox9* are sites of synthesis of cartilage, giving rise to the cartilaginous mold that will be replaced by bone.²⁹ Thus, as the expression of *Sox9* did not differ significantly between groups, it is suggested that ethanol may act directly on later stages of chondrocyte maturation. In addition, it is possible that this is the reason why type II collagen also did not differ between groups, since *Sox9* induces the expression of type II collagen.

It was found reduction in the expression of *Sox9* and type II collagen genes in chondrocytes extracted from individuals with a history of daily ethanol consumption for a period of 20 years. However, the methodology used by the authors was different from ours, since their chondrocytes were extracted from adult individuals who used ethanol, and ethanol was not added to the culture medium of articular chondrocytes extracted from neonates, as in the present study.²⁵

We conclude that ethanol acts directly on *in vitro* cultured articular chondrocytes of neonates, altering chondrocyte

phenotype and synthesis activity, with reduction of alkaline phosphatase activity, differentiated matrix synthesis, PAS+ cartilaginous matrix, and aggrecan expression, and that these effects are dose dependent.

Acknowledgments and Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by grants from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, *Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig)*, and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)*.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.


Ethic Approval

All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal de Minas Gerais, under protocol number 119/2016.

Animal Welfare

The present study followed international, national, and/or institutional guidelines for humane animal treatment and complied with relevant legislation.

ORCID iD

Rogéria Serakides  <https://orcid.org/0000-0001-5374-6242>

References

- Karaplis AC. Embryonic development of bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, eds. Principles of bone biology. 3rd ed. Cambridge: Academic Press; 2008. p. 53-84.
- Adams SL, Cohen AJ, Lassoova L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):635-41. doi:10.1002/jcp.21262
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(1):46-62. doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009
- Ikegami D, Akiyama H, Suzuki A, Nakamura T, Nakano T, Yoshikawa H, *et al.* Sox9 sustains chondrocyte survival and hypertrophy in part through Pik3ca-Akt pathways. *Development.* 2011;138(8):1507-19. doi:10.1242/dev.057802
- Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.* 2003;423(6937):332-6. doi:10.1038/nature01657
- Shi S, Wang C, Acton AJ, Eckert GJ, Trippel SB. Role of Sox9 in growth factor regulation of articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2015;116(7):1391-400. doi:10.1002/jcb.25099
- Yan Q, Feng Q, Beier F. Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(2):144-51. doi:10.1016/j.joca.2011.11.014
- Snow ME, Keiver K. Prenatal ethanol exposure disrupts the histological stages of fetal bone development. *Bone.* 2007;41(2):181-7. doi:10.1016/j.bone.2007.04.182
- Ni Q, Lu K, Li J, Tan Y, Qin J, Magdalou J, *et al.* Role of TGF β signaling in maternal ethanol-induced fetal articular cartilage dysplasia and adult onset of osteoarthritis in male rats. *Toxicol Sci.* 2018;164(1):179-90. doi:10.1093/toxsci/kfy080
- Duggal S, Simpson ME, Keiver K. Effect of chronic ethanol consumption on the response of parathyroid hormone to hypocalcemia in the pregnant rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(1):104-12. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00268.x
- Dörrie N, Föcker M, Freunscht I, Hebebrand J. Fetal alcohol spectrum disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2014;23(10):863-75. doi:10.1007/s00787-014-0571-6
- Ni Q, Wang L, Wu Y, Shen L, Qin J, Liu Y, *et al.* Prenatal ethanol exposure induces the osteoarthritis-like phenotype in female adult offspring rats with a post-weaning high fat diet and its intrauterine programming mechanisms of cholesterol metabolism. *Toxicol Lett.* 2015;238(2):117-25. doi:10.1016/j.toxlet.2015.07.017
- Pan Z, Zhang X, Shangguan Y, Hu H, Chen L, Wang H. Suppressed osteoclast differentiation at the chondro-osseous junction mediates endochondral ossification retardation in long bones of Wistar fetal rats with prenatal ethanol exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;305:234-41. doi:10.1016/j.taap.2016.06.021
- Murillo-Fuentes L, Artillo R, Carreras O, Murillo L. Effects of maternal chronic alcohol administration in the rat: lactation performance and pup's growth. *Eur J Nutr.* 2001;40(4):147-54.
- Giglia RC. Alcohol and lactation: an updated systematic review. *Nutr Diet.* 2010;67:237-43. doi:10.1111/j.1747-0080.2010.01469.x
- Maran A, Zhang M, Spelsberg TC, Turner RT. The dose-response effects of ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res.* 2001;16(2):270-6. doi:10.1359/jbmr.2001.16.2.270
- Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jobes SJ. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone.* 1995;16(1):143-7.
- Gong Z, Wezeman FH. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(3):468-79. doi:10.1097/01.ALC.0000118315.58404.C1
- Chen KS, Tatarczuch YA, Ahmed Y, Huang HH, Mirams M, Pagel CN, *et al.* Identification of light and dark hypertrophic chondrocytes in mouse and rat chondrocyte pellet cultures. *Tissue Cell.* 2010;42(2):121-8. doi:10.1016/j.tice.2010.02.003
- Hellingman CA, Davidson EN, Koevoet W, Vitters EL, van den Berg WB, van Osch GJ, *et al.* Smad signaling determines chondrogenic differentiation of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: inhibition of smad1/5/8p prevents terminal differentiation and calcification. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(7-8):1157-67. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0043
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Assis HA, Elert NC, Azevedo ALBP, Braga IS, Serakides R, Ocarino NM, *et al.* Dose-dependent effect of triiodothyronine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from the bone marrow of female rats. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(1):89-100. doi:10.1111/jphp.12842
- Bloise E, Couto HL, Massai L, Ciarmela P, Mencarelli M, Borges LE, *et al.* Differential expression of follistatin and FLRG in human breast proliferative disorders. *BMC Cancer.* 2009;9:320. doi:10.1186/1471-2407-9-320
- Bassleer C, Gysen PH, Foidart JM, Bassleer R, Franchimont P. Human chondrocytes in tridimensional culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1986;22(3 Pt 1):113-9.
- Qin X, Jin P, Jiang T, Li M, Tan J, Wu H, *et al.* A human chondrocyte-derived in vitro model of alcohol-induced and steroid-induced femoral head necrosis. *Med Sci Monit.* 2018;24:539-47. doi:10.12659/MSM.907969
- Roper PM, Abbasnia P, Vuchkovska A, Natoli RM, Callaci JJ. Alcohol-related deficient fracture healing is associated with activation of FoxO transcription factors in mice. *J Orthop Res.* 2016;34(12):2106-15. doi:10.1002/jor.23235
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* 2002;12(1):19-32. doi:10.1038/sj.cr.7290106
- Stewart MC, Saunders KM, Burton-Wurster N, Macleod JN. Phenotypic stability of articular chondrocytes in vitro: the effects of culture models, bone morphogenetic protein 2, and serum supplementation. *J Bone Miner Res.* 2000;15(1):166-74. doi:10.1359/jbmr.2000.15.1.166
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage.* 2000;8(5):309-34. doi:10.1053/joca.1999.0306

ANEXO C - Preparo do meio de cultivo indiferenciado (DMEM).

- Diluir um “sachê” de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* baixa glicose (Gibco, Invitrogen, NY, USA) em 800 ml de água ultrapura + 2g de bicarbonato de sódio 7,5%.
- Após homogeneizar a mistura, acertar o pH para 7,2.
- Acrescentar 60mg de gentamicina.
- Acrescentar 10 ml de PSA (penicilina 10.000 un/ml + estreptomicina 1.000 µg/ml + anfotericina 25 µg/ml).
- Completar o volume final da solução para 1000 ml e filtrar em bomba a vácuo com membrana de 0,22 µm antes de armazenar em geladeira.

ANEXO D - Preparo do meio de cultivo condrogênico (para 100 ml).

- 99 ml de DMEM.
- 1 ml de soro fetal bovino.
- 0,0125g de albumina sérica bovina.
- 1 µl de piruvato de sódio (100 µM).
- 65 µl de transferrina (5 µg/ml).
- 10 µl de dexametasona (4 mg/ml).
- 200 µl de insulina (100 un/ml).
- Homogeneizar tudo e filtrar em bomba a vácuo com membrana de 0,22 µm antes de armazenar em geladeira.
- No dia do uso, acrescentar 4,3 µl de ácido ascórbico (50 mg/ml) e filtrar novamente antes de utilizar nas células.

ANEXO E - Preparo do meio condrogênico contendo etanol (para 100 ml).

- Foram utilizados: meio condrogênico descrito no Anexo 4 e etanol absoluto para análise (Merck, Millipore Corporation, Alemanha).
- Grupo leve (0,05% v/v): 0,05 ml de etanol diluído em 99,95 ml de meio condrogênico.
- Grupo moderado (0,25% v/v): 0,25 ml de etanol diluído em 99,75 ml de meio condrogênico.
- Grupo intenso (0,5% v/v): 0,5 ml de etanol diluído em 99,5 ml de meio condrogênico.

ANEXO F - Metodologia para processamento do *pellet* de condrócitos.

Parafomaldeído 4%	20 minutos
Álcool 70%	1 hora
Álcool 80%	1 hora
Álcool 90%	1 hora
Álcool absoluto	30 minutos
Álcool absoluto	30 minutos
Xilol	5 minutos
Parafina	Inclusão

ANEXO G - Protocolo para gelatinizar lâminas.

Reagentes:

10g de gelatina em pó (*Gelatin* – 48723, Sigma-Aldrich)
 1g de sulfato de crômio III e potássio
 2L de água destilada aquecida

Modo de preparo:

Aquecer a água e colocar gelatina até dissolver por completo (solução transparente)
 Adicionar sulfato de crômio III e potássio (solução esverdeada) e filtrar.

Água destilada Mergulhar 2 x
 Solução de gelatina 30 minutos
 Secar ao ar livre em local livre de poeira por 24 horas.

ANEXO H - Protocolo de coloração por PAS.

Solução de ácido periódico

Ácido periódico 1g
 Água Destilada. 100mL

Reagente de Schiff

Fucsina básica 1 g
 Água destilada a 55oc 200 ml
 Bissulfato de sódio ou
 metabissulfito de potássio 2g
 1 Normal de ácido clorídrico 10ml

Obs.: O reativo de schiff deve ser transparente. Se estiver rosado é recomendado fazer um teste para avaliar a coloração. Caso não marque, o ideal é descartar, pois pode ter ocorrido contaminação.

Estufa 60°C 15 minutos
 Xilol I 10 minutos
 Xilol II 10 minutos
 Álcool Absoluto I 10 minutos
 Álcool Absoluto II 10 minutos
 Álcool Absoluto III 10 minutos
 Álcool 90% 10 minutos
 Álcool 80% 10 minutos
 Água Destilada 3 minutos
 Ácido periódico 10 minutos
 Água destilada 2 segundos
 Reativo de schiff 20 minutos
 Água corrente 10 minutos
 Hematoxilina 1 minutos
 Água corrente 10 minutos
 Álcool 95% 20 segundos

Álcool 95%	20 segundos
Álcool Absoluto I	10 minutos
Álcool Absoluto II	10 minutos
Álcool Absoluto III	10 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos

Montar a lâmina com bálsamo.

ANEXO I - Extração de RNA total com trizol.

- Após lavar os tubos com solução tampão, adicionar 1 ml de Trizol, homogeneizar manualmente e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- Transferir o conteúdo Trizol + células para microtubos de 1,5 ml.
- Adicionar 200 µL de clorofórmio/microtubo, agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos no gelo.
- Centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm (4°C).
- Transferir a fase aquosa para outro microtubo.
- Adicionar 500 µL de isopropanol e incubar por 30 minutos a -80°C.
- Descongelar no gelo e centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm (4°C).
- Retirar o sobrenadante e colocar em outro microtubo. Acondicionar o *pellet* no gelo e centrifugar o sobrenadante por 10 minutos a 12000 rpm (4°C).
- Descartar o sobrenadante e lavar os *pellets* com 1 ml de etanol 75%.
- Centrifugar por 5 minutos a 10500 rpm (4°C).
- Secar o *pellet* e dissolver em água DEPC (20 µL).
- Colocar todos os tubos no termobloco a 56°C durante 10 minutos.
- Dosar o RNA em NanoVue™.

ANEXO J - Síntese do cDNA.

- Kit utilizado: Kit Super Script III Platinum Two-Step qPCR com SYBR Green (cat. n. 11735-032).
- Obs. 1: Antes de sintetizar o cDNA, fazer a dosagem do RNA em espectrofotômetro e calcular a quantidade de RNA que será necessária para fazer o MIX.
- Obs. 2: Concentração de RNA - 1µg de RNA total.
 Ex.: a dosagem de um determinado RNA foi: 400 µg/1000 µL

$$\frac{400 \mu\text{g}}{1 \mu\text{g}} = \frac{1000 \mu\text{L}}{x}$$

$$x = 2,5 \mu\text{L de RNA}$$
- Assim colocar 2,5 µL de RNA + 5,5 µL de água DEPC, pois o volume total (RNA + água) é de 8 µL.

Preparar o Master MIX :

Master Mix	1x	Ex.: 5x
2x RT reaction MIX	10 μ L	50 μ L
RT enzyme MIX	2 μ L	10 μ L
RNA	2 μ L	---
Água DEPC	6 μ L	---

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 12 μ L de MIX em cada tubo e acrescentar 8 μ L de RNA + água DEPC (um por amostra).

- Fazer um *spin* nos tubos e colocá-los no Termociclador programado da seguinte forma: 25°C por 10 minutos; 42°C por 50 minutos; 85°C por 5 minutos e *hold* a 4°C
- Colocar no gelo as amostras e adicionar 1 μ L de RNase por tubo. Colocá-los no Termociclador novamente programado para 37°C por 20 minutos e *hold* a 4°C
- Estocar o cDNA a -20°C.

ANEXO K - RT-qPCR tempo real.

- Kit utilizado: kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Recomendação do kit: volume final de reação de 50 μ L, porém faz-se 25 μ L de volume final, ou seja, 2,5 μ L de cDNA para 25 μ L de reação.

- Preparar o Mix:

MIX	1x	Ex.: 6x
<i>SYBR Green</i>	12,5 μ L	75 μ L
<i>Primer forward</i>	1 μ L	6 μ L
<i>Primer reverse</i>	1 μ L	6 μ L
<i>Rox</i>	1 μ L	6 μ L
cDNA	2,5 μ L	-----
Água DEPC	7,0 μ L	42 μ L

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 22,5 μ L de MIX em cada tubo e acrescentar 2,5 μ L de cDNA (um por amostra) ou 2,5 μ L de água DEPC (controle negativo).
Diluição do Rox: 1 μ L do Rox concentrado para 9 μ L de água DEPC
Preparar um MIX para cada *primer*, sendo que se coloca primeiro a água DEPC, segundo o *SYBR Green*, terceiro o *Rox* e depois os *primers forward* e *reverse*.

Programação da máquina de RT-PCR:

Etapa	Repetições	Temperatura	Tempo
Ativação da enzima	1	50°C	2 minutos
PCR (ciclos)	45	95°C	15 segundos
		60°C	30 segundos