

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias

**EFEITOS DO HIPERTIREOIDISMO MATERNO PRÉ- E PÓS-NATAL SOBRE
O CRESCIMENTO ENDOCONDAL E INTRAMEMBRANOSO DA PROLE
DE RATOS: ESTUDOS IN VITRO COM CONDRÓCITOS E OSTEÓBLASTOS**

Fabiana Rocha Araújo

Belo Horizonte, 2022

Fabiana Rocha Araújo

**Efeitos do hipertireoidismo materno pré- e pós-natal sobre o
crescimento endocondral e intramembranoso da prole de ratos:
estudos in vitro com condrócitos e osteoblastos**

Tese apresentada à Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Ciência Animal.

Área: Patologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria
Serakides

Coorientadoras: Profa. Dra. Natália Melo
Ocarino e Profa. Dra Danusa Dias Soares

Belo Horizonte, 2022

A663e

Aratijo, Fabiana Rocha, 1990-

Efeitos do hipertireoidismo materno pré – e pós-natal sobre o crescimento endocondral e intramembranoso da prole de ratos: estudos in vitro com condrócitos e osteoblastos / Fabiana Rocha Aratijo. – 2022.

139 f.

Orientadora: Rogéria Serakides

Coorientadoras: Natália Melo Ocarino

Danusa Dias Soares

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora.

Bibliografias: f. 94 a 125.

1. Rato como animal de laboratório - Teses - 2. Hormônios tireoidianos - Teses - 3. Hipertireoidismo - Teses - I. Serakides, Rogéria - II. Ocarino, Natália Melo - III. Soares, Danusa Dias - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

FABIANA ROCHA ARAÚJO

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 23 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

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

Dr.(a). Natalia de Melo Ocarino

Dr.(a). Bruno Machado Bertassoli

Dr.(a). Juneo de Freitas Silva

Dr.(a). Jankerle Neves Boeloni

Dr.(a). Lorena Gabriela Rocha Ribeiro



Documento assinado eletronicamente por Rogéria Serakides, Professora do Magistério Superior, em 23/02/2022, às 13:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Natalia de Melo Ocarino, Professora do Magistério Superior, em 23/02/2022, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Bruno Machado Bertassoli, Usuário Externo, em 23/02/2022, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Jankerle Neves Boeloni, Usuário Externo, em 23/02/2022, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Juneo Freitas Silva, Usuário Externo, em 23/02/2022, às 15:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Lorena Gabriela Rocha Ribeiro, Usuário Externo, em 24/02/2022, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.743, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1256538 e o código CRC E3155317.

Aos meus pais, Fábio e Silvana, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, Marta e Daniel, pelo incentivo e por serem exemplo.

Ao Ricardo pelo amor, parceria e paciência.

Ao Davi, por ser fonte de inspiração.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me auxiliaram diretamente na construção desse trabalho e foram essenciais para a conclusão dessa tese. Tantas outras estiveram nos bastidores, me fortalecendo para que eu pudesse trilhar esse caminho até aqui. Talvez eu não consiga expressar toda minha gratidão por meio de palavras, mas saibam que sem vocês nada disso seria possível.

Primeiro agradeço a Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Professora Rogéria Serakides, minha orientadora, que me ensinou tanto sobre patologia, pesquisa, docência, escrita acadêmica (e tantos outros temas) ao longo desses quatro anos. Muito obrigada pela paciência em ensinar e pela dedicação que coloca em tudo o que faz. Obrigada também pelo apoio nos momentos difíceis e pelos conselhos. A soma de tudo isso foi crucial para o meu crescimento profissional e pessoal e vou levar para sempre essas lembranças comigo.

A Professora Natália Ocarino, minha co-orientadora, que sempre esteve disposta a ajudar com soluções para os problemas que apareceram ao longo do caminho da pesquisa. Suas sugestões enriqueceram o trabalho. Muito obrigada pela parceria, pelos ensinamentos valiosos e por todas as oportunidades que me proporcionou durante essa jornada.

Ao Bruno, pós doutorando, que foi meu braço direito na condução dos experimentos. Obrigada por “pegar no chifre” junto comigo, por segurar a barra quando as coisas apertaram e por ser meu ombro amigo nos momentos difíceis. Você com sua tranquilidade extrema equilibrou minha preocupação extrema e os opostos que poderiam dar muito errado, resultaram em muito trabalho e diversão.

Aos amigos e colegas do Núcleo de Células Tronco e Terapia (NCT-TCA) que compartilharam aprendizado, vivências com os experimentos, aulas e artigos. Que compartilharam momentos de tensão e alegrias. Vocês formaram uma excelente equipe e tornaram os dias mais felizes. Em especial: Bruno, Bruna, Débora, Douglas, Camila, Fabrício, Natália, Gabriela, Lorena, Leo e Kênia. Cada um de vocês teve um papel importante ao longo desses quatro anos.

A aluna de iniciação científica, Isabela, agradeço pelo apoio e ajuda.

Agradeço também aos colegas e amigos do Setor de Patologia: Ana Carolina, Carol, Mateus, Matheus Loes, Ágna, Clarissa, Samantha, Daniel, Pâmela, Sóstenes, Lucas, Cadu, Paula, Aysa, Heloísa, Ricardo, Marcelo, Jefferson, Monique e Thaynara por compartilharem bons momentos e muito aprendizado.

À Professora Danusa, co-orientadora, e todos do LAFISE pelos ensinamentos que foram cruciais no início do doutorado.

À Professora Amanda, pelo auxílio na realização do RT-qPCR e pelos bons momentos e conselhos compartilhados no laboratório.

Aos professores do Setor de Patologia da Escola de Veterinária da UFMG, Felipe Pierezan, Natália de Melo Ocarino, Renato de Lima Santos, Roberto Guedes, Rogéria Serakides e Roselene Ecco pelos quais tenho muita admiração e enorme gratidão por todos os ensinamentos.

Aos professores Juneo Freitas Silva e Lorena Gabriela Rocha Ribeiro pelo auxílio com dúvidas sobre padronização e execução de alguns procedimentos.

Às técnicas do laboratório de histopatologia, em especial Leimar e Natália, e ao técnico da Necropsia, Luiz, agradeço pelo auxílio, carinho e convivência.

A todos os funcionários da Escola de Veterinária da UFMG que em algum momento foram imprescindíveis para boa execução do trabalho: aos funcionários da portaria, em especial Valmiro e Iago; aos funcionários da lavanderia e esterilização, em especial Guedes e João; aos funcionários da limpeza, em especial Vitalina.

Aos membros da banca, pela disponibilidade em avaliar a tese e pela contribuição.

Aos animais, que fizeram parte da pesquisa em prol da ciência, para melhoria de vida dos seres humanos e de outros animais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Foram realizados dois experimentos distintos para avaliar a patogênese dos efeitos do hipertireoidismo materno sobre o crescimento endocondral e intramembranoso da prole de ratos por meio de estudos *in vitro* com condrócitos das epífises femorais (estudo 1) e com osteoblastos da calvaria (estudo 2). Estas células foram colhidas de ratos neonatos filhos de mães com hipertireoidismo induzido e de neonatos filhos de mães controle, constituindo assim dois grupos. No estudo 1, as culturas 2D de condrócitos de ambos os grupos foram submetidas aos ensaios de viabilidade pelo MTT e de fosfatase alcalina (FA) pelo BCIP/NBT aos 7, 14 e 21 dias. Os *pellets* de condrócitos cultivados em 3D por 21 dias foram processados pela técnica de inclusão em parafina. Secções foram coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliar a morfologia e o percentual de áreas PAS+. A expressão dos transcritos gênicos para *Col2* e *ColX*, *agrecan*, *Sox9* e *Runx2* foi avaliada por RT-PCR em tempo real aos 21 dias. No estudo 2, para ambos os grupos, foram realizados os ensaios de proliferação pelo MTT e da atividade de FA pelo BCIP/NBT aos 7, 14 e 21 dias. Aos 21 dias, a área total de matriz mineralizada corada pelo Von Kossa foi avaliada por morfometria e a expressão dos transcritos gênicos para *Runx2*, *Bmp2*, *Fgfr1*, *Coll*, osteocalcina (*Oc*) e osteopontina (*Op*) foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Em ambos os estudos, as médias foram comparadas pelo teste t de Student. No estudo 1, não houve diferença significativa entre os grupos nos ensaios de MTT e FA. O hipertireoidismo materno não alterou a morfologia dos condrócitos, mas reduziu significativamente o percentual de áreas PAS+ e a expressão dos transcritos gênicos para *Col2* e *agrecan* e aumentou a expressão de *Sox9*. No estudo 2, a atividade da fosfatase alcalina foi significativamente maior aos 14 e 21 dias nas culturas de osteoblastos extraídos dos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno, enquanto a conversão de MTT foi significativamente menor aos 21 dias neste grupo. As culturas de osteoblastos dos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno também apresentaram maior área total de matriz mineralizada e maior expressão dos transcritos gênicos para *Oc* e *Op*. Conclui-se que o hipertireoidismo materno altera de forma distinta os condrócitos e os osteoblastos da prole, reduzindo a síntese de áreas PAS+ e a expressão de transcritos gênicos para *Col2* e *agrecan* na cartilagem e aumentando nos osteoblastos a atividade de síntese de matriz, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão dos transcritos gênicos para *osteocalcina* e *osteopontina*, podendo ser esses alguns dos mecanismos pelos quais

há, respectivamente, redução do crescimento endocondral e fechamento precoce das suturas da prole de mães com hipertireoidismo.

Palavras-chave: disfunção tireoidiana, gestação, crescimento endocondral, crescimento intramembranoso, craniossinostose, ossificação, rato.

ABSTRACT

Two different experiments were performed to evaluate the pathogenesis of effects of maternal hyperthyroidism on endochondral and intramembranous growth in rat offspring by means of in vitro studies with chondrocytes from femoral epiphyses (study 1) and with osteoblasts from calvaria (study 2). These cells were harvested from neonatal rats born to mothers with induced hyperthyroidism and from neonates born to control mothers, thus constituting two groups. In study 1, 2D chondrocyte cultures from both groups were subjected to viability assays by MTT and alkaline phosphatase (AP) assays by BCIP/NBT at 7, 14 and 21 days. Chondrocyte pellets cultured in 3D for 21 days were processed by paraffin embedding technique. Sections were stained by periodic Schiff's acid (PAS) to assess morphology and the percentage of PAS+ areas. The expression of gene transcripts for collagen type II and X, aggrecan, *Sox9* and *Runx2* was evaluated by real-time RT-PCR at 21 days. In study 2, for both groups, proliferation assays were performed by MTT and AF activity by BCIP/NBT at 7, 14 and 21 days. At 21 days, the total area of mineralized matrix stained by Von Kossa was evaluated by morphometry and the expression of gene transcripts for *Runx2*, *Bmp2*, *Fgfr1*, type 1 collagen (*Coll1*), osteocalcin (*Oc*) and osteopontin (*Op*) was evaluated by real-time RT-PCR. In both studies, means were compared by Student's t-test. In study 1, there was no significant difference between the groups in MTT and FA assays. Maternal hyperthyroidism did not alter chondrocyte morphology, but significantly reduced the percentage of PAS+ areas and the expression of gene transcripts for type II collagen and aggrecan and increased *Sox9* expression. In study 2, alkaline phosphatase activity was significantly higher at 14 and 21 days in osteoblast cultures extracted from neonates exposed to maternal hyperthyroidism, while MTT conversion was significantly lower at 21 days in this group. Osteoblast cultures from neonates exposed to maternal hyperthyroidism also showed greater total mineralized matrix area and higher expression of gene transcripts for *Oc* and *Op*. It is concluded that maternal hyperthyroidism alters differently the chondrocytes and osteoblasts of the offspring, reducing the synthesis of PAS positive areas and the expression of gene transcripts for collagen type II and aggrecan in cartilage and increasing in osteoblasts, the matrix synthesis activity, This may be some of the mechanisms by which there is, respectively, reduced endochondral growth and early suture closure in the offspring of mothers with hyperthyroidism.

Keywords: thyroid dysfunction, gestation, endochondral growth, intramembranous growth, craniosynostosis, ossification, rat.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática das etapas iniciais da condrogênese com as principais proteínas da MEC que auxiliam na condensação mesenquimal e na diferenciação condrogênica. MEC= matriz extracelular..... 22
- Figura 2. Estágios da ossificação endocondral e genes associados. As células mesenquimais agregam-se no futuro local de formação óssea, se diferenciam em condroblastos e depositam a MEC, enquanto as células da camada externa se diferenciam em células pericondriais e formam o pericôndrio. Os condrócitos do centro do molde cartilaginoso se tornam hipertróficos e ocorre invasão vascular carreando osteoclastos e condroclastos, que degradam a MEC. As células osteoprogenitoras gradualmente substituem a matriz cartilaginosa por osso, formando o centro de ossificação primário. No detalhe, as zonas da placa de crescimento com os principais genes associados. MEC= matriz extracelular..... 26
- Figura 3. Representação esquemática da placa de crescimento com as diferentes zonas..... 28
- Figura 4. Esquema dos principais fatores sistêmicos e locais que agem na placa de crescimento. O hormônio do crescimento (GH) e os hormônios tireoidianos (HT) estimulam a secreção de diferentes fatores de crescimento pelos condrócitos que agem regulando sua proliferação e hipertrofia. Setas indicam as vias estimulatórias e as linhas cruzadas indicam as vias inibitórias..... 33
- Figura 5. Representação esquemática dos ossos da calota craniana e suas respectivas origens embrionárias. F: frontal. P:parietal. IP:interparietal..... 35
- Figura 6. Representação esquemática dos principais centros de ossificação da calota craniana e as direções de crescimento (setas). A. Vista superior da calota craniana. B. Vista lateral da calota craniana..... 38
- Figura 7. Representação esquemática das suturas e fontanelas da calota craniana de um recém-nascido..... 41
- Figura 8. Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Níveis baixos dos hormônios tireoidianos (HTs) no sangue são detectados pelo hipotálamo e pela hipófise. O hormônio liberador da tireotropina (TRH) é liberado pelo hipotálamo, estimulando a hipófise a liberar o

hormônio estimulador da tireoide (TSH). O TSH estimula a tireoide a produzir os HTs, que agem no osso principalmente via TR α 1. Por outro lado, níveis elevados de HTs no sangue inibem a liberação de TRH e TSH.....	47
Figura 9. Desenho esquemático dos tipos de craniossinostose.....	60
Figura 10. Concentrações plasmáticas de T4 livre (média \pm desvio padrão) das ratas mães dos grupos controle e com hipertireoidismo * P <0,05 (teste t de Student).....	68
Figura 11. Altura do epitélio folicular (μ m) da tireoide (média \pm desvio padrão) dos ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno * P <0,05 (teste t de Student).....	69
Figura 12: Conversão de MTT em cristais de formazan (média \pm desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student).....	70
Figura 13. Atividade da fosfatase alcalina (média \pm desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student).....	71
Figura 14. A) Fotomicrografia da cultura 3D de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno com redução das áreas PAS+ no grupo hipertireoidismo, aos 21 dias. Coloração ácido periódico-Schiff (PAS). (B) Porcentagem de áreas PAS+ em cultura 3D de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student).....	72
Figura 15. Expressão de transcritos gênicos (média \pm desvio padrão) de <i>Acan</i> , <i>Col2</i> , <i>Col10</i> , <i>Runx2</i> e <i>Sox9</i> pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em cultura 3D de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student).....	73
Figura 16. A) Concentrações plasmáticas de T4 livre (média \pm desvio padrão) das ratas mães dos grupos controle e com hipertireoidismo * P <0,05 (teste t de Student). B) Altura do epitélio folicular (μ m) da tireoide (média \pm desvio padrão) dos ratos neonatos controle	

e com exposição ao hipertireoidismo materno * P <0,05 (teste t de Student)..... 86

Figura 17. (A) Fotomicrografia da redução do MTT em cristais de formazan. (B) Conversão de MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas bidimensionais de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student)..... 87

Figura 18. (A) Fotomicrografia da atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT. (B) Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas bidimensionais de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student)..... 88

Figura 19. (A) Fotomicrografia da cultura de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno com aumento da área total de matriz mineralizada aos 21 dias. Coloração Von Kossa. (B) Área total de matriz mineralizada de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student)..... 89

Figura 20. Expressão de transcritos gênicos (média ± desvio padrão) de *Runx2*, *BMP2*, *Fgfr1*, *Coll*, *osteocalcina* e *osteopontina* pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) em osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * P <0,05 (teste t de Student)..... 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de transcritos gênicos e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR Tempo Real	67
Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR Tempo Real	85

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO 1	20
REVISÃO DE LITERATURA	20
1. Formação e crescimento ósseos.....	20
1.1 Ossificação endocondral.....	20
1.2 Crescimento ósseo endocondral pós-natal.....	27
1.3 Ossificação intramembranosa pré-natal.....	34
1.4 Crescimento ósseo intramembranoso pós-natal	40
2. Hormônios tireoidianos	45
2.1 Transferência dos hormônios tireoidianos da mãe para o feto	47
3. Hormônios tireoidianos na ossificação endocondral e intramembranosa	49
3.1 Ação dos hormônios tireoidianos na ossificação endocondral	49
3.2 Ação dos hormônios tireoidianos na ossificação intramembranosa.....	51
4. Disfunções tireoidianas em gestantes e indivíduos em crescimento	52
4.1 Hipotireoidismo e alterações do crescimento ósseo	52
4.2 Hipertireoidismo e alterações do crescimento ósseo.....	55
4.2.1 Craniossinostose	57
CAPÍTULO 2	61
INTRODUÇÃO.....	62
MATERIAL E MÉTODOS.....	64
Acasalamento e administração de tiroxina	64
Dosagem plasmática materna de T4 livre.....	64
Processamento e análise histomorfométrica da tireoide dos neonatos	65
Isolamento e cultivo de condrócitos dos neonatos	65
Teste de viabilidade celular (conversão de MTT em cristais de Formazan).....	66
Atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT	66

Análise do teor de glicosaminoglicanos	66
Avaliação da expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR tempo real.....	67
Análise estatística	67
RESULTADOS	68
Concentração plasmática materna de T4 livre.....	68
Altura do epitélio folicular da tireoide dos neonatos.....	68
Viabilidade dos condrócitos (conversão de MTT em cristais de formazan)	69
Atividade da fosfatase alcalina dos condrócitos.....	70
Morfologia dos condrócitos e conteúdo de proteoglicanos da matriz	71
Expressão de transcritos gênicos	73
DISCUSSÃO	73
CAPÍTULO 3	78
INTRODUÇÃO.....	79
MATERIAL E MÉTODOS.....	81
Acasalamento e administração de tiroxina	81
Comprovação do hipertireoidismo materno e da influência dele sobre os neonatos..	82
Isolamento e cultivo dos osteoblastos da calvária dos neonatos	82
Teste de Conversão de MTT em cristais de Formazan	83
Atividade da Fosfatase Alcalina pelo método BCIP/NBT	83
Determinação da área total de matriz mineralizada.....	84
Avaliação da expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR tempo real.....	84
Análise estatística	85
RESULTADOS	85
Comprovação do hipertireoidismo materno	85
Conversão de MTT em cristais de formazan.....	86
Atividade da Fosfatase Alcalina pelo método BCIP/NBT	88
Determinação da área total de matriz mineralizada.....	89

Avaliação da expressão dos transcritos gênicos	90
DISCUSSÃO	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	125
Anexo 1: Certificado de aprovação do CEUA	125
Anexo 2: Preparo da solução de tiroxina (50µg/5mL) para indução do hipertireoidismo.....	129
Anexo 3: Meio para cultivo de célula tronco indiferenciada (DMEM)	129
Anexo 5: Meio osteogênico	130
Anexo 6: Extração e digestão enzimática de cartilagem para obtenção de condrócitos.	130
Anexo 7: Extração de osteoblastos da calvária	131
Anexo 8: Tripsinização e contagem de células	132
Anexo 9: Ensaio de MTT	133
Anexo 10: Ensaio da Fosfatase Alcalina	134
Anexo 11: Processamento dos <i>pellets</i>	134
Anexo 12: Coloração de ácido periódico de Schiff (PAS).....	135
Anexo 13: Coloração Von Kossa	135
Anexo 14: Extração de RNA total.....	136
Anexo 15: Síntese de cDNA.....	136
Anexo 16: RT-qPCR tempo real	137

INTRODUÇÃO

A tireoide, por meio da ação dos hormônios tireoidianos, é essencial para a formação e o crescimento do esqueleto. O principal hormônio secretado pela tireoide é a tiroxina (T₄), que é convertida em triiodotironina (T₃) pela atividade das enzimas iodotironina desidase D1 e D2 (Bassett e Williams, 2003). Os hormônios tireoidianos (HTs) atuam diretamente no osso, por meio de receptores nucleares específicos (TR α e TR β), que modulam o desenvolvimento e o metabolismo desse órgão (Wojcicka *et al.*, 2013). Dessa forma, alterações nos níveis séricos dos HT, como acontecem no hipo e no hipertireoidismo, podem resultar em um série de alterações na formação e no crescimento ósseo (Waung *et al.*, 2012; Wojcicka *et al.*, 2013; Bassett e Williams, 2018).

As disfunções tireoidianas podem ocorrer em qualquer fase da vida, mas são comuns durante a gestação. O hipertireoidismo materno tem incidência estimada de 0,2%, podendo chegar até 2,5% quando são considerados os casos de hipertireoidismo materno subclínico (Taylor *et al.*, 2018). O hipertireoidismo materno pode levar ao desenvolvimento fetal anormal, uma vez que ocorre passagem transplacentária de T₄, e os HT têm ação crítica em todos os sistemas, particularmente sob a formação e o crescimento ósseo (Brent, 2000; Bassett e Williams, 2016; Gouveia *et al.*, 2018).

Durante o desenvolvimento esquelético, a formação óssea ocorre através de dois mecanismos independentes e distintos. Os ossos do crânio, da pelve e o terço lateral do clavícula, formam-se por ossificação intramembranosa, na qual células tronco mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Por outro lado, a maioria dos ossos, inclusive os ossos longos, se formam por meio da formação óssea endocondral, na qual há o desenvolvimento de um molde cartilaginoso, a partir do processo de condrogênese, que será posteriormente substituído por osso (Williams e Bassett, 2018).

Os precursores mesenquimais se diferenciam em condrócitos, que proliferam e secretam uma matriz contendo colágeno tipo II (COL2) e proteoglicanos, formando o molde de cartilagem. Os condrócitos se proliferam, diferenciam em condrócitos hipertróficos e sofrem apoptose. Posteriormente, ocorre invasão vascular e migração de osteoblastos, formando o centro de ossificação primário. Mais tardiamente, formam-se os centros de ossificação secundária nas extremidades dos ossos longos, que permanecem separados do centro de ossificação primária pela placa epifisária, onde a ossificação endocondral continua até a vida adulta (Bassett e Williams, 2018; Williams e Bassett, 2018). O

crescimento ou ossificação intramembranosa, por sua vez, tem início com a condensação das células tronco mesenquimais que progressivamente se diferenciam em osteoblastos, responsáveis por secretar a matriz osteoide, rica em colágeno tipo I (COL1), que posteriormente mineraliza dentro dos centros de ossificação (Bassett e Williams, 2016; Williams e Bassett, 2018).

Bebês expostos ao hipertireoidismo materno apresentam menor comprimento ao nascimento quando comparados à bebês nascidos de mães eutireoideas (Ohrling *et al.*, 2014). Da mesma forma, camundongos com fenótipo de hipertireoidismo apresentam comprimento ósseo encurtado (O'Shea *et al.*, 2003). Estudos prévios demonstraram que o excesso de tiroxina materna reduz o crescimento ósseo da prole por causar várias alterações na cartilagem articular e na placa epifisária dos ossos longos, dentre elas, a de inibir a proliferação de condrócitos, estimular a hipertrofia dos condrócitos da placa epifisária e alterar a composição da matriz extracelular (Ribeiro *et al.*, 2018a).

Contudo, o hipertireoidismo materno não só afeta a ossificação endocondral, como também a ossificação intramembranosa. A circunferencia do crânio de bebês expostos ao hipertireoidismo materno é significativamente menor do que em bebês de mães eutireoideas (Ohrling *et al.*, 2014). Essa redução está relacionada ao fechamento precoce das suturas cranianas (Rasmussen *et al.*, 2007; Carmichael *et al.*, 2015). Howie *et al.*, (2016) demonstraram que filhotes de camundongos expostos ao hipertireoidismo materno apresentam alteração na morfologia cranial (Ohrling *et al.*, 2014), com expressão elevada de marcadores da osteogênese, como o Runx2 e a fosfatase alcalina nas suturas cranianas.

O processo de formação e crescimento ósseo envolve uma ação coordenada e complexa de proliferação, diferenciação e atividade de vários tipos de células, incluindo condrócitos e osteoblastos (Maes e Kronenberg, 2012). Avanços na compreensão da biologia celular foram possibilitados pelo uso de vários modelos de cultura *in vitro*, que permitem uma melhor compreensão da fisiopatologia das células envolvidas (Jackson, Sundquist e Marks, 1996; Czekanska *et al.*, 2012). Embora haja pesquisas que demonstraram os efeitos da adição dos hormônios tireoidianos em culturas de condrócitos (Bohme *et al.*, 1992; Alini *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2002; Robson *et al.*, 2002) e osteoblastos (Ernst e Froesch, 1987; Ohishi *et al.*, 1994; Cray *et al.*, 2013), esse parece ser o primeiro estudo que investigou as culturas de condrócitos e de osteoblastos extraídos de ratos filhos de mães com hipertireoidismo durante a gestação.

Neste contexto, o que se pretende é ampliar os conhecimentos, por meio de estudos com condrócitos e osteoblastos de neonatos submetidos ao hipertireoidismo materno, uma vez que os resultados *in vitro* limitam-se aos efeitos diretos do hormônio, sem levar em consideração seu efeito em todo o organismo, e principalmente neste caso, em que o excesso do hormônio tireoidiano passa da mãe para o feto, através da placenta.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Formação e crescimento ósseos

O processo pelo qual o osso se forma é chamado ossificação ou osteogênese. A ossificação pode ocorrer a partir de moldes cartilagosos, conhecida como ossificação endocondral, ou a partir de moldes membranosos, denominada ossificação intramembranosa (Setiawati e Rahardjo, 2018). A ossificação endocondral é responsável pela formação dos ossos longos, dos ossos da base do crânio, da mandíbula, das costelas e das vértebras (Olsen *et al.*, 2000; Provot *et al.*, 2008). Mas, a calota craniana, a escápula e o ílio são formados por ossificação intramembranosa (Leitch, Bassett e Williams, 2020). A clavícula é formada tanto por ossificação endocondral, quanto por ossificação intramembranosa, entretanto, o grau de desenvolvimento e complexidade da clavícula varia entre as espécies. Os primatas e roedores possuem a clavícula bem desenvolvida, enquanto nos carnívoros, incluindo cães e gatos, a clavícula é considerada vestigial ou ausente (McCarthy e Wood, 1988; Ronning e Kantomaa, 1988; Tran e Hall, 1989; Voisin, 2006; Carretero *et al.*, 2017; de Souza Junior *et al.*, 2020).

A maioria dos estudos sobre a formação e o crescimento ósseos utiliza os ossos longos como modelo para estudar o processo de ossificação endocondral, e os ossos da calota craniana, como modelo de estudo dos mecanismos envolvidos na ossificação intramembranosa (Franz-Odenaal, 2011).

1.1 Ossificação endocondral

A ossificação endocondral ou formação óssea endocondral pré-natal inicia com a migração de células mesenquimais indiferenciadas para o local, no feto, onde será formado o molde cartilaginoso. Neste sítio, essas células passarão inicialmente por um processo de condensação (Olsen *et al.*, 2000). Apesar da condensação mesenquimal ser um pré-requisito para a condrogênese, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não estão totalmente elucidados (Long e Ornitz, 2013). No entanto, é fato que a matriz extracelular (MEC) exerce papel fundamental nesse processo (Fig. 1) (DeLise *et al.*, 2000).

Antes da condensação mesenquimal, as células mesenquimais secretam MEC rica em ácido hialurônico e colágeno tipo I (COL1) que evita a interação célula-célula. A concentração de ácido hialurônico diminui quando se inicia a condensação mesenquimal. Uma hipótese para a redução da concentração do ácido hialurônico é que ele facilita o movimento celular, sendo necessária sua redução para a maior interação célula-célula (DeLise *et al.*, 2000).

Durante a fase de condensação (Fig. 2A), as células mesenquimais expressam caderina neural (N-caderina) e a molécula de adesão de células neurais (N-CAM) que são responsáveis por promover a adesão célula-célula. Ambas moléculas desaparecem após a diferenciação condrogênica (DeLise *et al.*, 2000). Outras moléculas da MEC que também são importantes para adesão e para a condensação mesenquimal são produzidas, incluindo as hialaderinas, o versican, a tenascina, o sindecano, o sulfato de heparano e o sulfato de condroitina (Hall e Miyake, 2000).

A fibronectina também é uma importante proteína da MEC, que está presente em toda a fase de diferenciação das células mesenquimais e que persiste no tecido cartilaginoso maduro. Acredita-se que ela tenha importante papel em todas as etapas da condrogênese, facilitando a migração das células mesenquimais nas etapas iniciais e auxiliando também na adesão, na proliferação e na diferenciação celular. Além disso, a fibronectina é capaz de estabelecer ligação com outras moléculas, tais como o colágeno e os proteoglicanos, fornecendo um arcabouço para a organização celular e proporcionando um ambiente adequado para a condrogênese (Singh e Schwarzbauer, 2012). A síntese de fibronectina diminui à medida que as células mesenquimais se diferenciam em condroblastos, que passam a sintetizar uma MEC rica principalmente em agrecan (ACAN) e colágeno tipo II (COL2) (Karsenty e Wagner, 2002; Singh e Schwarzbauer, 2012).

Além da fibronectina, a N-CAM, a N-caderina e a tenascina, que representam a maioria das moléculas associadas à condensação mesenquimal, são reguladas pelo fator de transformação de crescimento β (TGF β) (Hall e Miyake, 2000).

O TGF β pertence à superfamília TGF β e possui três isoformas: TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3. Todas as três isoformas são expressas durante a condensação mesenquimal e regulam positivamente a expressão de moléculas que auxiliam a adesão celular. A superfamília TGF β ainda inclui outros membros, como a activina, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e os fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), desempenhando um papel

essencial em quase todos os aspectos da formação e manutenção da cartilagem (Wang *et al.*, 2014).

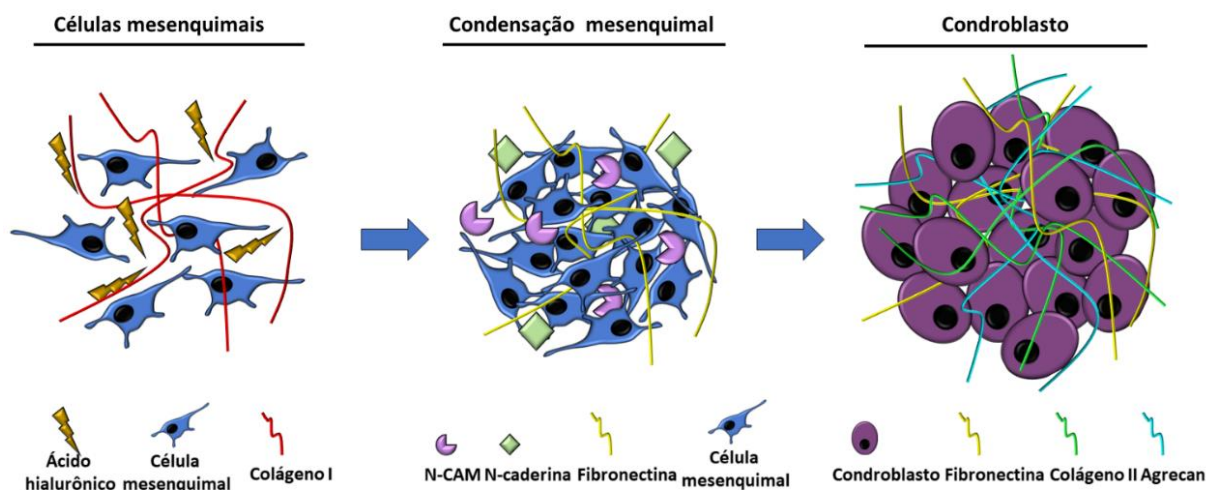


Figura 1. Representação esquemática das etapas iniciais da condrogênese com as principais proteínas da MEC que auxiliam na condensação mesenquimal e na diferenciação condrogênica.

Após o processo de condensação, as células mesenquimais se diferenciam em dois tipos celulares: os condrócitos, que se desenvolvem na porção central das condensações, sem vascularização; e as células pericondriais que se desenvolvem na porção externa altamente vascularizada (Fig. 2B). Esse processo se inicia quando as células mesenquimais condensadas passam a expressar o SOX9.

O SOX9 é o principal fator de transcrição nuclear requerido para condrogênese, sendo responsável por estimular a diferenciação das células condroprogenitoras em condroblastos (DeLise *et al.*, 2000; Long e Ornitz, 2013; Lefebvre e Dvir-Ginzberg, 2017). A inativação do SOX9 em camundongos resulta em ausência da expressão de marcadores condrogênicos, tais como, COL2, colágeno tipo IX (COL9), colágeno tipo XI (COL11) e ACAN, impedindo a formação da cartilagem (Bi *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2017). Diferentes vias de sinalização regulam a expressão de SOX9, incluindo as BMPs, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), a proteína quinase A (PKA), o *sonic hedgehog* (SHH) e o TGF β (Kozhemyakina *et al.*, 2015).

Com a diferenciação condrogênica, os condroblastos do molde cartilaginoso proliferam e secretam uma matriz extracelular rica em COL2, COL9, COL11, sulfato de condroitina e ACAN, dando origem ao molde de cartilagem que irá guiar a formação do osso (DeLise *et al.*, 2000; Lefebvre e Dvir-Ginzberg, 2017). À medida que ficam envolvidos por essa matriz passam a ter formato arredondado e são chamados condrócitos (DeLise *et al.*, 2000). Posteriormente, os condrócitos do centro do molde cartilaginoso passam por um processo de maturação, caracterizado pelo aumento do volume celular (hipertrofia), e deixam de secretar predominantemente COL2 e passam a secretar matriz extracelular rica em colágeno tipo X (COL10) (Mackie *et al.*, 2008; Mackie *et al.*, 2011).

Os condrócitos hipertróficos tem papel fundamental na formação óssea endocondral, uma vez que são responsáveis pelo alongamento do molde de cartilagem, por meio do aumento do volume celular, e secretam fatores parácrinos críticos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que induz a invasão vascular do pericôndrio, e o *Indian hedgehog* (IHH), responsável por regular a proliferação e a diferenciação dos condrócitos (Ono e Kronenberg, 2018).

O IHH executa todas as suas funções por meio da ligação ao seu receptor Patched-1 (Ptc-1), que ativa a *Smoothed* (Smo), uma proteína de membrana necessária para as ações celulares do IHH. O IHH é expresso em condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos, mas os genes alvos da sinalização de IHH são expressos em condrócitos em proliferação e nas células pericondriais e osteoprogenitores, regulando não somente a proliferação e a diferenciação dos condrócitos, como também a diferenciação das células progenitoras em osteoblastos. Sugere-se que o efeito proliferativo do IHH ocorre por sua ação direta sobre os condrócitos, enquanto seu efeito na diferenciação seria pela ação indireta por meio do peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTHrP) (Ohba, 2016). O PTHrP é secretado pelas células pericondriais, localizadas nas extremidades dos moldes de cartilagem, e pelos condrócitos proliferativos. O PTHrP é o principal responsável por manter os condrócitos na fase proliferativa e retardar a diferenciação hipertrófica (Kronenberg, 2003).

O IHH tem sua expressão regulada pelo fator de transcrição RUNX2, considerado um fator de transcrição chave para a diferenciação hipertrófica. Dessa forma, o RUNX2 induz a expressão de IHH, que por sua vez, induz a proliferação de condrócitos, e induz a expressão de PTHrP, que, por sua vez, inibe a expressão de RUNX2, formando um ciclo de *feedback* negativo para que a proliferação e a hipertrofia dos condrócitos ocorram de

forma coordenada (Yoshida *et al.*, 2004; Ono e Kronenberg, 2018; Komori, 2020). O RUNX2 também é responsável por estimular a expressão de proteínas importantes da diferenciação hipertrófica, incluindo o COL10, a metaloproteinase 13 (MMP13) e o VEGF (Zelzer *et al.*, 2001; C. F. Liu *et al.*, 2017; Komori, 2018).

A expressão de fatores pró-angiogênicos pelos condrócitos hipertróficos, dentre eles o VEGF, é importante para que ocorra a invasão vascular da cartilagem e a formação do centro de ossificação primário (Mackie *et al.*, 2008). Em camundongos nocaute para VEGF, a invasão vascular e a formação dos centros de ossificação primários são tardios (Zelzer *et al.*, 2004). O VEGF atua não apenas nas células endoteliais vasculares para promover a angiogênese, mas também nos osteoclastos para estimular a osteoclastogênese (Nakagawa *et al.*, 2000).

Os vasos sanguíneos que invadem a cartilagem levam nutrientes, condroclastos, osteoclastos e osteoblastos, sendo, portanto, essenciais tanto para a reabsorção da cartilagem, quanto para a formação óssea (Karaplis, 2008). Nessa etapa, à medida que os condrócitos hipertróficos morrem, os vasos sanguíneos carregam células precursoras dos osteoblastos para o centro do molde cartilagenoso (Fig. 2C). Essas células se diferenciam em osteoblastos e secretam matriz extracelular rica em COL1 formando o centro de ossificação primário (Fig. 2D). O crescimento a partir do centro de ossificação primário segue do centro para as extremidades até que toda a cartilagem da diáfise seja substituída por osso (Karsenty *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo em que ocorre a hipertrofia dos condrócitos, as células pericondriais, localizadas adjacentes à região com condrócitos hipertróficos, se diferenciam em osteoblastos para a formação do colar ósseo (Ohba, 2016).

Uma vez que ocorrem a diferenciação hipertrófica e a formação do centro de ossificação primária, é estabelecida a formação de uma placa de crescimento fetal (Yeung Tsang *et al.*, 2014; Ono e Kronenberg, 2018). A placa de crescimento fetal pode ser dividida em quatro zonas morfologicamente distintas: a zona de repouso formada por condrócitos redondos; a zona de proliferação composta por condrócitos proliferativos organizados em colunas longitudinais; a zona pré-hipertrófica formada por condrócitos em maturação e a zona hipertrófica, composta por condrócitos hipertróficos (Fig.2E) (Yeung Tsang *et al.*, 2014; Allen e Burr, 2019).

Os condrócitos redondos da zona de repouso são representados por células semelhantes às células condroprogenitoras. Os condrócitos redondos se dividem, tornam-se achatados e se organizam em colunas na direção do crescimento longitudinal, formando a zona de proliferação (Yeung Tsang *et al.*, 2014). Os mecanismos exatos que determinam a mudança de orientação dos condrócitos da zona de proliferação ainda não foram elucidados, mas acredita-se que a via de sinalização Wnt não canônica tenha papel crucial para promover a formação das colunas de condrócitos (Li e Dudley, 2009; Gao e Yang, 2013).

Na zona pré-hipertrófica, os condrócitos saem do ciclo celular e iniciam a diferenciação hipertrófica. Os condrócitos hipertróficos são células pós-mitóticas que aumentam drasticamente seu volume celular por uma combinação de hipertrofia verdadeira e edema celular, formando então a zona hipertrófica, que posteriormente dará origem ao osso (Cooper *et al.*, 2013; Yeung Tsang *et al.*, 2014). Os mecanismos moleculares envolvidos são os mesmos discutidos anteriormente, envolvendo o ciclo de *feedback* PTHrP-Ihh (Ono e Kronenberg, 2018).

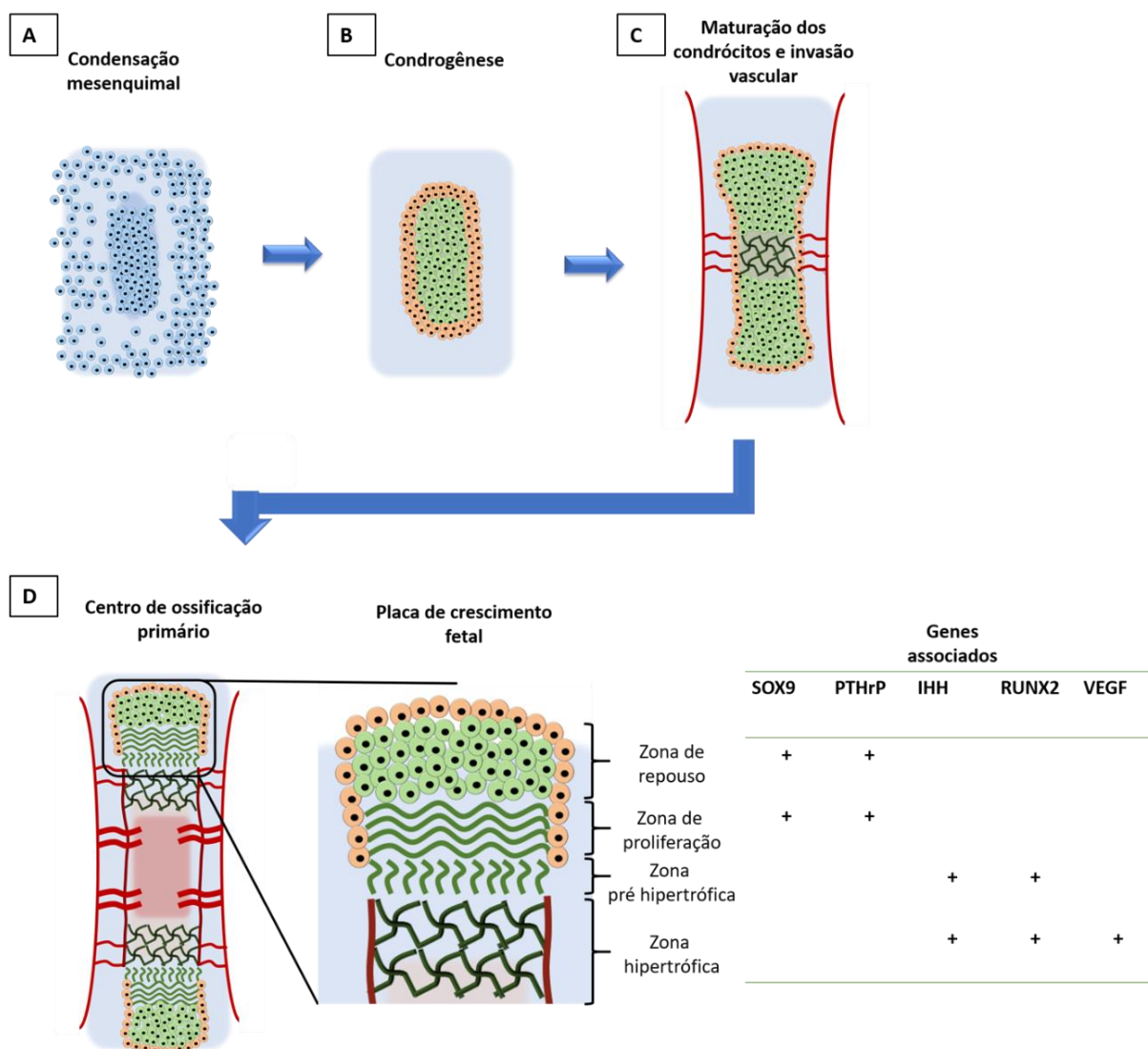


Figura 2. Estágios da ossificação endocondral e genes associados. As células mesenquimais agregam-se no futuro local de formação óssea, se diferenciam em condroblastos e depositam a matriz extracelular, enquanto as células da camada externa se diferenciam em células pericondriais e formam o pericôndrio. Os condrócitos do centro do molde cartilaginoso se tornam hipertróficos e ocorre invasão vascular carregando osteoclastos e condroclastos, que degradam a MEC. As células osteoprogenitoras gradualmente substituem a matriz cartilaginosa por osso, formando o centro de ossificação primário. No detalhe, as zonas da placa de crescimento com os principais genes associados.

Os centros de ossificação secundários se formam nas extremidades, isto é, nas epífises dos ossos longos, por processo similar ao que ocorre durante a formação do centro de ossificação primário. Os condrócitos redondos do centro das extremidades sofrem

hipertrofia em resposta à hipóxia, e posteriormente ocorre invasão de vasos sanguíneos e de células mesenquimais (Ono e Kronenberg, 2018).

Ao final da formação óssea endocondral, a cartilagem fica restrita a dois locais: na placa de crescimento (ou placa epifisária) e na cartilagem articular. Tanto a placa epifisária quanto a cartilagem articular são essenciais para o crescimento ósseo do nascimento até a puberdade, período em que ocorre fusão dos centros de ossificação primário e secundários, ficando a presença da cartilagem restrita às extremidades articulares (Mackie *et al.*, 2011; Allen e Burr, 2019).

1.2 Crescimento ósseo endocondral pós-natal

Ao nascimento, quase todo o molde cartilaginoso já foi substituído por tecido ósseo, com exceção da cartilagem articular e da placa de crescimento ou placa epifisária que serão responsáveis pelo crescimento ósseo endocondral no período pós-natal (Mackie *et al.*, 2008; Setiawati e Rahardjo, 2018). Alguns animais, a exemplo dos roedores, nascem com a epífise ainda totalmente cartilaginosa e o centro de ossificação secundário só começa a ser formado entre o 6º e 8º dia pós-natal, individualizando a cartilagem articular e a placa de crescimento (Sivaraj e Adams, 2016; Aghajanian *et al.*, 2017).

A cartilagem articular é um tecido hipocelular, em que os condrócitos representam cerca de 2 a 5% do volume total do tecido e apresentam baixa atividade metabólica, devido em parte, à ausência de suprimento vascular e de inervação do tecido (Goldring, 2006). A MEC é composta principalmente por COL2 e ACAN, além de diversas outras moléculas como COL9 e COL11, outros proteoglicanos (decorina, biglican, fibromodulina), ácido hialurônico e proteínas de ligação (Carballo *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2019). A cartilagem articular pode ser dividida em quatro zonas: superficial, intermediária, profunda e de cartilagem calcificada; embora essas camadas não sejam tão bem individualizadas como na placa epifisária (Eurell e Van Sickle, 2006).

A cartilagem articular funciona como uma placa de crescimento superficial durante o desenvolvimento pós-natal. O crescimento da epífise óssea também se dá pela hipertrofia das células da zona profunda da cartilagem articular, semelhante ao crescimento ósseo que ocorre a partir da placa de crescimento epifisária (Hunziker *et al.*, 2007). Em estudo com coelhos, Hunziker *et al.* (2007) demonstraram que a cartilagem articular é responsável tanto pelo crescimento longitudinal quanto pelo crescimento radial e lateral

da epífise. Todavia, ao contrário da placa de crescimento epifisária que é transitória e desaparece com a maturidade sexual, a cartilagem articular é permanente e com atividade limitada após a maturidade sexual (Hallett *et al.*, 2019).

A placa de crescimento ou placa epifisária é uma estrutura cartilaginosa especializada que se localiza entre os centros de ossificação primário e secundário (Kronenberg, 2003; Samsa *et al.*, 2017). Durante o crescimento endocondral, os condrócitos da placa de crescimento passam por fases bem ordenadas e controladas de proliferação, diferenciação, maturação e morte celular (Kronenberg, 2003). Com base em sua morfologia e padrão de expressão gênica, os condrócitos organizam-se em diferentes zonas ao longo da placa de crescimento (Fig. 3): a zona de repouso, constituída por condrócitos relativamente inativos; zona de proliferação, constituída por condrócitos com elevada taxa de divisão mitótica; zona pré-hipertrófica, quando os condrócitos saem do ciclo celular iniciando sua maturação; e a zona hipertrófica, constituída por condrócitos volumosos ou hipertróficos (Samsa *et al.*, 2017; Allen e Burr, 2019).

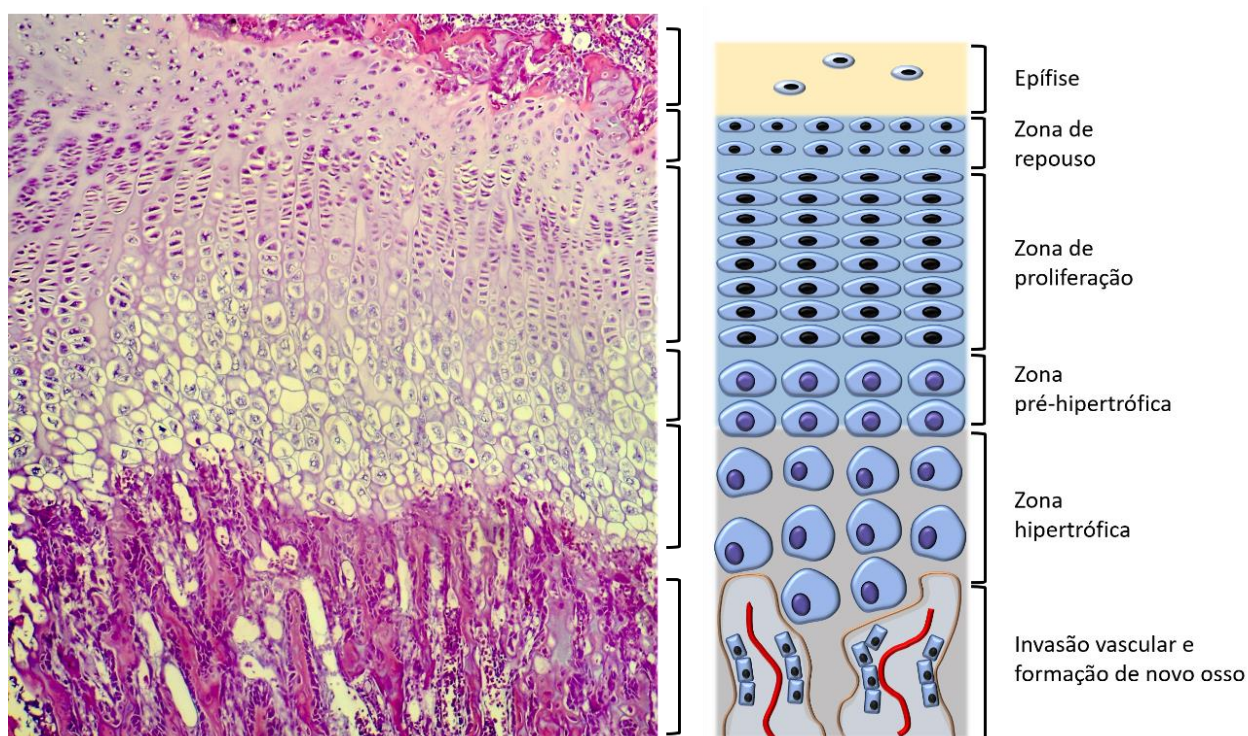


Figura 3. Representação esquemática da placa de crescimento com as diferentes zonas.

Os condrócitos da zona de repouso compreendem uma população de células progenitoras que dão origem aos condrócitos da zona de proliferação. São células achatadas,

frequentemente agrupadas em pares e dispostas paralelamente ao eixo longo do osso (Abad *et al.*, 2002). Assim como os condrócitos redondos periarticulares do desenvolvimento pré-natal, os condrócitos da zona de repouso expressam PTHrP (Ono, Balani e Kronenberg, 2019). A zona de repouso possui um nicho de células tronco esqueléticas responsável pelo suprimento de condrócitos durante o crescimento ósseo longitudinal (Mizubishi *et al.*, 2018, 2019; Newton *et al.*, 2019). Mizubishi *et al.* (2018) demonstraram que condrócitos PTHrP+, marcados pelo alelo *knock-in* Pthrp-mCherry ou camundongos transgênicos Pthrp-creER após a injeção de tamoxifeno, expressam um conjunto de marcadores para células tronco esqueléticas. Além disso, os autores demonstraram, por meio do rastreamento de linhagem, que as células PTHrP+ formam condrócitos colunares, osteoblastos e células estromais da medula. Esse nicho de células tronco facilita a auto-renovação dos progenitores de condrócitos e permite o suprimento contínuo de condrócitos para o crescimento longitudinal do osso.

As células tronco esqueléticas são um tipo de células tronco somáticas, auto-renováveis, restritas ao esqueleto e multipotentes, com capacidade em se diferenciar nas células do esqueleto, incluindo osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Liu *et al.*, 2019). Inicialmente essas células foram isoladas a partir da placa de crescimento em neonatos de camundongos como células mesenquimais, não hematopoéticas, que expressam os marcadores de superfície CD51, CD200 e não expressam CD90, CD105. Posteriormente, essas células também foram isoladas da placa de crescimento em humanos, com um painel de marcadores de superfícies diferente dos camundongos. Em humanos, as células tronco esqueléticas expressam PDPN, CD73, CD164 e não expressam CD146 (Chan *et al.*, 2015, 2018; Matsushita *et al.*, 2020).

A descoberta desse nicho de células tronco fornece novos conhecimentos sobre os distúrbios de crescimento em crianças (Liu *et al.*, 2018; Newton *et al.*, 2019). Os mecanismos envolvidos na sobrevivência dessas células por longo prazo na placa de crescimento ainda são desconhecidos, entretanto, as ações do IHH liberado pela zona hipertrófica parece estar envolvido na manutenção desse nicho (Ono *et al.*, 2019).

Além de fornecer células para as zonas subsequentes, a zona de repouso é parcialmente responsável pela organização da placa de crescimento em zonas distintas de proliferação e hipertrofia (Abad *et al.*, 2002). As células da zona de repouso dão origem à zona de proliferação, formada por condrócitos discoides, dispostos em colunas e que sintetizam

MEC constituída por COL2, COL9, COL11 e agrecan (Ballock e O'Keefe, 2003; Adams *et al.*, 2007).

Um dos principais hormônios responsáveis pela proliferação dos condrócitos é o GH, que exerce seus efeitos por meio da secreção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) (Nilsson *et al.*, 2005; Hallett *et al.*, 2019). Além de atuar em conjunto com o IGF1 estimulando a proliferação, também há a hipótese da ação direta do GH sobre as células tronco esqueléticas da zona de repouso, uma vez que a ação promotora do crescimento do GH aparece entre a segunda e terceira semanas de idade em camundongos, que coincide com o surgimento do nicho de células tronco esqueléticas. Todavia, esse efeito do GH sobre as células tronco esqueléticas ainda necessita ser melhor estudado (Chagin e Newton, 2020).

Após a proliferação, os condrócitos saem do ciclo celular e tornam-se pré-hipertróficos, caracterizados pelo aumento do volume celular e pela expressão do fator de transcrição RUNX2 (Karsenty e Wagner, 2002; Adams *et al.*, 2007). Os condrócitos pré-hipertróficos continuam aumentando de tamanho para se tornarem hipertróficos. Nesta fase, eles param de secretar COL2 e passam a secretar COL10, que, por isso, é um dos marcadores da hipertrofia (Karsenty e Wagner, 2002; Samsa *et al.*, 2017). A expressão de metaloproteinase 13 (MMP13), principal enzima responsável pela degradação do COL2, é também outro importante marcador da hipertrofia de condrócitos (Inada *et al.*, 2004; Stickens *et al.*, 2004). A taxa na qual os condrócitos sofrem hipertrofia na placa de crescimento é responsável pela taxa de crescimento ósseo longitudinal (Cooper *et al.*, 2013).

Os principais reguladores sistêmicos da hipertrofia dos condrócitos são os hormônios tireoidianos (HTs), representados pela triiodotironina (T3) e pela tiroxina (T4) (Shao *et al.* 2006). Os condrócitos das zonas de repouso, de proliferação e pré-hipertrófica possuem receptores para os hormônios tireoidianos (TR α 1, TR α 2 e TR β 1) e respondem a eles, estimulando a diferenciação hipertrófica (Bassett e Williams, 2016) por mecanismos que serão discutidos posteriormente.

À medida em que ocorre degradação da matriz cartilaginosa e morte dos condrócitos hipertróficos, há invasão de vasos sanguíneos na placa de crescimento (Karsenty e Wagner, 2002; Mackie *et al.*, 2008). Os vasos sanguíneos oriundos da metáfise invadem a zona hipertrófica carreando células osteoprogenitoras que darão origem aos

osteoblastos, que por sua vez sintetizarão matriz óssea. Esse novo osso formado, a partir das placas de crescimento, permite o crescimento ósseo longitudinal (Gerber e Ferrara, 2000; Karsenty e Wagner, 2002; Ballock e O'Keefe, 2003; Setiawati e Rahardjo, 2018).

O crescimento ósseo endocondral continua até o início da vida adulta, quando os condrócitos perdem a capacidade proliferativa e ocorre fusão entre a epífise e a diáfise com o desaparecimento da placa de crescimento (Mackie *et al.*, 2011; Setiawati e Rahardjo, 2018). Todos esses eventos, desde a proliferação e a diferenciação celular até a morte dos condrócitos e formação do novo osso são regulados por uma rede complexa e multifatorial, com interação entre hormônios circulantes (GH, hormônios tireoidianos e esteroidais) e fatores de crescimento, tais como, IHH, WNTs, BMPs e FGFs (Fig. 4) (Mackie *et al.*, 2011).

Dentre os fatores sistêmicos, o GH e os HTs possuem os mecanismos de ação nos condrócitos da placa de crescimento bem estabelecidos, conforme descrito anteriormente. Por outro lado, o papel do estrógeno na proliferação e na hipertrofia de condrócitos ainda permanece com resultados contraditórios. Enquanto alguns pesquisadores demonstraram que o estrógeno inibe a proliferação dos condrócitos *in vitro*, em uma dose de 10^{-8} M (Talwar *et al.*, 2006), outros não encontraram diferença na proliferação com uma dose de 10^{-9} M (Rodd *et al.*, 2004). Da mesma forma, a diferenciação hipertrófica só foi observada em doses farmacológicas (10^{-7} M), acima das doses fisiológicas. O que se sabe é que os condrócitos apresentam o receptor para estrógeno (ER α e ER β), e que a sinalização do estrógeno é crucial para a maturação esquelética normal e fusão da placa epifisária. Esses efeitos podem ser pela ação direta, ou por meio da modulação de outras vias como a de GH/IGF1 (Sylvia *et al.*, 2000; Van der Eerden *et al.*, 2002; Van Der Eerden *et al.*, 2003; Rodd *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2005; Birlik *et al.*, 2016).

O IHH tem papel fundamental durante a formação óssea endocondral. Ele é expresso por condrócitos pré-hipertróficos e por condrócitos em fase inicial de hipertrofia. Assim, o IHH regula o início da diferenciação dos condrócitos hipertróficos, estabelecendo um ciclo de *feedback* negativo com o PTHrP (Hallett *et al.*, 2019). Estudos iniciais falharam em revelar a função do IHH no crescimento ósseo pós-natal devido à letalidade perinatal de camundongos com deleção de IHH (St-Jacques *et al.*, 1999). Todavia, com a deleção de IHH dos condrócitos após o nascimento, demonstrou-se que o IHH é essencial para a manutenção da placa de crescimento pós-natal. A perda de IHH resulta em perda da estrutura colunar dos condrócitos, formação de condrócitos hipertróficos ectópicos e

invasão vascular prematura, levando à fusão prematura da placa de crescimento e ao nanismo (Maeda *et al.*, 2007). As manipulações genéticas que resultam em perda e ganho de função, demonstraram que o IHH regula diretamente a proliferação de condrócitos (Long *et al.*, 2001).

Além disso, o IHH induz à expressão de várias BMPs, mas seus efeitos na proliferação são independentes da sinalização de BMP. Da mesma forma, a sinalização de BMP induz a expressão de IHH, mas os efeitos da sinalização de BMP na proliferação são independentes de IHH (Grimsrud *et al.*, 2001; Minina *et al.*, 2002). As BMPs são membros da superfamília do TGF β e a ativação da sinalização de BMPs na placa de crescimento resulta na proliferação de condrócitos (Minina *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2007).

Uma série de WNTs são expressas pelos condrócitos da placa de crescimento. As WNTs são capazes de estimular tanto a proliferação dos condrócitos quanto a diferenciação hipertrófica (Andrade *et al.*, 2004AD; Akiyama *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Mackie, Tatarczuch e Mirams, 2011).

A via de sinalização FGF/FGFR também é um importante regulador no crescimento ósseo. Os FGFs inibem a proliferação dos condrócitos pela ligação ao receptor FGFR3 (Ornitz, 2005; Mackie *et al.*, 2011). O FGFR3 é expresso nas zonas de repouso e proliferação, sugerindo seu efeito direto na regulação da proliferação dos condrócitos e possivelmente na sua diferenciação. A superexpressão de FGFR3 resulta em diminuição da proliferação e da hipertrofia de condrócitos e conseqüentemente diminuição do crescimento ósseo. Um possível mecanismo de ação é a supressão de SOX9 em condrócitos pré-hipertróficos pela sinalização de FGFR3. Além disso, a sinalização de FGFR3 parece regular a expressão e a atividade de BMP, Wnt, IHH e PTH (Ornitz e Marie, 2002, 2015; Zhou *et al.*, 2015). O FGR1, por sua vez, é expresso em condrócitos hipertróficos e na matriz extracelular e parece atuar na sobrevivência do condrócito hipertrófico e no controle da taxa de diferenciação. Todavia, suas funções e mecanismos de ação ainda não são totalmente compreendidos (Ornitz e Marie, 2002, 2015).

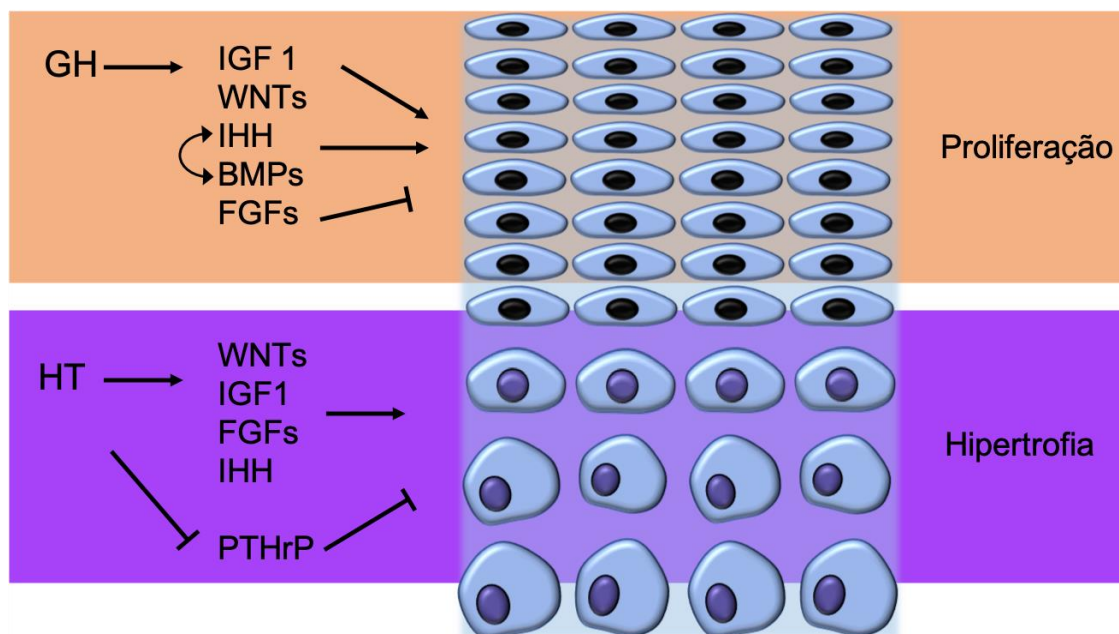


Figura 4. Esquema dos principais fatores sistêmicos e locais que agem na placa de crescimento. O hormônio do crescimento (GH) e os hormônios tireoidianos (HT) estimulam a secreção de diferentes fatores de crescimento pelos condrócitos que agem regulando sua proliferação e hipertrofia. Setas indicam as vias estimulatórias e as linhas cruzadas indicam as vias inibitórias.

Embora a vertente mais aceita seja a de que os condrócitos hipertróficos representam a etapa terminal do processo de maturação que culmina em morte das células e substituição da cartilagem hipertrófica por tecido ósseo, alguns pesquisadores acreditam que possa ocorrer a transdiferenciação dos condrócitos hipertróficos em osteoblastos (Tsang *et al.*, 2015; Hallett *et al.*, 2019).

Aghajanian *et al.* (2017) demonstraram por meio do rastreamento da linhagem de condrócitos em camundongos Col2-CreERT2 que os condrócitos que inicialmente expressam COL2 e SOX9, passam a expressar marcadores de condrócito pré-hipertrófico (IHH), hipertrófico (COL10 e MMP13) e por fim expressam marcadores típicos de osteoblastos, como osterix (OSX), fosfatase alcalina (FA) e COL1, entre os dias 7 e 9 após o nascimento. Além disso, os pesquisadores sugeriram que os hormônios tireoidianos seriam responsáveis por regular essa transdiferenciação. Corroborando com esses resultados, a adição de T3 em culturas de condrócitos ATDC5 aumentou os níveis de expressão de marcadores da diferenciação de osteoblastos e a síntese de nódulos de mineralização, fornecendo assim mais evidências para a transdiferenciação de condrócitos em osteoblastos (Xing *et al.*, 2014).

Dessa forma, os estudos vêm demonstrando que a transdiferenciação pode ser um mecanismo importante tanto na formação, quanto no crescimento ósseos e até no reparo de fraturas. Todavia, esse mecanismo de transdiferenciação dos condrócitos ainda precisa ser melhor estudado e elucidado (Aghajanian e Mohan, 2018).

1.3 Ossificação intramembranosa pré-natal

A ossificação intramembranosa ou formação óssea intramembranosa pré-natal tem sido menos estudada que a ossificação endocondral e os mecanismos envolvidos no processo também são bem menos conhecidos.

Dentre os ossos que se formam por meio da ossificação intramembranosa, os ossos do crânio são os que possuem os mecanismos de formação mais bem elucidados (Olsen, Reginato e Wang, 2000; Jiang *et al.*, 2002; Ono e Kronenberg, 2018). A calota craniana consiste em cinco ossos planos: um par de ossos frontais, um par de ossos parietais, e o osso interparietal. A parte escamosa do osso temporal (temporal escamoso) e a asa maior do osso esfenoide (alisfenoide) que compõe a parede do crânio também são sítios de ossificação intramembranosa (Morriss-Kay e Wilkie, 2005).

Embora a maioria dos ossos da calota e da parede craniana sejam formados por ossificação intramembranosa, a origem embrionária entre eles diferem (Fig. 5). A crista neural fornece o mesênquima que formará os ossos frontais, o aliesfenoide e o osso temporal escamoso, enquanto o mesoderma paraxial (somitos) origina o mesênquima dos ossos parietais e occipital. O mesênquima que forma o osso interparietal, por sua vez, tem contribuição tanto da crista neural quanto do mesoderma (Jiang *et al.*, 2002; Leitch *et al.*, 2020).

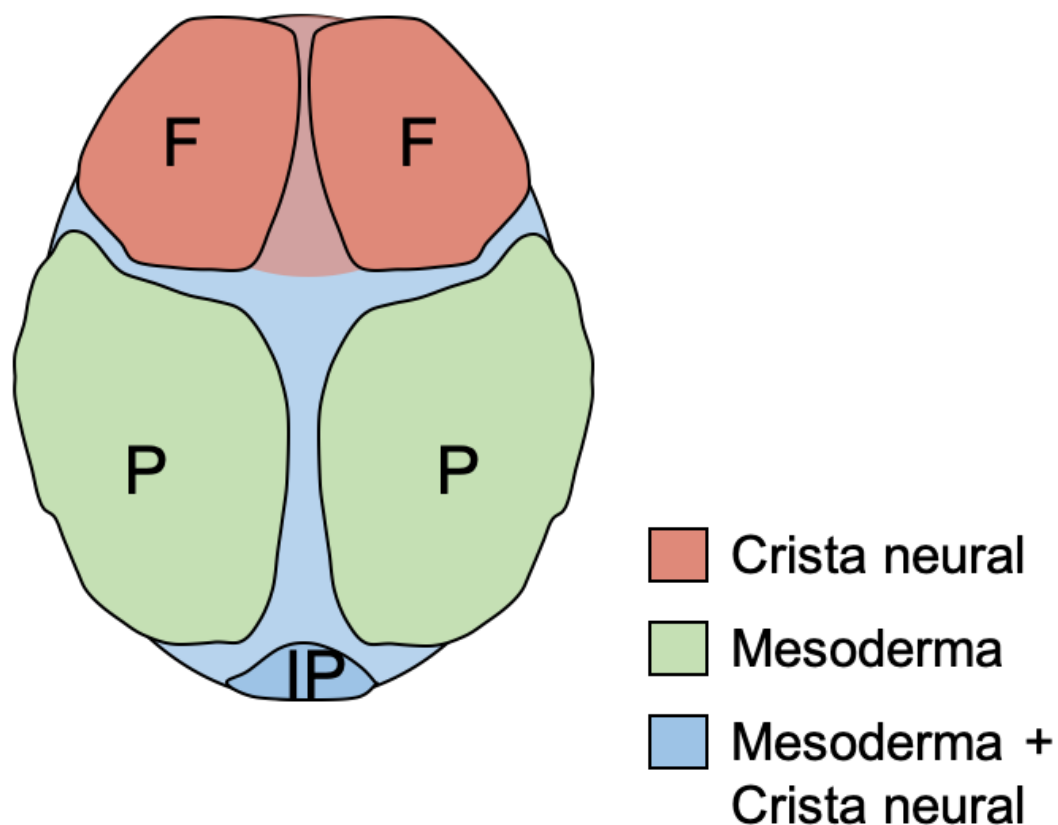


Figura 5. Representação esquemática dos ossos da calota craniana e suas respectivas origens embrionárias. F: frontal. P:parietal. IP:interparietal.

As populações de precursores osteogênicos derivados da crista neural e do mesoderma migram de seus locais de origem para a região da crista supraorbital, onde formarão os primórdios dos ossos cranianos. Essa migração se dá por volta do nono dia de gestação (E9.5) em camundongos (Jiang *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2008) e entre os dias 28 e 40 de gestação em humanos (Leitch *et al.*, 2020). Como resultado, uma membrana mesenquimal é formada ao redor do cérebro, conhecida por meninge primária ou meninge primitiva (Dasgupta e Jeong, 2019). Posteriormente, a meninge primária é dividida em duas camadas: endomeninge ou meninge secundária, que contribui para a formação da leptomeninge (pia-mater e aracnóide); e ectomeninge, com uma camada mais interna que contribui para a formação da dura-máter e uma camada superficial externa com potencial osteogênico e condrogênico (Jin *et al.* 2016).

O comprometimento das células mesenquimais com a linhagem osteogênica depende de diversos fatores de transcrição e das respectivas vias de sinalização que regulam esses fatores. Os principais fatores de transcrição envolvidos são: *Msh Homeobox 1* (MSX1) e *Msh Homeobox 2* (MSX2), RUNX2 e Osterix (OSX) (Aubin e Heersche, 2003; Ferguson e Atit, 2019). Ishii et al. (2003) demonstraram que o MSX2 é necessário para promover o processo inicial de diferenciação osteogênica durante o desenvolvimento do osso frontal em camundongos. A deleção de MSX1 e/ou MSX2 em camundongos leva a defeitos no desenvolvimento dos ossos do crânio (Satokata *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2007). Além disso, MSX1 e MSX2 controlam positivamente a expressão do gene osteogênico RUNX2 no mesênquima da calvária (Ishii *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2007).

O RUNX2 é um fator de transcrição chave na diferenciação osteogênica. A deleção do RUNX2 em camundongos resulta na não formação dos ossos da calota craniana, com formação apenas de uma fina camada de células mesenquimais (Komori *et al.*, 1997; Komori, 2006). Camundongos RUNX2 +/-, por sua vez, desenvolvem os ossos da calota craniana, mas o processo é atrasado e as suturas não se fecham (Qin *et al.*, 2019). Assim como o RUNX2, o OSX é outro fator de transcrição necessário para a ossificação intramembranosa. A expressão de RUNX2 é normal em camundongos com deleção de OSX, entretanto OSX não é expresso em camundongos nulos para RUNX2, indicando que OSX é regulado positivamente pelo RUNX2 (Nishio *et al.*, 2006; Marie, 2008; Baek *et al.*, 2014).

Dentre as vias de sinalização que regulam esses fatores de transcrição, as BMPs, o FGF e a via de sinalização Wnt/ β -catenina são as vias mais bem estabelecidas (Ishii *et al.*, 2015; Ferguson e Atit, 2019). As BMPs são proteínas que pertencem à superfamília do TGF β . A BMP2 e a BMP4 são expressas no mesênquima cranial que corresponde à área onde o primórdio ósseo se desenvolverá (Han *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2013). A inibição da expressão de BMP2 e BMP4 na crista neural craniana resulta em defeitos graves na formação dos ossos derivados da crista neural em camundongos (Bonilla-Claudio *et al.*, 2012). A expressão de MSX1 e MSX2 pode ser parcialmente regulada pela BMP. Estudos com zebrafish, anfíbios e camundongos demonstraram que a sinalização de BMP regula positivamente a expressão do gene MSX *in vivo* (Knecht e Bronner-Fraser, 2002; Tríbulo *et al.*, 2003; Bonilla-Claudio *et al.*, 2012).

Outra via de sinalização responsável por regular a expressão de MSX é a sinalização de FGF. A via de sinalização de FGF tem 18 proteínas ligantes e quatro receptores tirosina

quinase do FGF (FGFR) (Ornitz e Itoh, 2015). O FGFR1 e FGFR2 são expressos no mesênquima cranial (Rice *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2016). Camundongos mutantes da via de sinalização de FGF têm perda da expressão de mRNA de MSX1 e MSX2 no mesênquima cranial (Abu-Issa *et al.*, 2002; Griffin *et al.*, 2013). Além de alterar a expressão de MSX1 e MSX2, a sinalização do FGF/FGFR induz a expressão de RUNX2 (Kim *et al.*, 2003; Omoteyama e Takagi, 2009).

A via WNT/ β -catenina também é crucial para a determinação da linhagem osteogênica. Wnts são proteínas que se ligam ao receptor *Frizzled* e recrutam os co-receptores LRP5/6 para ativar a via de sinalização canônica, levando à estabilização de β -catenina e translocação para o núcleo, onde se liga a fatores de transcrição TCF/LEF para regular a transcrição de genes em diversos contextos durante o desenvolvimento embrionário (Hay, 2005; Brugmann *et al.*, 2007; Fakhry, 2013). Das três vias de sinalização discutidas anteriormente, os camundongos nocaute para a via de sinalização Wnt são os que resultam em defeitos ósseos cranianos mais graves, com agenesia completa dos ossos cranianos. Estudos demonstram que a via Wnt/ β -catenina promove a determinação da linhagem osteogênica e reprime a diferenciação da linhagem condrogênica no mesênquima (Day *et al.*, 2005; Hill *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2010; Goodnough *et al.*, 2014). A deleção da β -catenina resulta em expressão ectópica de SOX9, fazendo com que os locais da calvária que deveriam sofrer ossificação sejam convertidos em cartilagem (Ferguson e Atit, 2019). Além disso, a deleção da β -catenina causa interrupção do padrão de expressão de RUNX2, com subsequente perda da expressão de OSX, e com pouco impacto na expressão de MSX1 e MSX2, resultando em ausência da formação óssea craniofacial (Goodnough *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2016).

Como os ossos do crânio possuem origens embrionárias diferentes, podem ser observadas diferenças no perfil transcricional do mesênquima oriundo das células da crista neural e do mesoderma paraxial. Até o momento, a maioria dos estudos que investigam a especificação da linhagem osteogênica se concentra em deleções gênicas no mesênquima oriundo das células da crista neural (Bonilla-Claudio *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2016; Ferguson e Atit, 2019).

Os primeiros centros de ossificação da calota craniana aparecem aproximadamente entre a 7^o e 8^o semana de gestação na mulher e no 14^o dia pós-concepção em camundongos (Jin *et al.*, 2016; Leitch *et al.*, 2020). Os dois ossos frontais se desenvolvem a partir de dois centros de ossificação, um de cada lado da linha média. Os dois ossos parietais

surgem de dois centros de ossificação primários distintos, ou seja, um para cada osso. No entanto, esses centros se fundem rapidamente e a ossificação progride radialmente do foco central em direção à periferia do osso. O osso interparietal se forma a partir de dois centros de ossificação, um de cada lado; e a porção escamosa do osso temporal ossifica a partir de um único centro. Com a condensação contínua desses centros, a ossificação prossegue para formar ossos que são chamados inicialmente de espículas ósseas (Fig. 6) (Som e Naidich, 2013; Jin *et al.*, 2016).

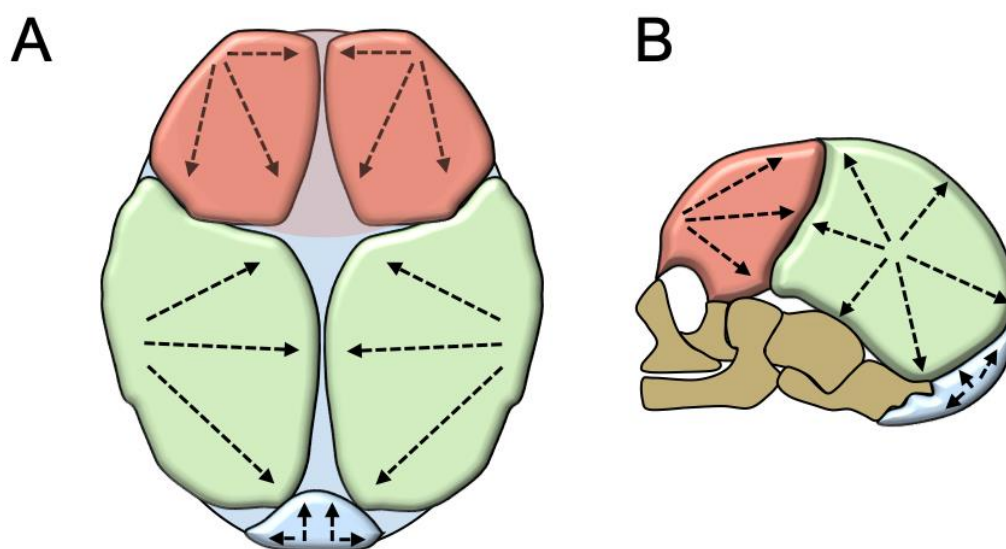


Figura 6. Representação esquemática dos principais centros de ossificação da calota craniana e as direções de crescimento (setas). A. Vista superior da calota craniana. B. Vista lateral da calota craniana.

Na ossificação intramembranosa, a condensação mesenquimal é uma fase rápida e transitória, seguida pela diferenciação das células que ocorre de forma semelhante à ossificação endocondral, com semelhanças tanto no padrão de expressão dos fatores de transcrição, quanto nas características da MEC (St.-Jacques e Helms, 2003; Eames e Helms, 2004). Dessa forma, a adesão célula-célula, que facilita a condensação, também é mediada pela N-CAM, N-caderina, hialaderinas, versican, tenascina, sindecano, sulfato de heparano e pelo sulfato de condroitina (Hall e Miyake, 2000).

As células mesenquimais condensadas se diferenciam em osteoblastos que secretam matriz orgânica, também conhecida como osteoide, rica em COL1 e proteínas não colagênicas, como a osteonectina (ON), a osteopontina (OP), a osteocalcina (OC) e a sialoproteína óssea (SPO) (Nefussi *et al.*, 1997; Aubin e Heersche, 2003; Long, 2012). Os proteoglicanos representados pelo sulfato de condroitina, decorin e pelo biglican também são componentes importantes dessa matriz (Mackie, 2003).

Todas as células durante essa transição de células mesenquimais para osteoblastos são chamadas de pré-osteoblastos, sendo, portanto, uma população celular heterogênea. De forma geral, todos os pré-osteoblastos expressam RUNX2 (Long, 2012). Além de ser essencial para diferenciação osteogênica das células mesenquimais, o RUNX2 regula positivamente a expressão gênica das proteínas da matriz óssea, incluindo a expressão de COL1, OP, OC e de SPO (Datta *et al.*, 2008; Komori, 2010).

As proteínas da matriz óssea desempenham papel chave em diferentes etapas da diferenciação celular e da mineralização (Nefussi *et al.*, 1997). As proteínas colagênicas, dentre elas principalmente o COL1, servem como arcabouço para a mineralização da matriz óssea, fornecendo um ambiente adequado para a retenção de proteínas não colagênicas e para deposição dos minerais (Zhu *et al.*, 2008). A síntese de COL1 é um dos eventos iniciais na diferenciação osteogênica e precede a síntese dos demais componentes da matriz (Aubin, 2001). Já as proteínas não colagênicas aparecem em diferentes estágios do processo de formação e de mineralização da matriz óssea (Nefussi *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2001).

Após a síntese de matriz, os osteoblastos participam indiretamente da mineralização do osteoide. Eles sintetizam fosfatase alcalina (FA), uma metaloenzima que é um marcador importante da diferenciação osteogênica e um dos primeiros marcadores expressos durante o processo de mineralização (Mackie, 2003). O mecanismo pelo qual essa enzima exerce sua função não foi totalmente elucidado, mas parece atuar tanto na elevação da concentração local de fosfato inorgânico, um promotor da mineralização, quanto na redução da concentração de pirofosfato extracelular, inibidor da mineralização (Golub e Boesze-Battaglia, 2007). A parte mineral da matriz, por sua vez, é composta principalmente de cálcio e fosfato depositados na forma de cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (Mackie, 2003; Ralston, 2017). Após completarem a síntese da matriz, alguns osteoblastos ficam aprisionados no interior dela, e passam a ser chamados de osteócitos, com funções distintas. Outros osteoblastos podem retornar à forma inativa

revestindo a matriz calcificada, chamados de “*lining cells*”, e o restante morre por apoptose (Long, 2012).

Com a mineralização do osteoide, forma-se o osso primário ou osso imaturo, caracterizado pela disposição aleatória das fibras de colágeno. No momento do nascimento, o osso imaturo é gradualmente substituído pelo osso lamelar maduro (Jin *et al.*, 2016). Todavia, permanecem separados por espaços de tecido conjuntivo, conhecidos como suturas e fontanelas, que são os principais locais de crescimento ósseo durante o desenvolvimento craniofacial (Opperman, 2000; Zhao *et al.*, 2015).

1.4 Crescimento ósseo intramembranoso pós-natal

O crescimento pós-natal da calvária é de fundamental importância para acompanhar a expansão do cérebro. Ao nascimento, um bebê tem 40% do volume do cérebro e do tamanho da calota craniana de um indivíduo adulto. À medida que o cérebro aumenta em massa após o nascimento, é necessário o crescimento dos ossos cranianos para acomodar esse aumento de volume (Tubbs *et al.*, 2012). Esse crescimento se dá por meio das suturas que se formam quando dois ossos da calota craniana se encontram, e das fontanelas formadas pelo encontro de três ou quatro ossos (Som e Naidich, 2013).

Ao todo, existem quatro suturas nos humanos: a sutura metópica, que se localiza entre os dois segmentos do osso frontal; a sutura sagital entre os ossos parietais; a sutura coronal na interface entre o osso frontal e os ossos parietais; e as suturas lambdoides na interface entre o supraoccipital e ossos parietais (Fig. 7). Esse arranjo é muito semelhante ao arranjo observado em ratos e camundongos (Opperman, 2000; Som e Naidich, 2013).

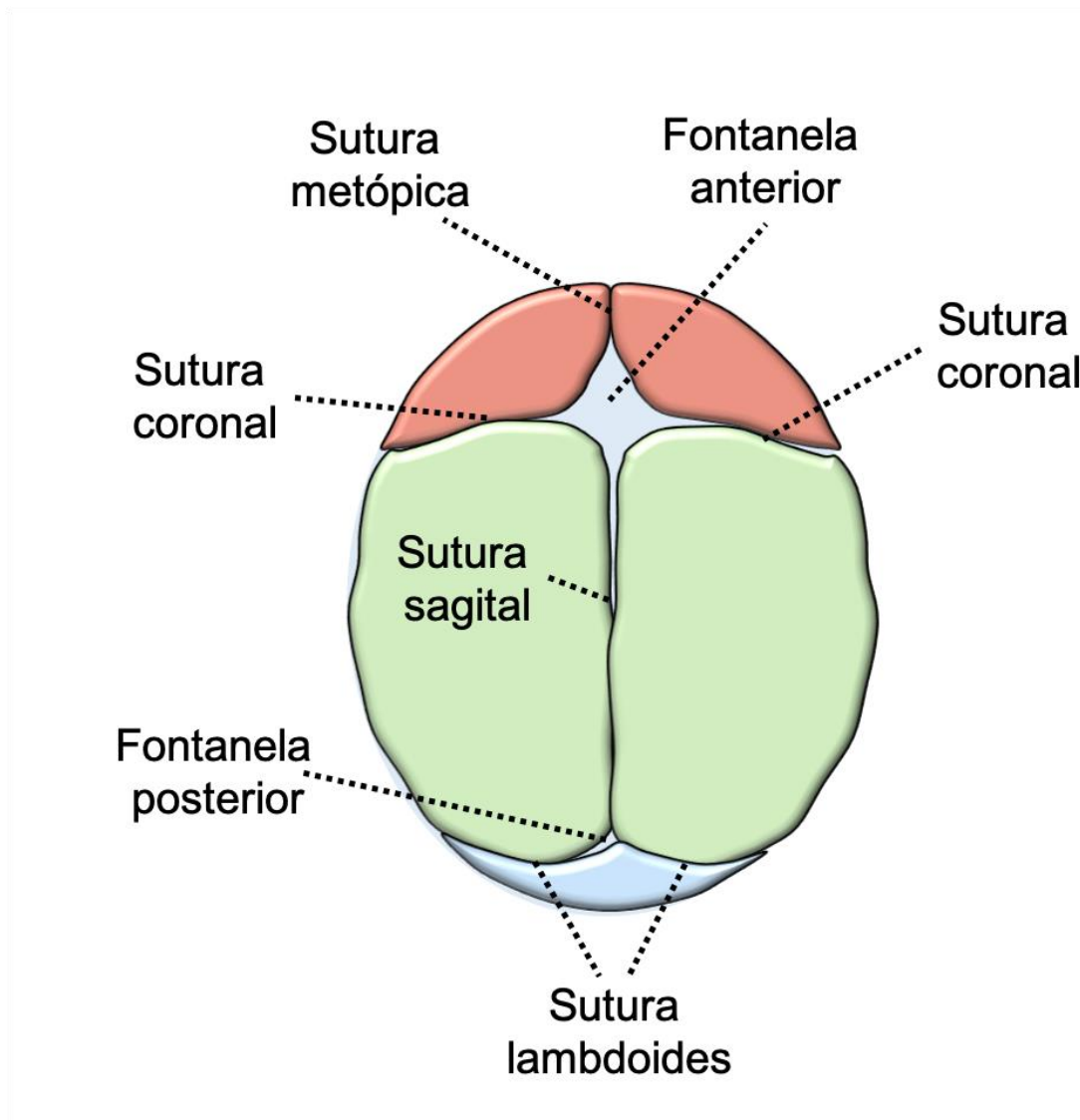


Figura 7. Representação esquemática das suturas e fontanelas da calota craniana de um recém-nascido.

As suturas podem ser vistas como um complexo, composto por quatro componentes principais: as duas frentes osteogênicas dos ossos em aproximação, o tecido mesenquimal com células osteoprogenitoras, a dura-máter subjacente e o periósteo (Lenton *et al.*, 2005; Di Ieva *et al.*, 2013). À medida que o cérebro cresce, os ossos da calota craniana se deslocam para fora. Esse deslocamento estimula a formação óssea da calota, na mesma proporção com que o deslocamento ocorre, aumentando assim a circunferência de cada osso (Jin *et al.*, 2016). As células osteoprogenitoras que estão próximas às frentes osteogênicas são recrutadas e se diferenciam em osteoblastos, enquanto as células do centro da sutura permanecem indiferenciadas durante o crescimento (Lenton *et al.*, 2005;

Beederman *et al.*, 2014). O crescimento nas suturas é perpendicular à sua orientação. Por exemplo, a orientação da sutura sagital é ântero-posterior, portanto, o crescimento ósseo intramembranoso a partir dessa sutura aumenta a dimensão médio-lateral do crânio (Morriss-Kay e Wilkie, 2005).

As suturas e as fontanelas desaparecem em períodos diferentes da vida. As fontanelas desaparecem primeiro. Em humanos, a fontanela posterior desaparece completamente aos 3 meses de idade, enquanto a fontanela anterior desaparece aproximadamente aos 2 anos de idade. O período em que suturas desaparecem é variável. A sutura metópica desaparece durante a infância em humanos, enquanto as suturas coronal, sagital e lambdoides geralmente permanecem patentes na idade adulta (Kabbani e Raghuvver, 2004). Em camundongos, a sutura interfrontal, que corresponde à sutura metópica em humanos, desaparece 40 dias após o nascimento, enquanto as suturas sagital, coronal e lambdoide ainda estão patentes na vida adulta, aproximadamente aos 8 meses (Opperman, 2000; Morriss-Kay e Wilkie, 2005).

Embora os mecanismos exatos que determinam a fusão ou patência das suturas cranianas ainda não tenham sido elucidados, alguns estudos demonstram que a dura-máter tem papel importante nesse controle (Slater *et al.*, 2008). Opperman *et al.* (1993) demonstraram que o transplante da sutura coronal sem a dura-máter de ratos neonatos em ratos adultos resulta em fusão da sutura em três semanas, enquanto o transplante da sutura coronal com a presença dura-máter não se fecha, permanecendo patente. Da mesma forma, Levine *et al.* (1998) retiraram um fragmento de osso da calota craniana, que foi então rotacionado 180° e reimplantado, de modo que a sutura interfrontal posterior ficasse sobre a dura-máter anteriormente subjacente à sutura sagital e vice-versa. Os pesquisadores encontraram a sutura sagital fundida patologicamente, enquanto a sutura interfrontal posterior permaneceu anormalmente patente.

O papel do perióstio também foi investigado para determinar sua importância no destino das suturas cranianas. No entanto, ao contrário da dura-máter, parece que o perióstio sobrejacente não é tão essencial para a manutenção da patência das suturas cranianas (Slater *et al.*, 2008). Mas, apesar de não ter papel importante no crescimento dos ossos em relação à circunferência, o perióstio é responsável pelo crescimento em espessura do osso (Jin *et al.*, 2016).

Além da dura-máter e do periósteo, as frentes osteogênicas também possuem papel importante na regulação das suturas, por meio do controle do equilíbrio entre proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular, garantindo uma proporção constante de crescimento e separação entre elas (Di Ieva *et al.*, 2013). Nesse sentido, a via de sinalização mais bem estabelecida associada à proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras da sutura craniana é a via do receptor do FGF (FGFR) (Ornitz e Marie, 2002; Beederman *et al.*, 2014).

A via de sinalização da família do FGF é composta por 22 proteínas secretadas que interagem com quatro receptores (FGFRs) (Ornitz e Itoh, 2015). Dos 22 ligantes do FGF, cinco foram identificados na calota craniana: FGF2, FGF4 e FGF9 que são expressos no mesênquima da sutura; e o FGF8 e FGF18, que são expressos nos osteoblastos. Em relação à ligação com o receptor, o FGF2, o FGF4 e o FGF8 podem se ligar a todas as três isoformas de receptor expressas no crânio, enquanto o FGF9 e o FGF18 podem se ligar ao FGFR2 ou FGFR3 (Leitch *et al.*, 2020).

Sabe-se que a expressão de FGFR1 e FGFR2 regula o equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação das células na sutura craniana. O FGFR2 é expresso nas células osteoprogenitoras e é responsável por estimular sua proliferação, enquanto o FGFR1 estimula a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, sendo expresso em ambos os tipos celulares (Ornitz e Marie, 2002; Morriss-Kay e Wilkie, 2005; Di Ieva *et al.*, 2013). O FGFR3 é expresso em baixos níveis na sutura craniana e é encontrado principalmente na cartilagem, inibindo a proliferação durante a condrogênese. Já o FGFR4 não é expresso nas suturas cranianas (Morriss-Kay e Wilkie, 2005; Di Ieva *et al.*, 2013). Mutações nos FGFR causam mudanças na responsividade ao receptor, seja tornando os receptores constitutivamente ativos, independente do ligante, ou aumentando a afinidade do receptor pelo ligante (Hajihosseini, 2008). Zhou *et al.* (2000) demonstraram que a mutação em FGFR1 regula positivamente a expressão de RUNX2, que, por sua vez, é um fator de transcrição chave na osteogênese e regula outros genes importantes como os da sialoproteína óssea e da osteocalcina, resultando em crescimento ósseo intramembranoso acelerado com fusão prematura das suturas cranianas.

Além da sinalização pela via FGF, a expressão dos fatores de transformação do crescimento beta (TGF β 1, β 2 e β 3) e o receptor TGF β 3 tipo I têm sido associados na regulação da sutura por meio do controle da proliferação e da apoptose das células osteoprogenitoras. O TGF β 2 estimula a proliferação e diminui a apoptose dos

osteoblastos, enquanto o TGF β 3 diminui a proliferação e aumenta a apoptose. Como consequência, pode-se dizer que o TGF β 2 estimula a fusão das suturas e o TGF β 3 auxilia na manutenção da patência das suturas (Opperman, Nolen e Ogle, 1997; Opperman, Adeb e Gakunga, 2000; Opperman *et al.*, 2002).

Os fatores sistêmicos que estimulam o crescimento ósseo a partir das suturas incluem GH, hormônios tireoidianos e esteroides sexuais (Fujita *et al.*, 2004; Litsas, 2013; Leitch *et al.*, 2020). Em estudo cefalométrico, as ratas com deficiência de GH apresentaram menor tamanho e crescimento dos ossos cranianos (Vandeberg *et al.*, 2004). Crianças com deficiência do GH apresentam menor tamanho craniofacial e idade óssea geralmente atrasada em 2 anos em comparação com a idade cronológica. Todavia, as informações sobre os efeitos craniofaciais do GH são limitadas (Litsas, 2013, 2015). Os hormônios tireoidianos também são essenciais para o crescimento craniofacial, e o excesso ou a ausência desses hormônios resulta em má formação craniana (Leitch *et al.*, 2020). Os mecanismos de ação dos HTs na ossificação intramembranosa serão descritos posteriormente.

Fujita *et al.* (2004) demonstraram que camundongos submetidos à ovariectomia aos 5 dias de idade apresentam inibição do crescimento craniofacial quatro semanas após a cirurgia, sugerindo que os hormônios sexuais são um fator crítico para o crescimento intramembranoso. Da mesma forma, ratas ovariectomizadas aos 21 dias de idade apresentam alteração nas dimensões dos ossos cranianos aos 63 dias, pós-puberdade, com redução do comprimento do osso parietal, reforçando a ideia de que o estrógeno é importante durante o crescimento ósseo (de Lara *et al.*, 2020). A sutura craniana expressa os receptores ER α e ER β , e a sinalização do estrógeno está associada à fusão fisiológica da sutura craniana. A adição de estradiol em culturas de células derivadas da sutura craniana aumenta a diferenciação osteogênica, com aumento da fosfatase alcalina, de matriz pelo vermelho de alizarina e dos transcritos gênicos *Runx*, *Oc* e *Coll* (James *et al.*, 2009).

Dessa forma, o equilíbrio entre a proliferação, a diferenciação e a apoptose das células das suturas e fontanelas é essencial para o crescimento ósseo intramembranoso coordenado e adequado. Qualquer fator que interfira com essas atividades celulares pode levar à fusão precoce das suturas, resultando em craniossinostose (Opperman, 2000) que será descrita detalhadamente ao final desta revisão.

2. Hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos (HTs) são produzidos pela tireoide em um processo que envolve o transporte de iodo para dentro da célula folicular e a sua oxidação e incorporação em resíduos de tirosina na molécula de tireoglobulina. Essa iodação das tirosinas resulta na síntese de resíduos monoiodados representados pelas monoiodotirosinas (MIT) e diiodados representados pela diiodotirosinas (DIT). Uma molécula de DIT e uma de MIT se ligam para formar a triiodotironina (T3) e duas moléculas de DIT se unem para formar a tiroxina (T4). A tireoglobulina iodada contendo MIT, DIT, T4 e T3, é armazenada no coloide presente no lúmen dos folículos da tireoide. Em seguida, ocorre endocitose da tireoglobulina pela célula folicular tireoidiana e digestão proteolítica, com liberação de T3 e T4 na circulação sanguínea (Yen, 2001; Mendoza e Hollenberg, 2017).

A síntese e a secreção dos HTs são reguladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT) (Fig. 8). O hormônio liberador de tireotrofina (TRH), produzido pelo hipotálamo, atua em receptores de membrana específicos presentes na hipófise estimulando a transcrição gênica e a secreção do hormônio tireotrófico (TSH). O TSH interage com os receptores presentes na membrana das células foliculares da tireoide, estimulando a síntese e a secreção de T3 e T4. Por outro lado, a secreção de TSH é regulada negativamente pelos próprios HTs, ou seja, por *feedback* negativo que mantém uma relação fisiológica inversa entre o TSH e os hormônios T3 e T4 (Bassett e Williams, 2016).

O principal hormônio secretado pela tireoide é a T4, que pela atividade das enzimas iodotironina desiodase, é convertida em T3 por meio da desiodação. Três enzimas desiodases (D1, D2 e D3) são responsáveis por controlar as concentrações dos HTs. A desiodase D1 possui ampla distribuição tecidual, sendo considerada a principal responsável por manter o nível circulante de T3. A D1 pode catalisar tanto a remoção do iodo do carbono 5' do anel externo quanto do carbono 5 do anel interno de T4, formando T3 ativo ou um metabólito inativo (T3 reverso ou rT3), respectivamente. Além disso, pode catalisar a desiodação de T3 formando outro metabólito inativo, o T2. A D2, por sua vez, está presente em um número limitado de tecidos, como o cérebro, hipófise, tecido adiposo marrom, placenta e corpo pineal; e somente possui a capacidade de catalisar a remoção do iodo do carbono 5' do anel externo de T4, sendo a principal enzima responsável pela manutenção dos níveis locais de T3. A terceira isoforma de desiodase,

a D3, é muito expressa nos tecidos em desenvolvimento, principalmente no sistema nervoso central (SNC), embora também seja detectada em tecidos como a pele, o fígado, a placenta e o SNC no indivíduo adulto. A D3 catalisa unicamente a desiodação do anel interno das moléculas de T4 e T3, resultando na formação dos metabólitos inativos rT3 e T2, respectivamente (Croteau *et al.*, 1995; Köhrle, 1999; Yen, 2001; Gereben *et al.*, 2008). As atividades de D2 e D3 são responsáveis por determinar a disponibilidade intracelular de T3 no osso, uma vez que D1 não é expressa no esqueleto (Waung *et al.*, 2012).

Os HTs entram na célula alvo mediados por transportadores de membrana, como os transportadores de monocarboxilato (MCT8, MCT10), proteína transportadora de ânions orgânicos 1C1 (OATP1C1) e transportadores inespecíficos de aminoácidos do tipo 1 e 2 (LAT1, LAT2) (Bassett e Williams, 2018). Os condrócitos expressam os transportadores MCT8, MCT10 e LAT1. Os osteoblastos expressam MCT8, LAT1 e LAT2, enquanto os osteoclastos expressam apenas MCT8 (Bassett e Williams, 2016; Gouveia *et al.*, 2018).

Dentro da célula alvo, os HTs desempenham sua função ativando seus receptores nucleares (TRs), que estão presentes em inúmeras células do organismo, incluindo as células ósseas e cartilaginosas. Quatro isoformas de TRs já foram bem caracterizadas, TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2, além de isoformas menores com funções ainda desconhecidas (Boelaert e Franklyn, 2005). Os receptores TR α 1 e TR β 1 são expressos no osso, sendo que o TR α 1 é expresso 12 vezes mais que o TR β 1, sugerindo que TR α 1 apresenta predomínio como mediador da ação da T3 no osso (O'Shea *et al.*, 2003). Os condrócitos da placa epifisária, por sua vez, expressam TR α 1, TR α 2 e TR β 1 (Bassett e Williams, 2016).

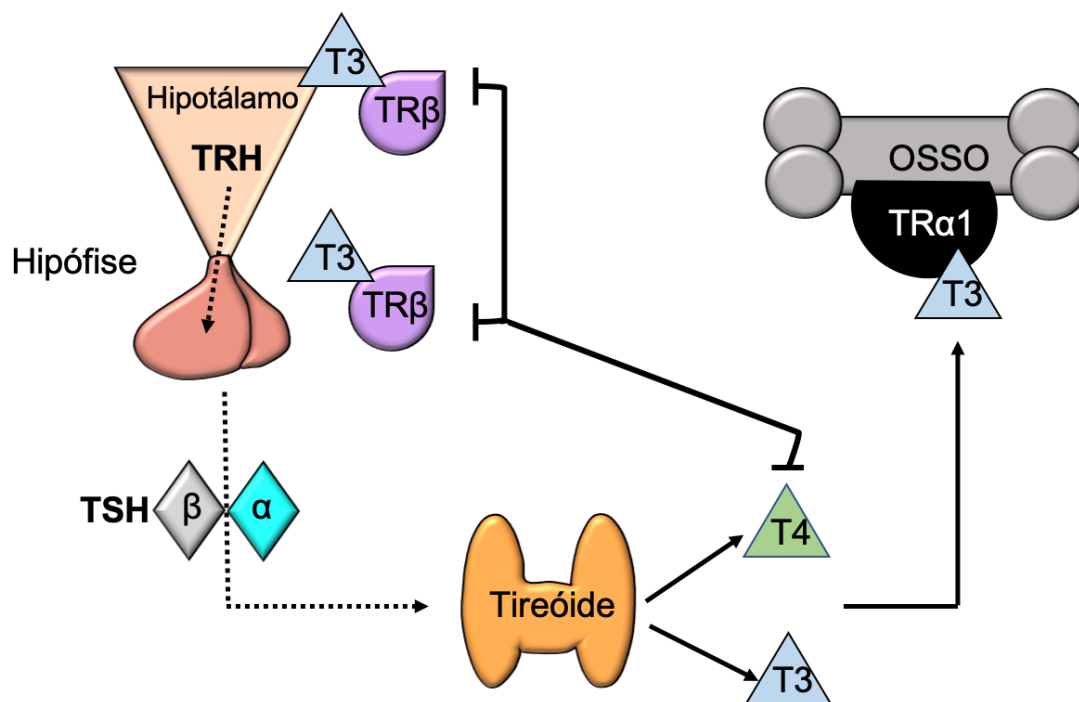


Figura 8. Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Níveis baixos dos hormônios tireoidianos (HTs) no sangue são detectados pelo hipotálamo e pela hipófise. O hormônio liberador da tireotropina (TRH) é liberado pelo hipotálamo, estimulando a hipófise a liberar o hormônio estimulador da tireoide (TSH). O TSH estimula a tireoide a produzir os HTs, que agem no osso principalmente via TR α 1. Por outro lado, níveis elevados de HTs no sangue inibem a liberação de TRH e TSH.

2.1 Transferência dos hormônios tireoidianos da mãe para o feto

Os HTs são fundamentais para o desenvolvimento de diversos tecidos e órgãos, principalmente para o desenvolvimento do cérebro e do esqueleto. Suas ações incluem diversos processos celulares, como a sobrevivência e a diferenciação celular, a homeostase celular e a regulação metabólica. Os HTs atuam diretamente por meio de efeitos anabólicos no metabolismo fetal e indiretamente controlando a biodisponibilidade e a eficácia de outros hormônios e fatores de crescimento. Além disso, o aumento de T3 no período pré-parto tem um papel importante na mediação de vários dos efeitos maturacionais dos glicocorticoides no final da gestação (Boelaert e Franklyn, 2005; Forhead e Fowden, 2014; Springer *et al.*, 2017).

Em humanos, a tireoide fetal se forma como uma bolsa na linha média do assoalho anterior da faringe. Ela migra caudalmente e atinge sua posição final por volta das 7

semanas de gestação. A forma bilateral é aparente por volta da 9^o semana de gestação, entretanto, ainda não é funcional. Por volta da 20^o semana de gestação, a concentração sérica de TSH, T4 e tireoglobulina começa a aumentar, atingindo a concentração sérica dos adultos por volta da 36^o semana de gestação (Vulsma *et al.*, 1989; Thorpe-Beeston *et al.*, 1991; Neale *et al.*, 2007). Em roedores, a tireoide começa a se desenvolver por volta do 8^o dia de gestação e a formação folicular e a produção hormonal ocorrem a partir do 16^o dia. Entretanto, ao contrário dos humanos que nascem com a tireoide totalmente funcional, nos ratos a maturação da função tireoidiana pode ocorrer até a 4^o semana de vida pós-natal (Rugh, 1968; Brown *et al.*, 2000; Forhead e Fowden, 2014).

Dessa forma, a tireoide fetal não sintetiza a quantidade necessária dos HTs para o desenvolvimento normal, sendo dependente do suprimento materno nesse período, uma vez que os HTs possuem papel essencial para o desenvolvimento e crescimento fetal (Boelaert e Franklyn, 2005; Mendoza e Hollenberg, 2017). Em humanos, ao final do primeiro trimestre de gestação, a concentração sérica materna de gonadotrofina coriônica humana (hCG) produzida pela placenta é suficiente para se ligar ao receptor de TSH, estimulando parcialmente a atividade do eixo HHT materno. A ligação da hCG com o receptor de TSH estimula a produção de T4, diminui os níveis séricos de TSH e aumenta os níveis livres de T4 (Choksi *et al.*, 2003). Em resposta à dependência fetal dos HTs maternos, a concentração de T4 da mãe aumenta em 20% a 50% durante a gravidez para manter o estado eutireoideo. Esse aumento na concentração sérica depende de níveis adequados de iodo, que pode exigir um aumento na suplementação de iodo durante a gravidez (Springer *et al.*, 2017).

Os HTs atravessam a placenta para a circulação fetal em quantidade suficiente para sustentar a função tireoidiana fetal. As desidases presentes na placenta metabolizam a T4 materna em T3 para ser usada pelo feto, mas uma quantidade significativa de T4 também é transferida para o feto. A placenta é livremente permeável ao iodeto e ao TRH, mas não ao TSH. Acredita-se que o TRH materno transferido ao feto tenha um papel importante no controle da função tireoidiana fetal antes da maturidade do eixo HHT (Vulsma *et al.*, 1989; Chan e Kilby, 2000; Neale *et al.*, 2007).

A concentração sérica de T4 durante o primeiro trimestre de gestação em humanos reflete a concentração dos HTs materno. Essa dependência diminui à medida que a produção dos HTs pela tireoide fetal aumenta e o eixo HHT amadurece. Ao nascimento, o T4 materno

representa 30% a 50% do T4 medido no sangue do cordão umbilical, demonstrando que essa dependência dos HTs maternos permanece até o parto (Eng e Lam, 2020).

Após o nascimento, ocorrem várias mudanças que estimulam a produção do hormônio tireoidiano neonatal, dentre elas a transição do bebê de um ambiente uterino quente para o ambiente extra-uterino frio. Acredita-se que essa mudança é um dos fatores que estimula o hipotálamo neonatal a secretar TRH, que, por sua vez, estimula a hipófise a secretar TSH, levando a um pico de TSH. O pico de TSH estimula a tireoide neonatal a produzir os HTs (Fisher e Odell, 1969; Eng e Lam, 2020).

Sabe-se que os hormônios tireoidianos e seus metabólitos estão presentes no leite materno em humanos, todavia, há uma grande variação na concentração de T3 e T4 observada na literatura. Além disso, não se sabe se a concentração dos HTs no leite possui uma importância para os bebês, uma vez que não são encontradas diferenças significativas nos níveis séricos de T3 e T4 entre bebês amamentados com leite materno e bebês alimentados com mamadeira (Mizuta *et al.*, 1983; Oberkotter, 1986). Da mesma forma, a quantidade dos HTs presente no leite materno não contribui para aumentar os níveis de HTs em bebês prematuros com hipotiroxinemia (Van Wassenaer *et al.*, 2002; Van Wassenaer e Kok, 2004).

3. Hormônios tireoidianos na ossificação endocondral e intramembranosa

Os HTs são reguladores imprescindíveis do desenvolvimento e crescimento ósseo, sendo fundamentais tanto durante a ossificação pré-natal quanto no crescimento ósseo pós-natal (Bakos *et al.*, 2018). Os receptores para os hormônios tireoidianos são amplamente expressos no esqueleto. Os osteoblastos, osteoclastos e condrócitos expressam TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2, sendo portanto responsivos aos HTs que diretamente influenciam na formação e no crescimento ósseo (Gouveia *et al.*, 2018).

3.1 Ação dos hormônios tireoidianos na ossificação endocondral

Durante a ossificação endocondral, os condrócitos passam por uma série de eventos, incluindo proliferação, diferenciação e maturação celular e síntese de matriz extracelular, conforme descrito em detalhes anteriormente. Esses eventos que ocorrem tanto na formação óssea pré-natal, quanto durante o crescimento ósseo pós-natal devem ser regulados com precisão, de forma que haja equilíbrio entre a proliferação e a diferenciação terminal dos condrócitos (Adams *et al.*, 2007).

A presença de receptores para os HTs em condrócitos e os ensaios *in vitro* com adição dos HTs em culturas de condrócitos têm demonstrado como os efeitos diretos dos HTs nessas células são críticos para a formação pré-natal e crescimento pós-natal endocondral. A adição de T3 ou T4 em culturas de condrócitos de camundongos e de galinha induz a diferenciação hipertrófica dos condrócitos, com expressão de COL10 e MMP13, bem como aumenta a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização da matriz (Bohme *et al.*, 1992b; Alini *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2002; Lakatos *et al.*, 2019). Além disso, a adição de T4 em cultivo tridimensional de condrócitos promove a organização colunar dessas células, semelhante ao que se observa na zona de proliferação da placa de crescimento ou epifisária (Ballock e Reddi, 1994).

Em culturas de *pellets* de condrócitos derivados de costelas de camundongos, Okubo *et al.* (2003) demonstraram que além de induzir a diferenciação hipertrófica e a organização de condrócitos em padrão colunar, a T4 também reduz a expressão de SOX9. Em contraste, Fernández-Pernas *et al.* (2016) demonstrou o efeito positivo de doses fisiológicas de T3 na expressão de *SOX9* e *COL2* durante a diferenciação condrogênica de células tronco derivadas do cordão umbilical humano. O aumento da expressão de *Sox9* e de *Col2* também foi observado durante a adição de T3 em culturas de células tronco da medula óssea de ratos submetidas à diferenciação condrogênica (Assis *et al.*, 2018).

A diferença de resultados observada entre os estudos com relação à expressão de SOX9, em culturas de células sob efeito dos HTs, pode ser explicada pelas diferenças no que concerne ao tipo de célula utilizada, às condições da cultura, incluindo tempo de cultivo e dose do hormônio. Além disso, é possível que os HTs tenham efeito distinto com relação ao SOX9, aumentando sua expressão em células menos diferenciadas, para induzir a diferenciação condrogênica, e diminuindo sua expressão, em condrócitos mais diferenciados, para promover a diferenciação terminal dos condrócitos (Gouveia *et al.*, 2018).

Em relação ao efeito dos HTs na proliferação, a maioria das pesquisas demonstra que os HTs inibem a proliferação dos condrócitos. No entanto, há também estudos que demonstram aumento da proliferação de condrócitos sob efeito dos hormônios tireoidianos e ainda estudos que demonstram não haver efeito desses hormônios sobre a proliferação dessas células (Bohme *et al.*, 1992; Robson *et al.*, 2000; Shao *et al.*, 2006; Gouveia *et al.*, 2018).

Essa inconsistência de resultados no que concerne ao efeito dos HTs na proliferação celular pode ser reflexo de uma interação local com o sistema IGF1/IGF1R. Um dos mecanismos pelo qual os HTs estimulam o crescimento ósseo é por meio do controle indireto da síntese e da secreção de GH e do IGF1. Além disso, os HTs também aumentam a expressão dos receptores para o GH e o IGF1 (GHR e IGF1R) em condrócitos da placa de crescimento e em osteoblastos, o que sugere que os HTs aumentam a responsividade do esqueleto ao GH e ao IGF1. Dessa forma, o aumento da proliferação pelos HTs parece ser resultado da interação local dos HTs com o eixo GH / IGF1, em que predomina o efeito positivo do eixo GH/IGF1 na proliferação de condrócitos sobre um possível efeito negativo da ação direta dos HTs na proliferação (Gouveia *et al.*, 2018).

Apesar dessa importante interação entre os HTs com o eixo GH/IGF1, acredita-se que os HTs também regulam a ossificação endocondral independentemente desse eixo, uma vez que a administração de T4 recupera o atraso de ossificação observado em ratos hipofisectomizados e tireoidectomizados, enquanto o GH sozinho não afeta esse processo (Gouveia *et al.*, 2018). Da mesma forma, a administração de GH não recupera o atraso da ossificação observado nos camundongos *knockout* TR α 1 e TR β (Kindblom *et al.*, 2001).

Outra provável via pela qual os HTs modulam a hipertrofia dos condrócitos é a via Wnt/ β -catenina. Wang *et al.* (2007) demonstraram que a adição de T3 em condrócitos da placa de crescimento de ratos mantidos em cultura 3D regula positivamente tanto o mRNA de Wnt4 quanto a expressão da proteína, aumenta o acúmulo celular de β -catenina estabilizada e a atividade transcricional de TCF/LEF, além de estimular a expressão de Runx2, que é um gene alvo de Wnt (Fig. 5).

3.2 Ação dos hormônios tireoidianos na ossificação intramembranosa

Os efeitos dos HTs na ossificação endocondral são resultantes de ações diretas da T3 nos condrócitos, promovendo principalmente a diferenciação terminal dos condrócitos. Em contrapartida, os mecanismos pelos quais os HTs participam do processo de ossificação intramembranosa são menos esclarecidos, parecendo envolver ações diretas da T3 sobre as células precursoras presentes na sutura craniana, promovendo a osteoblastogênese e induzindo a atividade osteoblástica (Gouveia *et al.*, 2018).

Os osteoblastos primários apresentam receptores para os HTs e são influenciados diretamente pela T3. Todavia, os estudos demonstram que esse efeito parece variar de acordo com a linhagem celular, número de passagem, confluência celular, estágio de

diferenciação, dose e duração do tratamento. Essa combinação pode resultar no estímulo, inibição ou na ausência de efeito sobre a proliferação osteoblástica (Ohishi *et al.*, 1994; Varga *et al.*, 1997; Fratzl-Zelman *et al.*, 2003; Bassett e Williams, 2016). Esse efeito dose-dependente da T3 também foi observado na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (Boeloni *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados divergentes descritos anteriormente, parece haver mais consenso de que a T3 estimula a proliferação e a diferenciação osteoblástica, além de estimular a síntese de matriz óssea, aumentando a expressão de osteocalcina, osteopontina, colágeno tipo I e fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos (Bassett e Williams, 2016). A adição de T4 em células MC3T3-E1 da calvária de murino aumenta a atividade da fosfatase alcalina e a expressão de vários marcadores da osteogênese, incluindo fosfatase alcalina, osteocalcina, MMP9 e os fatores de crescimento de fibroblastos 1 e 2 (FGF1 e FGF2) (Cray *et al.*, 2013).

Em osteoblastos extraídos da calvária de ratos e de camundongos tratados com T3 por 6h a 48h, a expressão de mRNA do *Fgfr1* foi de 2 a 3 vezes maior que o grupo controle, enquanto a proteína FGFR1 foi 2 a 4 vezes maior. Curiosamente, esses efeitos foram anulados em culturas primárias de osteoblastos nocaute para TR α (Stevens *et al.*, 2003). *In vivo*, também foi observado o aumento da expressão de *Fgfr1* em osteoblastos de camundongos TR $\beta^{pv/pv}$, que apresentam uma mutação negativa para TR β , resultando em tireotoxicose (O'Shea *et al.*, 2003b). Em contraste, a expressão de *Fgfr1* foi reduzida em osteoblastos e osteócitos de camundongos nocaute para TR α , (TR $\alpha^{0/0}$) e em osteoblastos de camundongos TR $\alpha^{1^{pv/+}}$, ambos dos quais apresentam hipotireoidismo (Stevens *et al.*, 2003; O'Shea *et al.*, 2005). Dessa forma, acredita-se que a sinalização do FGF/FGFR é um dos mediadores das ações dos HTs nos osteoblastos e condrócitos (Wojcicka *et al.*, 2013; Bassett e Williams, 2016; Gouveia *et al.*, 2018).

4. Disfunções tireoidianas em gestantes e indivíduos em crescimento

4.1 Hipotireoidismo e alterações do crescimento ósseo

O hipotireoidismo é uma disfunção caracterizada pela produção insuficiente de hormônios da tireoide, que pode ser causada pela deficiência na síntese dos HTs ou da resistência à ação dos mesmos (Brenta *et al.*, 2013). A principal causa de hipotireoidismo primário é a tireoidite crônica autoimune (doença de Hashimoto). Outras causas são a remoção cirúrgica da tireoide, irradiação externa, deficiência de iodo e substituição da

tireoide por tumor. O hipotireoidismo ainda pode ser secundário às doenças hipofisárias e hipotalâmicas (Baskin *et al.*, 2002).

A prevalência do hipotireoidismo varia entre os estudos dependendo da idade, sexo, raça e iodossuficiência. A prevalência de hipotireoidismo na população geral varia entre 0,2% a 5,3% na Europa e 0,3% a 3,7% no EUA (Taylor *et al.*, 2018). No Brasil, há poucos estudos sobre a prevalência das desordens tireoidianas. Em uma amostra populacional de mulheres no Rio de Janeiro, a prevalência de hipotireoidismo foi de 12,3%, atingindo até 19,1% entre aquelas acima de 70 anos. Além disso, mulheres brancas apresentaram maior prevalência de hipotireoidismo do que mulheres pardas e negras (Sichieri *et al.*, 2007). A prevalência de hipotireoidismo durante a gestação é de aproximadamente 2% a 3% do total de gestantes (Stagnaro-Green e Pearce, 2012; Taylor *et al.*, 2018).

As mulheres gestantes com hipotireoidismo têm maior risco de ocorrência de aborto espontâneo, pré-eclâmpsia, descolamento prematuro da placenta, menor peso fetal, prematuridade e natimortos. Os sintomas de hipotireoidismo incluem ganho de peso modesto, letargia, diminuição da capacidade de exercício e intolerância ao frio. Em mulheres mais sintomáticas, também ocorre constipação, queda de cabelo, unhas quebradiças, pele seca e bócio. Todavia, os sintomas do hipotireoidismo podem ser mascarados frequentemente pelo estado hipermetabólico da gestação (Idris *et al.*, 2005; Neale *et al.*, 2007; Stagnaro-Green e Pearce, 2012; Andersen *et al.*, 2013).

O hipotireoidismo congênito ocorre em 1 a cada 2000-4000 recém-nascidos, e cerca de 85% dos casos é causado por alguma forma de disgenesia da tireoide que resulta em hipotireoidismo primário. As características clínicas comuns incluem diminuição da atividade e aumento do sono, dificuldade de alimentação, constipação, icterícia prolongada, abdome distendido com hérnia umbilical, hipotonia e déficit intelectual grave (Guerri *et al.*, 2019). Além dessas alterações, o hipotireoidismo congênito, assim como o hipotireoidismo juvenil e o hipotireoidismo materno, resultam em alterações graves no esqueleto (Gil-Garay *et al.*, 1991; Bassett e Williams, 2016; Guerri *et al.*, 2019).

O hipotireoidismo congênito e o hipotireoidismo juvenil causam atraso no desenvolvimento esquelético, retardo no crescimento e baixa estatura com comprometimento da maturação óssea devido à falha na ossificação endocondral (Rivkees *et al.*, 1998; Bassett e Williams, 2016; Bakos *et al.*, 2018). Todavia, com o início precoce e monitoramento adequado da reposição de HTs, a maioria dos sintomas do

hipotireoidismo congênito, incluindo aqueles do sistema esquelético, podem ser evitados (Salerno *et al.*, 2001, 2004).

O atraso no crescimento é observado em vários modelos animais nos quais há deficiência do HT, incluindo camundongos nocaute para o fator de transcrição PAX8, crítico para o desenvolvimento das células foliculares da tireoide (Flamant *et al.*, 2002), e camundongos nocaute para TR α 1 e 2 (Fraichard *et al.*, 1997). Em ratos jovens tireoidectomizados, as placas de crescimento são desorganizadas, com redução da espessura da zona hipertrófica, ausência da expressão de COL10 e falha na invasão vascular (Stevens *et al.*, 2000). Em camundongos com deficiência de HT (TSHR^{-/-}), a ossificação endocondral do centro de ossificação secundário aos 14 dias é gravemente comprometida, quando comparado ao grupo controle. Os camundongos TSHR^{-/-} que recebem tratamento com T3 e T4 por 10 dias (do dia 5 ao dia 14) se recuperam completamente do fenótipo atrasado (Xing *et al.*, 2014).

Ratas prenhas com hipotireoidismo dão origem a neonatos que servem de modelo ao hipotireoidismo congênito e exibem anormalidades características, com atraso na ossificação endocondral e diminuição do tamanho dos ossos longos (Gil-Garay *et al.*, 1991; Ahmed e Janjua, 2003). Filhotes de ratos nascidos de mães com hipotireoidismo possuem redução no comprimento de 13,67% na ulna e 27,84% na tíbia aos 10 dias de idade, em comparação com o grupo controle. Mas, os filhotes de mães hipotireoideas que receberam tiroxina apresentaram redução no comprimento de 5,08% na ulna e de 3,91% da tíbia. Além disso, o diâmetro da tíbia e da ulna também foi significativamente menor nesses animais (Ahmed e Janjua, 2003). Da mesma forma, o hipotireoidismo materno subclínico em ratos também possui efeitos deletérios na ossificação endocondral dos filhotes, com redução da proliferação de condrócitos e atraso na diferenciação hipertrófica (Milošević *et al.*, 2018).

Além de afetar a ossificação endocondral, o hipotireoidismo congênito também prejudica a ossificação intramembranosa resultando no fechamento tardio das fontanelas, na persistência das suturas do crânio e no alargamento da face (Hüffmeier *et al.*, 2007). Outras anormalidades craniofaciais que também podem ser observadas em crianças com hipotireoidismo congênito e de mães com hipotireoidismo materno são erupção dentária tardia, ossos cranianos supranumerários (ossos wormianos), macroglossia e micrognatia (Loevy *et al.*, 1987; Pezzuti *et al.*, 2009; Vucic *et al.*, 2017).

Camundongos geneticamente modificados com hipotireoidismo congênito manifestam o mesmo fenótipo craniofacial da condição humana (Bassett e Williams, 2016). Camundongos TR α 1pv/+ que possuem fenótipo de hipotireoidismo apresentam atraso no fechamento das fontanelas e das suturas (O'Shea *et al.*, 2005).

Em adultos, o hipotireoidismo também resulta em diminuição da remodelação óssea, uma vez que a diminuição dos HTs leva à diminuição da função osteoblástica e osteoclástica (Bakos *et al.*, 2018). Estudos demonstraram um declínio nos marcadores bioquímicos da remodelação óssea em pacientes com hipotireoidismo (Nakamura *et al.*, 1996). Da mesma forma, em ratas adultas, o hipotireoidismo causa osteopenia intensa pela inibição da aposição óssea e aumento da reabsorção óssea. Além disso, em ratos adultos, o hipotireoidismo também interrompe o crescimento longitudinal, uma vez que a placa epifisária permanece ativa vários meses após a maturidade sexual, ao contrário de outros mamíferos (Ribeiro *et al.*, 2004).

4.2 Hipertireoidismo e alterações do crescimento ósseo

O hipertireoidismo é caracterizado pelo excesso dos HTs. As principais causas são a doença de Graves, o adenoma tóxico, o bócio multinodular tóxico e a tireoidite subaguda dolorosa (Baskin *et al.*, 2002). A incidência das diferentes causas de hipertireoidismo varia com a idade. O bócio multinodular tóxico é a principal causa de hipertireoidismo após os 50 anos de idade, enquanto a doença de Graves tem maior incidência entre os pacientes com menos de 50 anos (Andersen e Andersen, 2021). Uma causa importante de hipertireoidismo durante o primeiro trimestre da gestação é a elevação da hCG, que apresenta subunidades idênticas ao TSH, acarretando na estimulação do receptor para o TSH (Bártholo *et al.*, 2014).

A prevalência de hipertireoidismo varia de 0,2% a 1,3% nos países que são considerados suficientes em iodo, sendo a ocorrência maior em mulheres. O hipertireoidismo durante a gestação possui incidência estimada de 0,2%, podendo chegar até 2%, quando são considerados os casos subclínicos (Taylor *et al.*, 2018). Apesar de menos prevalente que o hipotireoidismo, o hipertireoidismo é igualmente importante e vem despertando cada vez mais preocupação e atenção, devido aos seus efeitos deletérios na saúde materna e fetal (Stagnaro-green *et al.*, 2011; Stagnaro-Green e Pearce, 2012).

O hipertireoidismo materno está associado ao risco aumentado de aborto espontâneo, natimorto, parto prematuro, hipertensão induzida pela gestação e baixo peso do feto ao

nascimento (Stagnaro-Green e Pearce, 2012). As evidências sugerem que o hipertireoidismo materno prejudica o desenvolvimento do cérebro fetal em animais experimentais por meio de alterações no desenvolvimento e organização dos neurônios, alterações no ambiente neuroquímico e na expressão de diferentes proteínas no cérebro (Andersen e Andersen, 2021). Uma revisão sistemática e meta-análise em humanos sugeriu que o hipertireoidismo materno é um potencial fator de risco para distúrbios do neurodesenvolvimento na criança, incluindo transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, transtorno do espectro do autismo, epilepsia e esquizofrenia (Ge *et al.*, 2020). Além de afetar o desenvolvimento do cérebro fetal, o hipertireoidismo materno também afeta o desenvolvimento dos órgãos genitais, sistema cardiovascular e do esqueleto (Andersen e Andersen, 2021).

Ao contrário do hipotireoidismo, o hipertireoidismo resulta em ossificação endocondral acelerada e idade óssea avançada (Bassett e Williams, 2016). Bebês nascidos de mães com diagnóstico de hipertireoidismo possuem menor tamanho (Andersen *et al.*, 2013). Da mesma forma, ratos neonatos expostos ao excesso de tiroxina durante a gestação possuem menor tamanho do fêmur ao nascimento e ao desmame quando comparados com animais controle (Maia *et al.*, 2016; Ribeiro, *et al.*, 2018a). Ribeiro *et al.* (2018a) demonstraram *in vivo* que o excesso de tiroxina materna inibe a proliferação de condrócitos e aumenta a diferenciação hipertrófica da cartilagem de crescimento dos neonatos, além de alterar a composição da matriz extracelular. Os pesquisadores mostraram, por meio de análise histomorfométrica, que a porcentagem de condrócitos por área na epífise cartilaginosa femoral dos neonatos que foram expostos ao excesso de tiroxina materna foi significativamente menor em comparação ao grupo controle. A zona proliferativa apresentou menor número de condrócitos, enquanto a zona hipertrófica apresentou-se mais espessa nos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno. Além disso, houve redução significativa na expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Col2* e *Bmp2* e aumento da expressão de *Runx2* e *Coll*.

A formação óssea avançada com retardo do crescimento pós-natal também foi observada em camundongos geneticamente modificados $TR\beta^{pv/pv}$, que possuem fenótipo de hipertireoidismo. Os neonatos apresentaram formação óssea avançada, com retardo do crescimento pós-natal, quiescência prematura das placas de crescimento e ossos curtos (O'Shea *et al.*, 2003). O hipertireoidismo induzido em ratos jovens não resultou em alteração na histologia da placa de crescimento, todavia, os animais apresentaram

ausência da expressão do receptor PTHrP, que é um potente inibidor da diferenciação hipertrófica de condrócitos. A ausência de expressão de PTHrPR em placas de crescimento previne a sinalização negativa de PTHrP e facilita a progressão da diferenciação hipertrófica de condrócitos, acelerando o crescimento linear. Dessa forma, a atividade desregulada de PTHrP pode ser um dos mecanismos subjacente a distúrbios de crescimento em desordens tireoidianas na infância (Stevens *et al.*, 2000).

As alterações morfológicas no desenvolvimento ósseo causadas pelo hipertireoidismo também foram investigadas no *zebrafish*. Os animais foram tratados com T3 do período embrionário até 25 dias, quando foram observadas numerosas deformações, incluindo escoliose, fusões de cartilagens e fraturas caudais. Essas malformações foram associadas à ossificação precoce (Shkil *et al.*, 2019).

Além de acelerar a ossificação endocondral, o hipertireoidismo também acelera a ossificação intramembranosa. Em bebês e crianças, a principal consequência é o fechamento precoce das suturas cranianas, que pode resultar em craniossinostose (Riggs *et al.*, 1972; Johnsonbaugh *et al.*, 1978; Hirano *et al.*, 1995; Segni *et al.*, 1999; Higashino e Hirabayashi, 2013; Chawla *et al.*, 2015).

O hipertireoidismo materno é considerado um fator de risco importante para a craniossinostose (Rasmussen *et al.*, 2007; Carmichael *et al.*, 2015). Camundongos expostos a doses elevadas de tiroxina no período gestacional apresentam fusão prematura das suturas cranianas e expressão elevada de marcadores da osteogênese, incluindo Runx2 e fosfatase alcalina (Howie *et al.*, 2016).

4.2.1 Craniossinostose

A craniossinostose é caracterizada pela fusão ou desaparecimento prematuro de uma ou mais suturas cranianas. A craniossinostose pode ser classificada quanto ao número de suturas envolvidas e quanto à etiologia. Craniossinostose simples é quando apenas uma sutura está envolvida e craniossinostose composta é quando duas ou mais suturas estão envolvidas. Quanto à etiologia, é denominada craniossinostose primária quando a craniossinostose ocorre devido a um defeito intrínseco da sutura, e craniossinostose secundária quando é decorrente de uma causa secundária (Kabbani e Raghuvver, 2004; Tubbs *et al.*, 2012).

A craniossinostose de origem primária pode ser classificada ainda como sindrômica, quando ocorre um conjunto de características ou sintomas que caracterizam uma síndrome, ou não sindrômica, quando a craniossinostose ocorre de forma isolada, sem evidência de uma síndrome genética (Kabbani e Raghuvver, 2004; Krakow, 2017). Existem pelo menos 57 genes envolvidos na craniossinostose sindrômica. Em humanos, as causas mais comuns são as mutações nos genes dos receptores do FGF (FGFR) e na proteína relacionada à torção 1 (TWIST1) (Al-Rekabi *et al.*, 2017).

Mutações nos receptores FGF, que resultam em ativação constitutiva, são uma das principais causas de malformações craniofaciais, incluindo as síndromes de craniossinostose, como as síndromes de Apert, Crouzon, Jackson–Weiss e Pfeiffer (Muenke *et al.*, 1994; Roscioli *et al.*, 2000; Chokdeemboon *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2015). Camundongos *Fgfr*^{1250/+} com mutação no FGFR1 apresentam fusão prematura das suturas cranianas e um crânio encurtado ântero-posteriormente, alargado lateralmente e verticalmente aumentado (Zhou *et al.*, 2000; Purushothaman *et al.*, 2011). A mutação em FGFR2 também resulta em craniossinostose. Estudo com camundongos mutantes *Fgfr2*^{+/-S252W} demonstrou que a fusão da sutura coronal está associada a uma suprarregulação da osteogênese por meio do aumento da proliferação e da diferenciação osteogênica (Wang *et al.*, 2010). A mutação em FGFR3 também leva a síndromes craniofaciais, entretanto, o envolvimento das suturas cranianas é variável (Flaherty *et al.*, 2016).

Enquanto as mutações em FGFR resultam em craniossinostose pela sua ativação, as mutações em TWIST levam a craniossinostose por haploinsuficiência. Rice *et al.* (2000) demonstraram que o ligante do FGF2 estimula a expressão de TWIST na sutura craniana, e que camundongos *Twist*^{+/-} apresentam o padrão de distribuição de FGFR2 alterado. Dessa forma, os autores sugerem que o papel de TWIST é inibir a diferenciação terminal de osteoprogenitores em osteoblastos e que TWIST atua a montante das vias de sinalização de FGF. Outros autores sugerem que TWIST atua preservando o limite não osteogênico e osteogênico na sutura coronal e que a perda de integridade desse limite faz com que a sutura adquira uma propriedade osteogênica (Merrill *et al.*, 2006; Ishii *et al.*, 2015).

Em um estudo com células tronco mesenquimais extraídas das suturas cranianas de crianças com fusão precoce de sutura, a expressão de *FGFR2* foi significativamente menor nas células extraídas da sutura sinostosada, em comparação às células extraídas das suturas normais. Essa diminuição foi atribuída à expressão localizada de FGFR em

regiões específicas das suturas cranianas. Além disso, a expressão de *FGF2*, *RUNX2* e *OC* foi significativamente maior. Enquanto *FGF2* é um importante ligante da via *FGF/FGFR* que pode levar à craniossinostose, *RUNX2* e *OCN* são importantes marcadores da diferenciação osteogênica (Kong *et al.*, 2020).

As causas de craniossinostose secundária incluem: distúrbios metabólicos, como por exemplo, hipertireoidismo; malformações como a microcefalia, hidrocefalia e encefalocele; exposição prenatal ao ácido valproico ou fenitoína; e mucopolissacaridose (Cohen, 1991; Kabbani e Raghuvver, 2004). Em ambos os casos, a craniossinostose reduz o crescimento dos ossos adjacentes, em uma direção perpendicular à sutura. Conseqüentemente, a expansão normal do cérebro promove crescimento excessivo compensatório em outras suturas, levando à distorção progressiva da forma do crânio (Morriss-Kay e Wilkie, 2005). A sinostose da sutura sagital resulta no alongamento da calota craniana no diâmetro ântero-posterior e estreitamento bitemporal, que pode ser chamado de dolicocefalia ou escafocefalia. A fusão das suturas coronal ou lamdoide bilateral resulta em alargamento no diâmetro transversal da calota craniana, conhecido como braquicefalia. Todavia, quando a fusão é unilateral, ocorre assimetria do crânio, que pode ser chamado de plagiocefalia. O comprometimento de várias suturas leva a uma aparência de folha de trevo (Kabbani e Raghuvver, 2004; Tubbs *et al.*, 2012; Krakow, 2017).

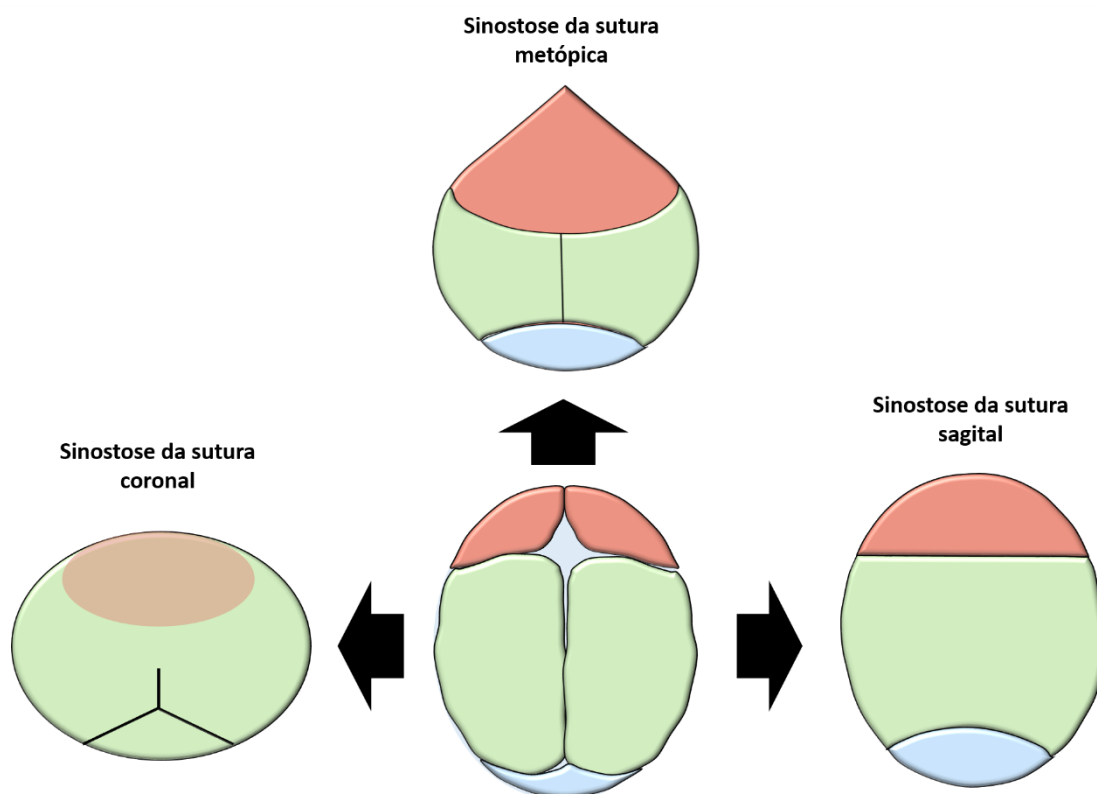


Figura 9. Desenho esquemático dos tipos de craniossinostose.

Essas alterações na conformação do crânio podem levar ao aumento da pressão intracraniana que, quando não tratada, pode resultar em lesão cerebral permanente (Thompson *et al.*, 1995a,1995b; Bristol *et al.*, 2004). Além disso, a craniossinostose também está associada a alterações no crescimento craniofacial, incluindo hipoplasia médio-facial, anormalidades dentárias, deformação orbital e outras características, como perda auditiva ou deficiência intelectual (Al-Rekabi *et al.*, 2017).

CAPÍTULO 2

O hipertireoidismo materno em ratas altera a composição e a expressão gênica da matriz produzida *in vitro* pelos condrócitos das epífises femorais da prole

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as culturas de condrócitos extraídos das epífises femorais da prole de ratos com restrição do crescimento ósseo endocondral causada pelo hipertireoidismo materno. Quatorze ratas Wistar adultas foram distribuídas em dois grupos, sendo um controle e o outro grupo tratado com a administração diária de L-tiroxina por sonda oro-gástrica (50 µg/animal/dia) durante a gestação e três dias de lactação. Três dias após o nascimento, a prole foi eutanasiada para a extração dos condrócitos. Aos 7, 14 e 21 dias, as culturas 2D de condrócitos foram submetidas aos ensaios de viabilidade pelo MTT e de fosfatase alcalina (FA) pelo BCIP/NBT. Os *pellets* de condrócitos cultivados em 3D foram processados pela técnica de inclusão em parafina. Secções foram coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para avaliar a morfologia e o percentual de áreas PAS+. A expressão dos transcritos gênicos para *Col2*, *ColX*, *agrecan*, *Sox9* e *Runx2* foi avaliada por RT-PCR em tempo real. As médias foram comparadas pelo teste t de Student. Não houve diferença significativa entre os grupos nos ensaios de MTT e FA. O hipertireoidismo materno não alterou a morfologia dos condrócitos, mas reduziu significativamente o percentual de áreas PAS+ e a expressão dos transcritos gênicos para *Col2* e *agrecan* e aumentou a expressão de *Sox9*. O hipertireoidismo materno altera a composição e a expressão gênica da matriz produzida *in vitro* pelos condrócitos das epífises femorais da prole, podendo ser esse um dos mecanismos pelos quais o excesso de hormônios tireoidianos maternos reduz o crescimento endocondral.

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos, representados pela triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), são essenciais para a reprodução, para o controle do metabolismo energético e para o desenvolvimento de diversos órgãos (Boelaert e Franklyn, 2005; Krassas *et al.*, 2010). Como a tireoide fetal não é funcionalmente madura até a 18^o a 20^o semanas de idade gestacional nos humanos e até o 17^o dia de gestação no rato, o feto é dependente da transferência placentária dos hormônios tireoidianos maternos (Greenberg *et al.*, 1970; Thorpe-Beeston *et al.*, 1991). Sendo assim, as disfunções da tireoide materna podem impactar de forma negativa a saúde do feto (Boelaert e Franklyn, 2005; Andersen e Andersen, 2021).

As disfunções tireoidianas podem ocorrer em qualquer fase da vida, inclusive durante a gestação. Apesar de menos prevalente que o hipotireoidismo, o hipertireoidismo materno vem sendo associado à uma variedade de efeitos adversos tanto para a mãe quanto para o feto, como aborto espontâneo, parto prematuro, natimortalidade, baixo peso ao nascimento e anormalidades do desenvolvimento cerebral e de outros órgãos fetais (Krassas *et al.*, 2010; Andersen e Andersen, 2021). No esqueleto, os hormônios tireoidianos são essenciais para a formação óssea, crescimento ósseo pós-natal, bem como para a manutenção da higidez da estrutura óssea de indivíduos adultos (Bassett e Williams, 2016; Williams e Bassett, 2018).

A maioria dos ossos, inclusive os ossos longos se forma por ossificação endocondral, na qual os precursores mesenquimais se diferenciam em condrócitos, que proliferam e secretam matriz extracelular (MEC) contendo colágeno tipo II (COL2) e proteoglicanos, formando um molde de cartilagem. Nesse molde, os condrócitos se proliferam, diferenciam-se em condrócitos hipertróficos e sofrem apoptose. Posteriormente, ocorre invasão vascular e migração de osteoblastos, formando o centro de ossificação primário. Mais tardiamente, formam-se os centros de ossificação secundários nas extremidades dos ossos longos (Bassett e Williams, 2018; Williams e Bassett, 2018). No rato, o centro de ossificação primário forma-se na vida intra-uterina, enquanto o centro de ossificação secundário forma-se na vida pós-natal, de forma que em neonatos toda a epífise dos ossos longos ainda é cartilaginosa (Kozhemyakina *et al.*, 2015).

A adição de diferentes concentrações dos hormônios tireoidianos em culturas de condrócitos demonstra que esses hormônios inibem a proliferação e induzem a diferenciação hipertrófica dos condrócitos, com expressão de colágeno tipo X (COL10) e metaloproteinase 13 (MMP13), comprovando o efeito direto e crítico dos hormônios tireoidianos na diferenciação terminal de condrócitos e na morfogênese da placa de crescimento (Bohme *et al.*, 1992; Alini *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2002). No entanto, o excesso de tiroxina materna reduz o crescimento ósseo da prole de ratos ao nascimento e ao desmame (Maia *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2018a). Estudos prévios *in vivo*, realizados por esta equipe, demonstraram que o excesso de tiroxina materna reduz o crescimento ósseo da prole, com redução significativa na taxa de proliferação de condrócitos na epífise cartilaginosa e aumento do número de condrócitos na zona hipertrófica da epífise cartilaginosa dos neonatos (Ribeiro *et al.*, 2018a). O excesso de tiroxina materna também alterou o perfil angiogênico, com redução significativa da expressão gênica e proteica de VEGF na epífise cartilaginosa dos neonatos (Ribeiro *et al.*, 2018b).

Embora haja pesquisas que demonstraram os efeitos da adição dos hormônios tireoidianos em culturas de condrócitos (Bohme *et al.*, 1992; Alini *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1998; Robson *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2002), esse parece ser o primeiro estudo que investigou as culturas de condrócitos extraídos das epífises femorais de ratos expostos ao hipertireoidismo materno. Os resultados obtidos aqui demonstram alguns dos mecanismos pelos quais o hipertireoidismo materno reduz o crescimento ósseo neonatal. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as culturas de condrócitos extraídos das epífises femorais da prole de ratas com restrição do crescimento ósseo endocondral causada pelo hipertireoidismo materno. Os condrócitos cultivados em sistema bidimensional (2D) foram submetidos aos ensaios de viabilidade celular pelo MTT e da atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT. Condrócitos cultivados em pellets (3D) foram avaliados quanto à morfologia e composição dos proteoglicanos, por meio da coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e quanto à expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Runx2*, colágeno tipo II (*Col2*), colágeno tipo X (*Col10*) e agrecan (*Acan*), pela PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo nº 216/2019.

Acasalamento e administração de tiroxina

Quatorze ratas Wistar com dois meses de idade, foram alojadas em caixas plásticas coletivas (4 ratas/caixa), recebendo ração comercial e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em ambiente controlado, sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e em temperatura de 18-22°C, durante todo o ensaio experimental. Após determinação da fase do ciclo estral por citologia vaginal, as ratas em proestro e estro foram alojadas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de três fêmeas para cada macho. O dia em que foi detectada a presença de espermatozoides na citologia vaginal, foi considerado dia 0 de gestação, e as ratas foram separadas em caixas individuais compondo o grupo tratado (n=7) e o grupo controle (n=7). As ratas tratadas receberam diariamente L-tiroxina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 5 mL de água destilada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Serakides *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2018a) por todo período da gestação e por três dias de lactação. As fêmeas do grupo controle receberam o mesmo volume de água destilada também por sonda oro-gástrica.

Três dias após o nascimento, foram selecionados aleatoriamente 4 neonatos de cada mãe. Os neonatos do grupo de mães com hipertireoidismo apresentaram redução significativa do comprimento do fêmur em comparação ao controle (dados não demonstrados). A eutanásia foi realizada por punção cardíaca precedida por anestesia com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) via intraperitoneal.

Dosagem plasmática materna de T4 livre

O estado funcional da tireoide das mães foi determinado por meio da análise plasmática de T4 livre. No terceiro dia de lactação, quando foi realizada a extração dos condrócitos dos neonatos, o sangue das mães foi colhido com anti-coagulante (heparina) e o plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C para a dosagem de T4 livre, a qual foi realizada usando a técnica de ELISA de quimiluminescência (sensibilidade: 0,4 ng/dL), com kits comerciais e de acordo com as instruções do fabricante (IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA).

Processamento e análise histomorfométrica da tireoide dos neonatos

As tireoides dos neonatos de ambos os grupos foram dissecadas, fixadas em formalina 10% e processadas de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 3µm foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para avaliação morfológica. A altura do epitélio foi mensurada em 20 folículos em quatro pontos equidistantes do folículo, obtendo-se o valor médio das quatro medidas. Esta mensuração foi realizada com auxílio do programa *Image J 1.52k* (*National Institute of Health, USA*).

Isolamento e cultivo de condrócitos dos neonatos

Após a eutanásia, foi realizada antissepsia da pele dos membros pélvicos e 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. A cartilagem foi colhida da extremidade proximal do fêmur. Para o isolamento dos condrócitos, os fragmentos de cartilagem foram lavados com PBS 0,15M e incubadas por 12 horas em uma solução contendo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* com baixa glicose (DMEM-Low glicose) (Gibco, Invitrogen, NY, USA), acrescida de 5% de soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen, NY, USA) e colagenase tipo I a 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após esse período, as suspensões de condrócitos foram centrifugadas a 1.400 RPM por 10 minutos, lavadas com PBS 0,15 M e novamente centrifugadas. As células foram ressuspensas e cultivadas em garrafas T75 com meio condrogênico, contendo DMEM baixa glicose acrescido de gentamicina (60 mg/L), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e anfotericina B (25 mg/L), 1% de soro fetal bovino, ácido ascórbico (50 µg/mL), dexametasona (10^{-7} M), 6,25 µg/mL de insulina, 6,25 µg/mL de transferrina, 1 mM de piruvato e 1,25 µg/mL de albumina sérica bovina, mantidas 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. As trocas de meio foram realizadas duas vezes na semana em dias pré-estabelecidos. Na segunda passagem, as células foram transferidas, de acordo com o tipo de ensaio, para placas de 24 poços (2×10^4 células/poço), onde foram cultivadas em sistema bidimensional (2D) ou para tubos cônicos de plástico de 15 mL (1×10^6 células/tubo), onde foram cultivados em *pellets* ou sistema tridimensional (3D), de acordo com cada ensaio. A unidade amostral foi composta pelo *pool* de células dos 4 neonatos de cada mãe, totalizando 7 repetições por grupo para cada um dos ensaios descritos a seguir.

Teste de viabilidade celular (conversão de MTT em cristais de Formazan)

Aos 7, 14 e 21 dias de cultivo, o meio de cultivo foi removido e os condrócitos dos dois grupos, sob cultura 2D em placas de 24 poços, foram submetidos ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]} em cristais formazan. Foram utilizados 210 µL de meio condrogênico com adição de 170 µL de MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (5mg/mL). As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂ e posteriormente os cristais de formazan foram observados ao microscópio óptico. Foram acrescentados 210 µL de SDS-10% HCL e incubadas por 12 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, foram transferidos 100 µL de cada poço para placas de 96 poços e realizada a leitura em leitor espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm.

Atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT

Aos 7, 14 e 21 dias de cultivo, o meio de cultivo foi removido e os condrócitos dos grupos, sob cultura 2D em placas de 24 poços, foram lavados por duas vezes com solução PBS 0,15M estéril. Foram acrescentados, em cada poço, 200 µL de solução de BCIP/NBT (1 mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4 mL de NBT {nitro-blue tetrazoliumchloride} e 3,3 mL de BCIP {5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidinesalt}). As placas foram incubadas por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foram acrescentados, em cada poço, 210 µL de solução de SDS 10% HCL e as placas foram incubadas por 12 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram transferidos 100 µL de cada poço para placas 96 poços e realizada a leitura em leitor espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm.

Análise do teor de glicosaminoglicanos

Aos 21 dias de cultivo, os *pellets* de condrócitos de todos os grupos sob cultura 3D foram lavados com PBS 0,15 M e fixados com paraformaldeído 4%. Posteriormente, os *pellets* foram processados para inclusão em parafina. Cinco secções seriadas de 3 micrômetros do *pellet* foram coradas pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para estudo dos glicosaminoglicanos da matriz. Foram determinadas a porcentagem de áreas PAS⁺ e PAS⁻. Cinco campos de cada lâmina foram fotografados em aumento de 40x, com o auxílio de uma câmera Leica ICC50 acoplada a um microscópio Leica DM500, totalizando 25 campos por repetição. As imagens foram analisadas pela contagem de pontos sobre áreas

PAS⁺ e sobre áreas PAS⁻, utilizando o software *Image J* (National Institute of Health). Posteriormente foi realizada a conversão do número de pontos para porcentagem.

Avaliação da expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR tempo real

Aos 21 dias de cultivo, foi realizada PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) nas culturas 3D de condrócitos. Foi realizada a avaliação quantitativa da expressão gênica de agrecan (*Acan*), colágeno tipo II (*Col2*), colágeno tipo X (*Col10*), *Runx2* e *Sox9*. 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, Carlsbad, CA, USA). O qRT-PCR foi realizado em um termociclador SmartCycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, EUA). A primeira etapa de amplificação de qRT-PCR foi iniciada com a transcrição reversa por 120 seg a 50°C, seguido por PCR com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 seg a 95°C e 30 seg a 60°C. Ao final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT. A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde os valores das amostras foram calculados em relação aos valores de *Gapdh* Ct. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de transcritos gênicos e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR Tempo Real

Gene	Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')	Nº acesso
<i>Gapdh</i>	forward: CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_002046
<i>Agrecan</i>	forward: CACACGCTACACACTGGACT reverse: TCACACTGGTGGGAAGCCATC	NM_022190.1
<i>Col2</i>	forward: GTTCACGTACACTGCCCTGA reverse: AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	NM_012929.1
<i>ColX</i>	forward: GAAACAGGTGTCTGACTTAC reverse: TACTTCCAGTGGAATAGAAG	XM_001053056.3
<i>Sox9</i>	forward: CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC reverse: GTTCTTCACCGACTTCCTCCG	NW_0473432
<i>Runx2</i>	forward: GCGTCAACACCATCATTCTG reverse: CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348

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 t de Student para

comparação das médias, admitindo-se taxa de erro de 5% utilizando o pacote computacional SigmaPlot.

RESULTADOS

Concentração plasmática materna de T4 livre

O hipertireoidismo foi confirmado pelos sinais clínicos de agitação e agressividade que as ratas tratadas apresentaram, bem como pela elevação significativa das concentrações plasmáticas de T4 livre, em comparação ao grupo controle (Fig. 10).

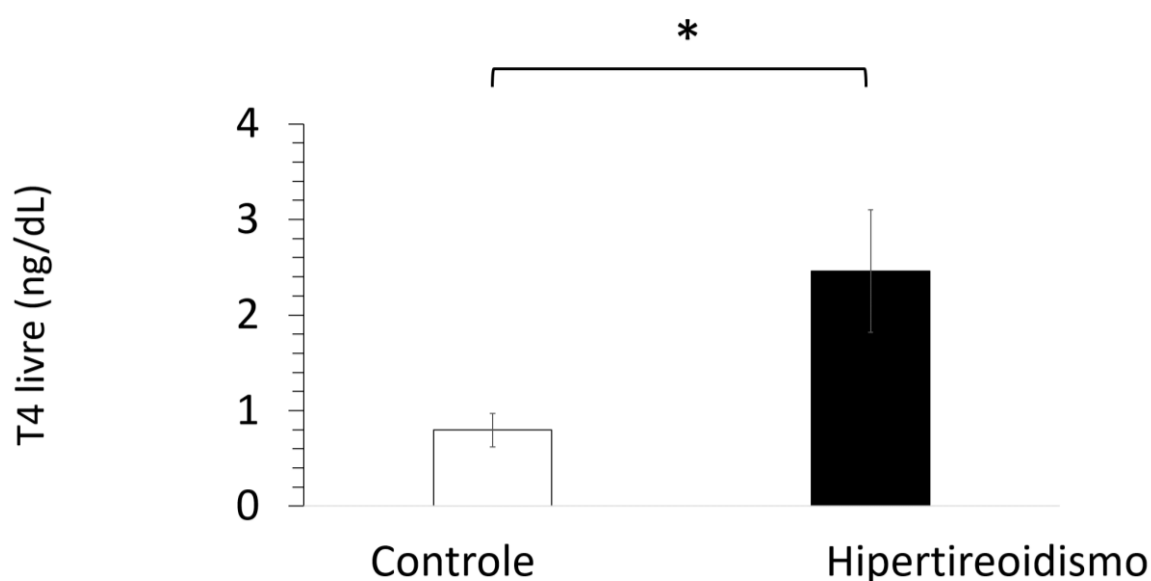


Figura 10. Concentrações plasmáticas de T4 livre (média \pm desvio padrão) das ratas mães dos grupos controle e com hipertireoidismo * $P < 0,05$ (teste t de Student).

Altura do epitélio folicular da tireoide dos neonatos

Os folículos da tireoide dos ratos neonatos do grupo controle eram revestidos por epitélio predominantemente cuboidal e preenchidos por coloide denso e por vezes vacuolizado, enquanto nos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno foram observados predomínio de folículos revestidos por epitélio achatado, com redução significativa da altura do epitélio folicular quando comparados com o grupo controle (Fig. 11), demonstrando o efeito de *feedback* negativo do excesso de tiroxina materna sobre a tireoide da prole.

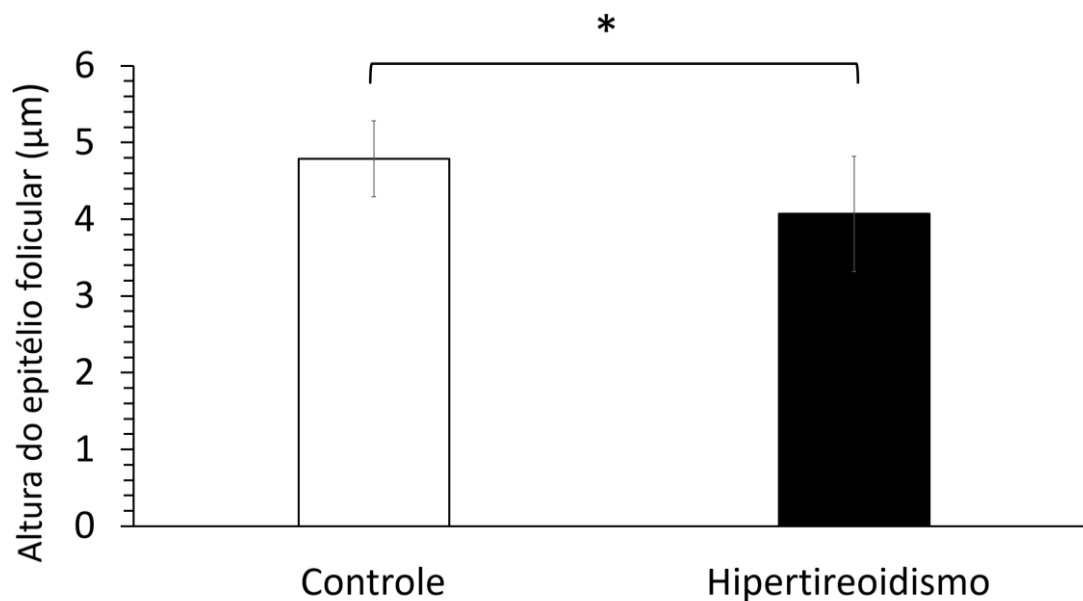


Figura 11. Altura do epitélio folicular (µm) da tireoide (média ± desvio padrão) dos ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno * P <0,05 (teste t de Student).

Viabilidade dos condrócitos (conversão de MTT em cristais de formazan)

Não houve diferença significativa entre as médias do grupo controle e do grupo exposto ao hipertireoidismo materno, em relação à viabilidade celular aos 7, 14 e 21 dias (Fig. 12).

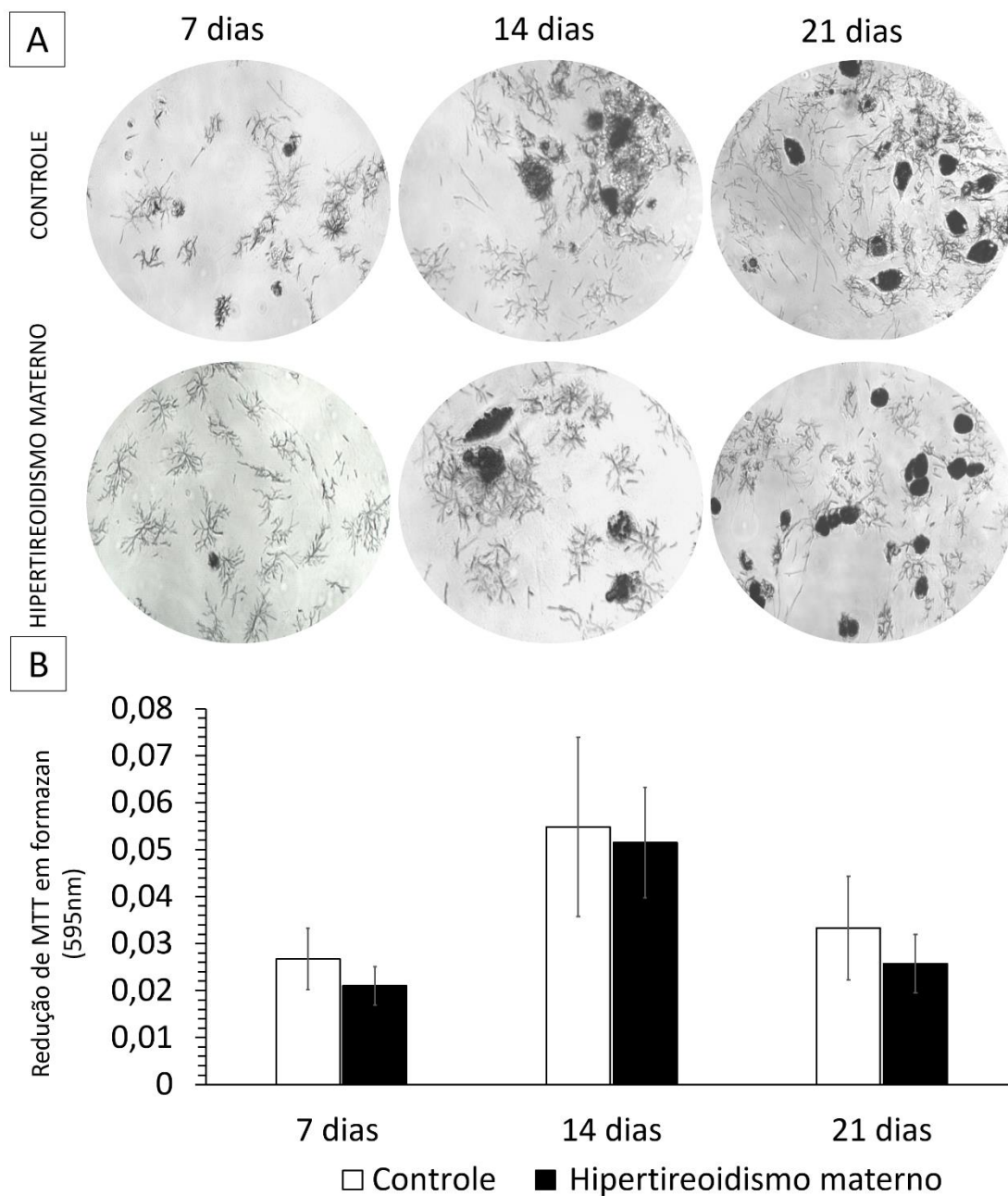


Figura 12: Conversão de MTT em cristais de formazan (média \pm desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

Atividade da fosfatase alcalina dos condrócitos

Não houve diferença significativa entre as médias do grupo controle e tratado, expostos ao hipertireoidismo materno, em relação a atividade de fosfatase alcalina aos 7, 14 e 21 dias (Fig. 13).

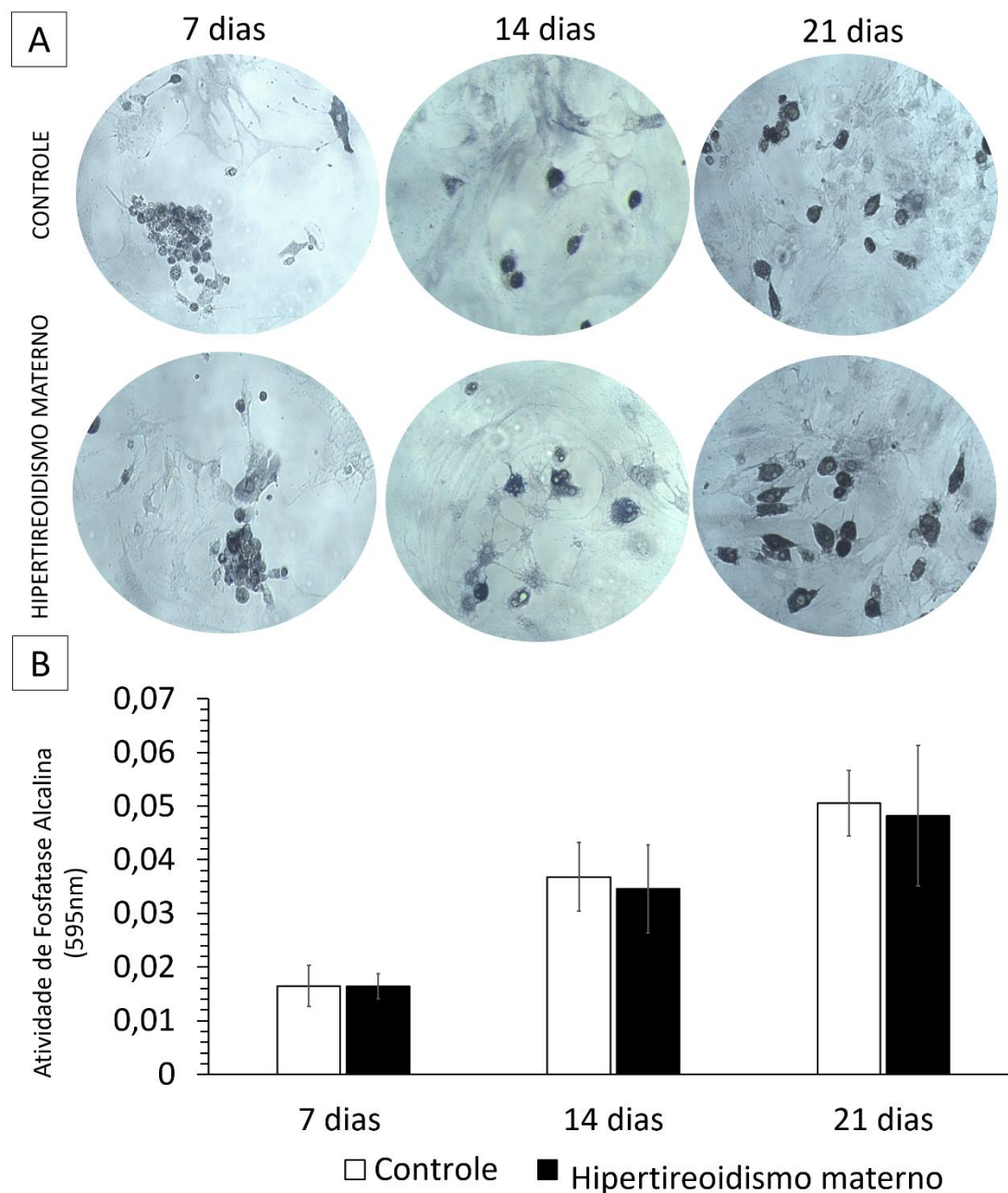


Figura 13. Atividade da fosfatase alcalina (média \pm desvio padrão) em culturas bidimensionais de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

Morfologia dos condrócitos e conteúdo de proteoglicanos da matriz

Em ambos os grupos foi possível observar os condrócitos localizados em lacunas de tamanhos variados, envoltos por matriz cartilaginosa semelhante ao tecido cartilaginoso das placas de crescimento *in vivo*, com áreas PAS^+ e PAS^- . A característica morfológica dos condrócitos com relação ao tamanho, citoplasma e núcleo foi semelhante entre os

grupos. No entanto, a cultura de condrócitos dos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno apresentou redução significativa do percentual das áreas PAS⁺ em comparação ao controle (Fig. 14).

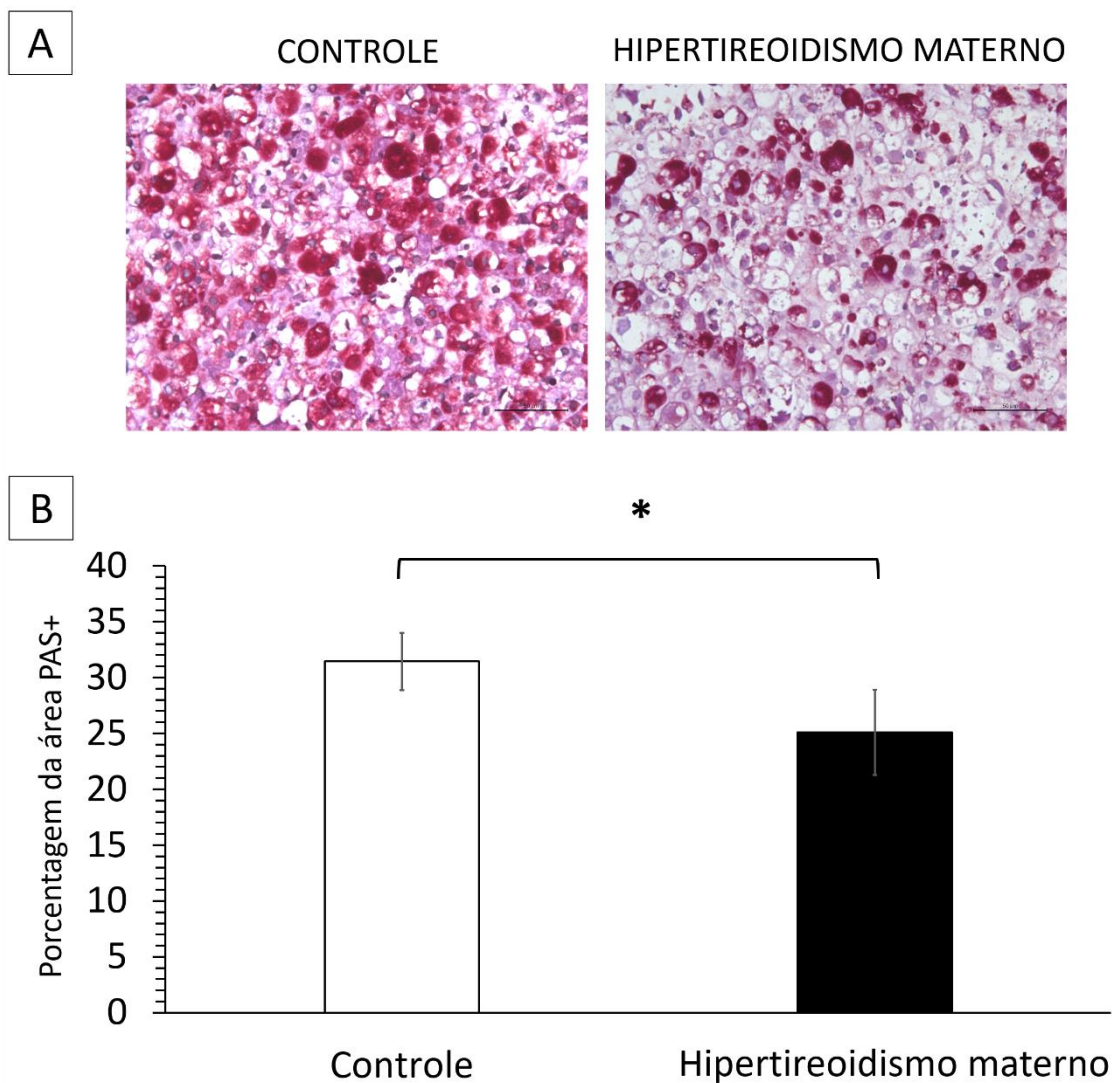


Figura 14. A) Fotomicrografias da cultura 3D de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno com redução das áreas PAS⁺ no grupo hipertireoidismo, aos 21 dias. Coloração ácido periódico-Schiff (PAS). (B) Porcentagem de áreas PAS⁺ em cultura 3D de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * P < 0,05 (teste t de Student).

Expressão de transcritos gênicos

Aos 21 dias, as culturas de condrócitos extraídos de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno apresentaram redução significativa da expressão dos transcritos gênicos para *Col2* e *Acan* e aumento da expressão do transcrito gênico para *Sox9*, quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre grupos quanto à expressão de *Col10* e *Runx2* (Fig. 15).

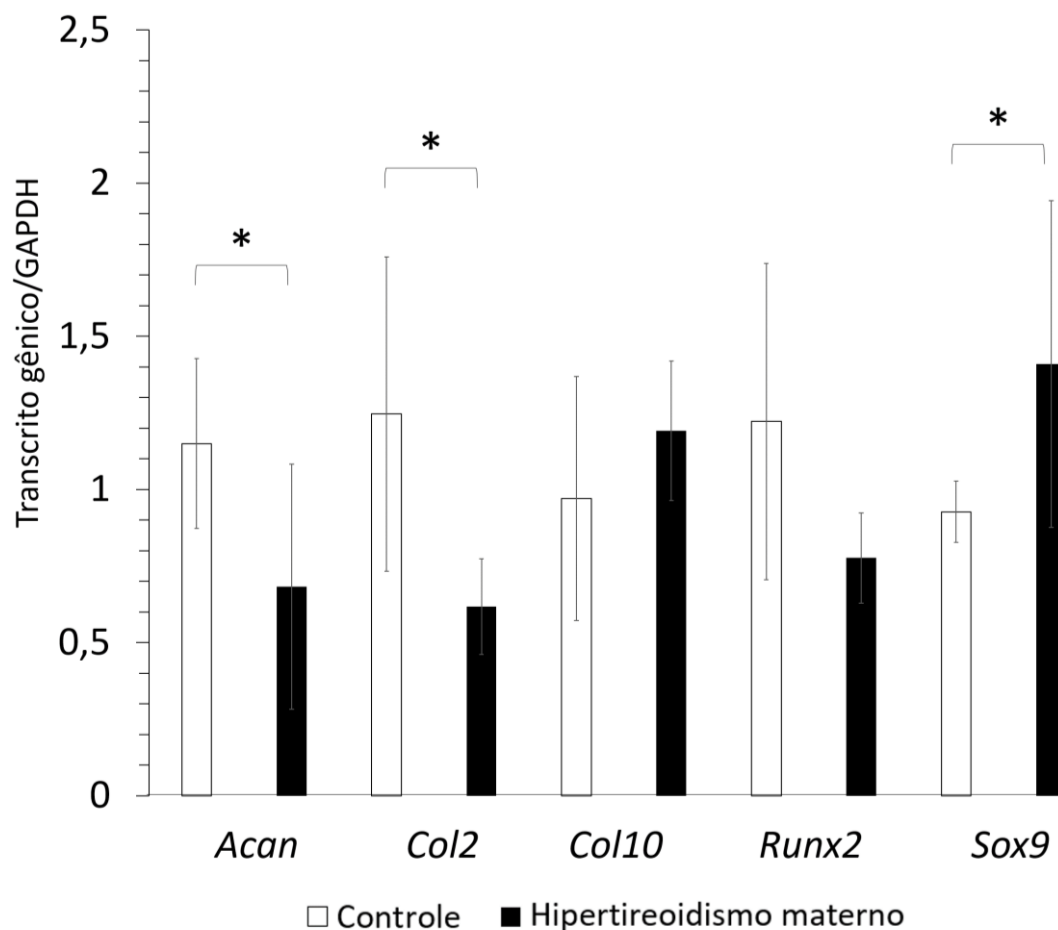


Figura 15. Expressão de transcritos gênicos (média \pm desvio padrão) de *Acan*, *Col2*, *Col10*, *Runx2* e *Sox9* pela RT-qPCR em cultura 3D de condrócitos extraídos da epífise femoral de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * $P < 0,05$ (teste *t* de Student).

DISCUSSÃO

O hipertireoidismo materno foi confirmado pelos sinais clínicos de agitação e agressividade que as ratas tratadas apresentaram, bem como pela elevação significativa

das concentrações plasmáticas de T4 livre, em comparação ao grupo controle. Estudos que utilizaram a mesma dose de tiroxina durante o período gestacional também conseguiram induzir satisfatoriamente o hipertireoidismo em ratos (Silva *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2018a, 2018b). O tamanho e o volume de sangue dos neonatos é muito pequeno, limitando a realização de dosagens hormonais sanguíneas. Por isso, a exemplo do que já havia sido realizado em outros estudos (Ribeiro 2018a, 2018b), realizou-se a análise da tireoide dos neonatos. A redução significativa da altura do epitélio folicular da tireoide dos ratos neonatos em comparação ao controle, demonstrou o efeito de *feedback* negativo do excesso de tiroxina materna sobre a tireoide da prole. A redução na altura do epitélio dos folículos tireoidianos de neonatos expostos ao hipertireoidismo materno também já foi descrita previamente (Ahmed *et al.*, 2010; Ribeiro 2018a, 2018b). Em condições normais, os hormônios tireoidianos maternos atravessam a placenta para a circulação fetal em quantidade suficiente para suprir as necessidades do feto. As desidases presentes na placenta metabolizam a T4 materna em T3 para ser usada pelo feto, e uma quantidade significativa de T4 também é transferida para o feto (Vulsma *et al.*, 1989; Chan e Kilby, 2000; Neale *et al.*, 2007). No entanto, o excesso de tiroxina materna é capaz de passar para o feto, reduzindo os níveis séricos de TSH por *feedback* negativo, e conseqüentemente reduzindo a altura do epitélio dos folículos tireoidianos, uma vez que a redução do TSH tem efeito trófico inibitório sobre a tireoide (Ahmed *et al.*, 2010).

No presente estudo, o hipertireoidismo materno alterou a composição e a expressão gênica da matriz produzida *in vitro* pelos condrócitos das epífises femorais da prole, uma vez que houve diminuição dos proteoglicanos da matriz evidenciada pela redução do percentual de áreas PAS⁺, bem como redução da expressão dos transcritos gênicos para *Col2* e *Acan* e aumento da expressão de *Sox9*.

A coloração PAS permite avaliar o conteúdo de proteoglicanos da cartilagem em culturas tridimensionais (Kiviranta *et al.*, 1985; Bassler *et al.*, 1986). A redução da porcentagem de áreas PAS⁺ na cultura de condrócitos dos ratos neonatos, em comparação ao controle, coincide com a redução da expressão de *Acan*, considerado o principal proteoglicano da MEC. Os hormônios tireoidianos são essenciais para a síntese e distribuição normal dos proteoglicanos da placa de crescimento (Shao *et al.*, 2006; Gouveia *et al.*, 2018). No hipotireoidismo, as placas de crescimento de roedores apresentam maior conteúdo aparente de sulfato de heparano pela coloração de *Alcian Blue* (Stevens *et al.*, 2000) e

maior expressão imunohistoquímica do sulfato de heparano (Bassett *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos *in vivo* realizados por nossa equipe demonstraram que o excesso de tiroxina materna reduziu a intensidade de coloração PAS na epífise cartilaginosa dos neonatos, mas não alterou significativamente a expressão do transcrito para *Agrecan* (Ribeiro, *et al.*, 2018a). Sendo assim, o presente estudo é complementar ao anteriormente publicado, pois permitiu avançar, demonstrando de forma quantitativa a redução da porcentagem de áreas PAS+ e a redução da expressão de *Agrecan* na cultura de condrócitos dos neonatos submetidos ao hipertireoidismo materno.

Os hormônios tireoidianos estimulam a expressão de enzimas que degradam a MEC, como a agrecanase-2 ou ADAMTS5 (*disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5*) e metaloproteinase de matriz-13 (MMP13). Assim, uma possível explicação para justificar a redução dos proteoglicanos observada neste estudo é pelo aumento da degradação dos componentes da MEC (Makihira *et al.*, 2003; Williams, 2013). Os proteoglicanos, assim como o *Col2*, são essenciais para a função normal da cartilagem, de forma que deficiências destes componentes da matriz diminuem a diferenciação condrogênica e reduzem o crescimento ósseo (Poole *et al.*, 2002; Roughley, 2006) à semelhança do que foi observado neste estudo.

Vários estudos *in vitro* demonstraram que os hormônios tireoidianos, em condições normais, induzem a diferenciação hipertrófica (Bohme *et al.*, 1992; Alini *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2002; Lakatos *et al.*, 2019). A expressão de RUNX2 e COL10 e a atividade da fosfatase alcalina são importantes marcadores da hipertrofia de condrócitos, de forma que condrócitos hipertróficos têm mais expressão desses fatores, em comparação aos condrócitos não hipertróficos (Burch e Lebovitz, 1982; Samsa *et al.*, 2017). No entanto, no presente estudo, os neonatos submetidos ao hipertireoidismo materno não apresentaram alteração da expressão desses marcadores, em comparação ao controle. Em contrapartida, Ribeiro *et al.* (2018a) observaram, *in vivo*, que ratos neonatos expostos ao excesso de tiroxina materna apresentaram aumento da espessura da zona hipertrófica da placa de crescimento. Uma vez que, no presente estudo, não foi observada diferença entre grupos, no que se refere às características genotípicas do condrócito hipertrófico, é provável que o hipertireoidismo materno não aumente a diferenciação de condrócitos hipertróficos, mas altere os eventos que causam sua morte durante o crescimento. Uma hipótese para tentar explicar o aumento da zona hipertrófica de neonatos causada pelo hipertireoidismo materno (Ribeiro *et al.*, 2018a) pode ser por

redução da apoptose de condrócitos hipertróficos e/ou por redução da invasão vascular da zona hipertrófica, uma vez que Ribeiro *et al.*, (2018b) também demonstrou redução da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e receptor tirosina quinase 2 (TIE2), fatores angiogênicos que promovem a invasão vascular e a redução da espessura da zona hipertrófica e consequentemente, estimulam o crescimento ósseo endocondral.

No presente estudo, as culturas de condrócitos das epífises femorais dos neonatos submetidos ao hipertireoidismo materno apresentaram aumento da expressão do *Sox9*. O SOX9 é um fator de transcrição que controla diferentes etapas da condrogênese, regulando uma série de outros fatores, incluindo a expressão de COL2 e ACAN (Song e Park, 2020). Sabendo disso, o esperado diante da redução da expressão de *Acan* e *Col2*, seria a redução também da expressão do *Sox9*. No entanto, há pesquisadores que já demonstraram ausência de correlação entre a expressão desses transcritos em condrócitos articulares normais e osteoartríticos (Aigner *et al.*, 2003; Zwickl *et al.*, 2016). Aigner *et al.* (Aigner *et al.*, 2003) avaliaram os níveis de expressão de mRNA do SOX9 na cartilagem articular normal e osteoartrítica em humanos e relataram que a expressão do COL2 e SOX9 não se correlacionou na cartilagem articular normal em adultos. Além disso, relataram uma diminuição da transcrição de SOX9 com aumento significativo da expressão de COL2 em condrócitos osteoartríticos. Esses resultados indicam que o SOX9 não é o principal fator de transcrição que regula a expressão de COL2. Da mesma forma, existem muitos mecanismos envolvidos na regulação de SOX9, incluindo modificações pós-transcricionais, pós-traducionais e a interação com outros transcritos gênicos, denominados parceiros funcionais (Lefebvre *et al.*, 2019).

A superexpressão de *Sox9* em condrócitos durante a embriogênese pode comprometer a diferenciação terminal dos condrócitos (Hattori *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011), com diminuição da expressão de *Vegf*. O VEGF é fundamental para a angiogênese, diferenciação dos condrócitos e consequentemente para o crescimento ósseo endocondral (Carlevaro *et al.*, 2000; Gerber e Ferrara, 2000; Zelzer *et al.*, 2002). Assim, o *Sox9*, por suprimir a expressão de *Vegf*, é um importante regulador negativo da vascularização da cartilagem e consequentemente do crescimento ósseo a partir das placas de crescimento (Hattori *et al.*, 2010). Conforme descrito anteriormente, Ribeiro *et al.* (2018b) demonstrou, no estudo *in vivo*, a redução da expressão gênica e proteica do VEGF na epífise cartilaginosa de neonatos que foram expostos ao excesso de tiroxina durante a gestação. Postula-se que o aumento da expressão de *Sox9* evidenciada nos condrócitos da

prole expostos ao hipertireoidismo materno possa ter relação com a redução do VEGF observada nas placas de crescimento (Ribeiro *et al.*, 2018b). Mas a relação entre o *Sox9* e o *Vegf* nas cartilagens de crescimento de animais submetidos ao hipertireoidismo materno merece ser melhor investigada.

Conclui-se que o hipertireoidismo materno altera a composição e a expressão gênica da matriz produzida *in vitro* pelos condrócitos das epífises femorais da prole, reduzindo o percentual de áreas PAS⁺ e a expressão dos transcritos gênicos para colágeno II e agrecan e aumentando a expressão de *Sox9*, podendo ser esse mais um dos mecanismos pelos quais o excesso de hormônios tireoidianos maternos reduz o crescimento endocondral.

CAPÍTULO 3

Patogênese dos efeitos do hipertireoidismo materno sobre o crescimento intramembranoso da prole de ratos: estudo in vitro com osteoblastos da calvaria

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características, bem como a atividade de síntese de osteoblastos extraídos da calvária da prole de ratos expostos ao hipertireoidismo materno. Doze ratas Wistar adultas foram distribuídas em dois grupos, sendo um controle e o outro grupo tratado com a administração diária de L-tiroxina por sonda oro-gástrica (50 µg/animal/dia) durante a gestação e três dias de lactação. Três dias após o parto e confirmação do hipertireoidismo das mães, a prole foi eutanasiada para a extração dos osteoblastos da calvaria. Aos 7, 14 e 21 dias, foram realizados os ensaios de proliferação pelo MTT e da atividade de fosfatase alcalina (FA) pelo BCIP/NBT. Aos 21 dias, a área total de matriz mineralizada corada pelo Von Kossa foi avaliada por morfometria. A expressão dos transcritos gênicos para *Runx2*, *Bmp2*, *Fgfr1*, *Coll*, osteocalcina (*Oc*) e osteopontina (*Op*) foi avaliada por RT-PCR em tempo real. As médias foram comparadas pelo teste t de Student. A atividade da fosfatase alcalina foi significativamente maior aos 14 e 21 dias nas culturas de osteoblastos extraídos dos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno, enquanto a conversão de MTT foi significativamente menor aos 21 dias neste grupo. As culturas de osteoblastos dos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno também apresentaram maior área total de matriz mineralizada e maior expressão dos transcritos gênicos para *Oc* e *Op*. O hipertireoidismo materno aumenta nos osteoblastos da prole, extraídos da calvaria, a atividade de síntese de matriz, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão dos transcritos gênicos para osteocalcina e osteopontina, podendo ser esse um dos mecanismos pelos quais há fusão prematura das suturas cranianas.

INTRODUÇÃO

As disfunções tireoidianas podem ocorrer em qualquer fase da vida, mas são comuns durante a gestação. O hipertireoidismo materno tem incidência estimada de 0,2%, podendo chegar até 2,5% quando são considerados os casos de hipertireoidismo materno subclínico (Taylor *et al.*, 2018). As duas principais causas de hipertireoidismo durante a gestação são a doença de Graves e a tireotoxicose transitória gestacional, resultante da elevação da hCG (Krassas *et al.*, 2010).

Em condições normais, os hormônios tireoidianos (HTs), representados pela triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), atravessam a placenta para a circulação fetal em quantidade suficiente para sustentar a função tireoidiana fetal, possuindo ação crítica em todos os sistemas, particularmente sobre a formação e o crescimento ósseo (Brent, 2000; Neale *et al.*, 2007; Bassett e Williams, 2016; Gouveia *et al.*, 2018). Todavia, o excesso de tiroxina decorrente da mãe durante a gestação e a lactação (hipertireoidismo materno) causa várias alterações ósseas em animais e crianças (Springer *et al.*, 2017; Williams e Bassett, 2018; Andersen e Andersen, 2021).

O excesso de tiroxina materna reduz o crescimento longitudinal de ossos longos, como o fêmur e o úmero de filhotes de ratos ao nascimento e ao desmame (Maia *et al.*, 2016). A redução do crescimento ósseo endocondral em ratos causada pelo hipertireoidismo materno está associada ao aumento da hipertrofia de condrócitos e à redução da expressão de fatores angiogênicos, como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), receptor do endotélio vascular-2 (FLK1) e receptor tirosina quinase 2 (TIE2) (Ribeiro *et al.*, 2018a, 2018b). A patogênese das alterações ósseas do crescimento endocondral, decorrentes do hipertireoidismo, tem sido mais estudada (Maia *et al.*, 2016; Durham *et al.*, 2017; Kesterke *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2018a, 2018b) quando comparada às alterações do crescimento intramembranoso (Cray *et al.*, 2013; Howie *et al.*, 2016).

A ossificação intramembranosa é responsável pela formação da calota craniana ou calvária, escápula, ílio e parte da clavícula (Leitch *et al.*, 2020). No entanto, as principais consequências do excesso de hormônios tireoidianos são observados no crânio (Carmichael *et al.*, 2015a, 2015b), sendo portanto o principal sítio estudado. O desenvolvimento craniofacial começa com aproximadamente quatro semanas de gestação em humanos, com a formação de distintas condensações do mesênquima (Leitch *et al.*, 2020). A condensação e a formação dos centros de ossificação intramembranosa ocorrem continuamente, formando ossos que são chamados de espículas ósseas, que por sua vez

irradiam progressivamente dos centros de ossificação primária em direção à periferia, levando à formação de osso trabecular imaturo, que é gradualmente substituído por osso cortical, no período do nascimento (Jin *et al.*, 2016). Após o nascimento, os ossos cranianos não se fundem imediatamente, permanecendo separados por suturas e fontanelas que permitem a expansão do crânio durante o crescimento (Opperman, 2000; Leitch *et al.*, 2020). Os mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento craniofacial e o crescimento pós-natal, a partir das suturas, dependem de várias vias de sinalização que ainda não foram totalmente elucidadas. Todavia, alguns dos principais fatores de transcrição já foram identificados (Marie, 2008; Leitch *et al.*, 2020).

O Runx2 é essencial para a diferenciação das células tronco mesenquimais (CTM) em osteoblastos, uma vez que a inativação do Runx2 inibe a diferenciação das CTM em osteoblastos, com completa ausência de diferenciação intramembranosa (Komori *et al.*, 1997; Komori, 2020). Além disso, o Runx2 é responsável por regular vários genes nos osteoblastos que desempenham papel importante na formação da matriz óssea, como sialoproteína óssea (SPO), osteoponina (OP), osteocalcina (OC) e colágeno tipo I (COL1) (Marie, 2008). A expressão e a atividade dos fatores de transcrição responsáveis pela formação óssea são regulados por hormônios e fatores de crescimento, representados pela proteína morfogenética óssea (BMP), pelo fator de crescimento fibroblástico (FGF) e pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (Marie, 2008).

Embora o efeito dos hormônios tireoidianos na ossificação intramembranosa ainda seja pouco estudado, há vários relatos de alterações ósseas principalmente de craniossinostose decorrente do hipertireoidismo materno (Riggs *et al.*, 1972; Penfold e Simpson, 1975; Kopelman, 1983; Lima *et al.*, 1999; Rasmussen *et al.*, 2007; Hashmi *et al.*, 2012) ou do hipertireoidismo adquirido durante o crescimento em animais (O'Shea *et al.*, 2003, 2005; Bassett *et al.*, 2007) e crianças (Robinson *et al.*, 1969; Johnsonbaugh *et al.*, 1978; Segni *et al.*, 1999). A craniossinostose é a fusão prematura de uma ou mais suturas cranianas antes da cessação do crescimento cerebral, o que pode acarretar deformidades faciais e lesões cerebrais pelo aumento da pressão intracraniana (Twigg e Wilkie, 2015). Filhotes de camundongos expostos ao hipertireoidismo materno apresentam alteração da morfologia craniofacial, com fusão prematura da sutura coronal e alargamento por crescimento compensatório da sutura sagital, com expressão elevada de marcadores da osteogênese, como o Runx2 e a fosfatase alcalina (Howie *et al.*, 2016). *In vitro*, a adição de tiroxina em culturas de osteoblastos extraídos da calvária de camundongos aumenta a

expressão de marcadores osteogênicos, como a fosfatase alcalina e a osteocalcina aos sete dias de cultura (Cray *et al.*, 2013).

Esse parece ser o primeiro estudo que investigou a atividade de síntese e o fenótipo de osteoblastos extraídos da calvária de ratos expostos ao hipertireoidismo materno. Nossa hipótese é que a craniossinostose decorrente do hipertireoidismo materno ocorra por aumento da atividade de síntese dos osteoblastos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as culturas de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno. Os osteoblastos foram submetidos ao teste de conversão de MTT em cristais formazan, atividade da fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT, área total de matriz mineralizada e expressão dos transcritos gênicos para *Runx2*, colágeno tipo I (*Col1*), *Bmp2*, *Fgfr1*, osteocalcina (*Oc*) e osteopontina (*Op*), pela RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o protocolo nº 156/2020.

Acasalamento e administração de tiroxina

Doze ratas Wistar adultas com dois meses de idade foram alojadas em uma densidade de quatro ratas por gaiola em um ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Após adaptação de uma semana, todas as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para determinar a fase do ciclo estral. As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 14 horas numa proporção de três fêmeas para cada macho. O dia em que foi detectada a presença de espermatozoides na citologia vaginal, foi considerado dia 0 de gestação, e as ratas foram separadas em caixas individuais compondo o grupo tratado (n=6) e o grupo controle (n=6). As ratas tratadas receberam a administração diária de L-tiroxina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 5 mL de água destilada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Serakides *et al.*, 2004; Ribeiro *et al* 2018a, 2018b) por todo período da gestação e por três dias de lactação. As fêmeas do grupo controle receberam o mesmo volume de água destilada, por sonda oro-gástrica, durante todo o período experimental.

Três dias após o nascimento, foram selecionados aleatoriamente 3 neonatos de cada mãe para obtenção dos osteoblastos. A eutanásia foi realizada por sobredose anestésica com

quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (30 mg/Kg) via intraperitoneal. A eutanásia das mães foi realizada por punção cardíaca precedida por anestesia com quetamina (40 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) via intraperitoneal.

Comprovação do hipertireoidismo materno e da influência dele sobre os neonatos

O estado funcional da tireoide das mães foi determinado por meio da análise plasmática de T4 livre. No terceiro dia de lactação, quando foi realizada a extração dos osteoblastos dos neonatos, o sangue das mães foi colhido com anti-coagulante (heparina) e o plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C para a dosagem de T4 livre, a qual foi realizada usando a técnica de ELISA de quimiluminescência (sensibilidade: 0,4 ng/dL) com kits comerciais e de acordo com as instruções do fabricante (IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA).

As tireoides dos neonatos de ambos os grupos foram dissecadas, fixadas em formalina 10% e processadas de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 3µm foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para avaliação morfológica. A altura do epitélio foi mensurada em 20 folículos em quatro pontos equidistantes do folículo, obtendo-se o valor médio das quatro medidas. Esta mensuração foi realizada com auxílio do programa *Image J 1.52k* (*National Institute of Health, USA*).

Isolamento e cultivo dos osteoblastos da calvária dos neonatos

O isolamento e cultivo dos osteoblastos foram realizados seguindo protocolo descrito previamente (Reis *et al.*, 2015). Após a eutanásia dos neonatos, foi realizada antisepsia da pele da cabeça com uma solução de iodo polvidona e álcool 70%. Foi realizada uma linha de incisão na pele da região cervical ao focinho, possibilitando a exposição da calvária que foi posteriormente retirada. A calvária foi retirada, dissecada e lavada com solução de fosfato tamponado (PBS) 0,15M estéril. Posteriormente, os fragmentos foram incubados com tripsina 0,5% (Gibco, Grand Island, NY, USA) por 15 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida a tripsina foi descartada e os fragmentos foram incubados com 0,2% de colagenase II (Sigma, St Louis, MO, USA) por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período o sobrenadante foi descartado e o tratamento com colagenase II foi repetido por duas vezes nas mesmas condições anteriores, sendo recolhido o sobrenadante e centrifugado por 5 minutos a 1400g. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspendido em garrafas T75 contendo DMEM baixa glicose (Gibco, Grand Island, NY, USA) acrescido de gentamicina (60 mg/L), penicilina (100UI/mL), estreptomicina

(100mg/mL), anfotericina B (25mg/L) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA). As trocas de meio foram realizadas duas vezes na semana em dias pré-estabelecidos.

Após a terceira passagem, os osteoblastos foram transferidos, de acordo com o tipo de ensaio, para placas de 24 poços (1×10^4 células/poço) ou garrafa T25 (25×10^4 células/poço) e o meio foi substituído por meio osteogênico, composto pelo meio de cultivo basal acrescido de ácido ascórbico (50 $\mu\text{g/mL}$), β glicerofosfato (10 mM), dexametasona (0,1 μM) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A unidade amostral foi composta pelo *pool* de células dos três neonatos de cada mãe, totalizando 6 repetições por grupo para cada um dos ensaios descritos a seguir.

Teste de Conversão de MTT em cristais de Formazan

Aos 7, 14 e 21 dias, as amostras de cada grupo foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]} em cristais formazan. O meio de cultivo foi removido e os osteoblastos foram lavados por duas vezes com solução PBS 0,15M estéril. Foram utilizados 210 μL de meio osteogênico com adição de 170 μL de MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (5mg/mL). As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂ e posteriormente os cristais de formazan foram observados ao microscópio óptico. Foram acrescentados 210 μL de SDS-10% HCL e incubadas por 12 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, foram transferidos 100 μL de cada poço para placas de 96 poços e realizada a leitura em leitor espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm.

Atividade da Fosfatase Alcalina pelo método BCIP/NBT

Aos 7, 14 e 21 dias, o meio de cultivo foi removido e os osteoblastos foram lavados por duas vezes com solução PBS 0,15M estéril. Foram acrescentados, em cada poço, 200 μL de solução de BCIP/NBT (1 mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4 mL de NBT (nitro-blue tetrazoliumchloride) e 3,3 mL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidinesalt)). As placas foram incubadas por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, foram acrescentados, em cada poço, 210 μL de solução de SDS 10% HCL e as placas foram incubadas, por 12 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram transferidos 100 μL de cada poço para placas 96 poços e realizada a leitura em leitor espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm.

Determinação da área total de matriz mineralizada

Aos 21 dias, os poços foram lavados duas vezes com solução de PBS 0,15M e em seguida as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 24 horas. Em seguida, foram lavados com água destilada e corados pela coloração de Von Kossa. Quarenta campos por repetição foram fotografados em aumento de 10× e as imagens foram analisadas no programa *ImageJ* versão 1.45s para mensuração da área total de matriz mineralizada.

Avaliação da expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR tempo real

Aos 21 dias de cultivo, foi realizada a avaliação quantitativa da expressão gênica de *Runx2*, *Bmp2*, *Fgfr1*, *Coll*, *Oc* e *Op*, pela RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). 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, Carlsbad, CA, USA). O qRT-PCR foi realizado em um termociclador SmartCycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, EUA). A primeira etapa de amplificação de qRT-PCR foi iniciada com a transcrição reversa por 120seg a 50°C, seguido por PCR com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15seg a 95°C e 30seg a 60°C. Ao final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT. 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).

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR Tempo Real

Gene	Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')	Nº acesso
<i>Gapdh</i>	<i>forward: CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA</i> <i>reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGA</i>	NM 002046
<i>Bmp2</i>	<i>Forward:AGTGACTTTTGGCCACGACG</i> <i>Reverse:GCTTCCGCTGTTTGTGTTG</i>	NM 006133
<i>Coll</i>	<i>Forward:ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC</i> <i>Reverse:CAGGGAAGCCTCTTTCTCCT</i>	NM 60440
<i>Oc</i>	<i>Forward:CATCTATGGCACCACCGTTT</i> <i>Reverse:AGAGAGAGGGAACAGGGAGG</i>	NM006028
<i>Op</i>	<i>Forward:ATCTACCATTCCGATGAATCT</i> <i>Reverse:TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA</i>	NM0069766
<i>Runx2</i>	<i>forward: GCGTCAACACCATCATCTG</i> <i>reverse: CAGACCAGCAGCACTCCATC</i>	NM_004348
<i>Fgfr1</i>	<i>Forward: CATCCCAGAGAAAATGGAG</i> <i>Reverse: TTGTCAGAAGGCACCACAGA</i>	NM_024146.1

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Os pressupostos estatísticos de normalidade e homocedasticidade de variâncias foram avaliadas pelos métodos de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Os dados que violaram algum desses pressupostos foram submetidos a transformação logarítmica. Os dados foram submetidos ao teste t de Student para comparação das médias, admitindo-se taxa de erro de 5% utilizando o pacote computacional SigmaPlot.

RESULTADOS

Comprovação do hipertireoidismo materno

O hipertireoidismo materno foi confirmado pela elevação significativa das concentrações plasmáticas de T4 livre no grupo tratado, em comparação ao grupo controle. Além disso, as ratas hipertireoideas exibiram sinais clínicos caracterizados por hiperatividade e agressividade.

Os folículos da tireoide dos ratos neonatos do grupo controle eram revestidos por epitélio predominantemente cuboidal e preenchidos por coloide denso e por vezes vacuolizado,

enquanto nos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno foi observado predomínio de folículos revestidos por epitélio achatado, com redução significativa da altura do epitélio folicular quando comparado ao grupo controle (Fig. 16).

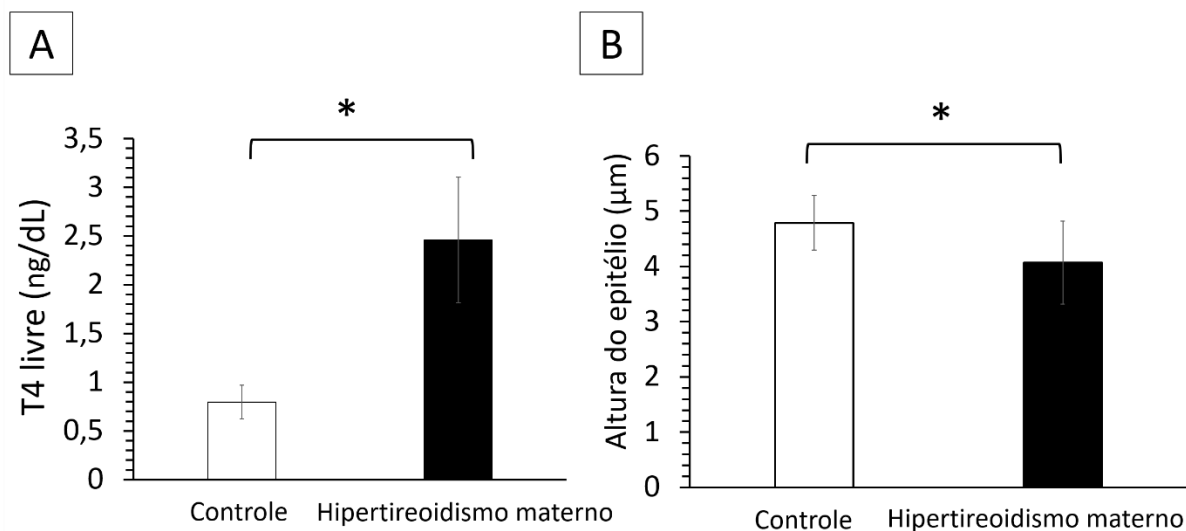


Figura 16. A) Concentrações plasmáticas de T4 livre (média \pm desvio padrão) das ratas mães dos grupos controle e com hipertireoidismo * $P < 0,05$ (teste t de *Student*). B) Altura do epitélio folicular (μm) da tireoide (média \pm desvio padrão) dos ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno * $P < 0,05$ (teste t de *Student*).

Conversão de MTT em cristais de formazan

Não houve diferença significativa entre as médias do grupo controle e do grupo exposto ao hipertireoidismo materno, em relação à viabilidade celular aos 7 e 14 dias. Aos 21 dias, os osteoblastos extraídos de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno apresentaram menor conversão de MTT em cristais formazan quando comparado ao grupo controle (Fig.17).

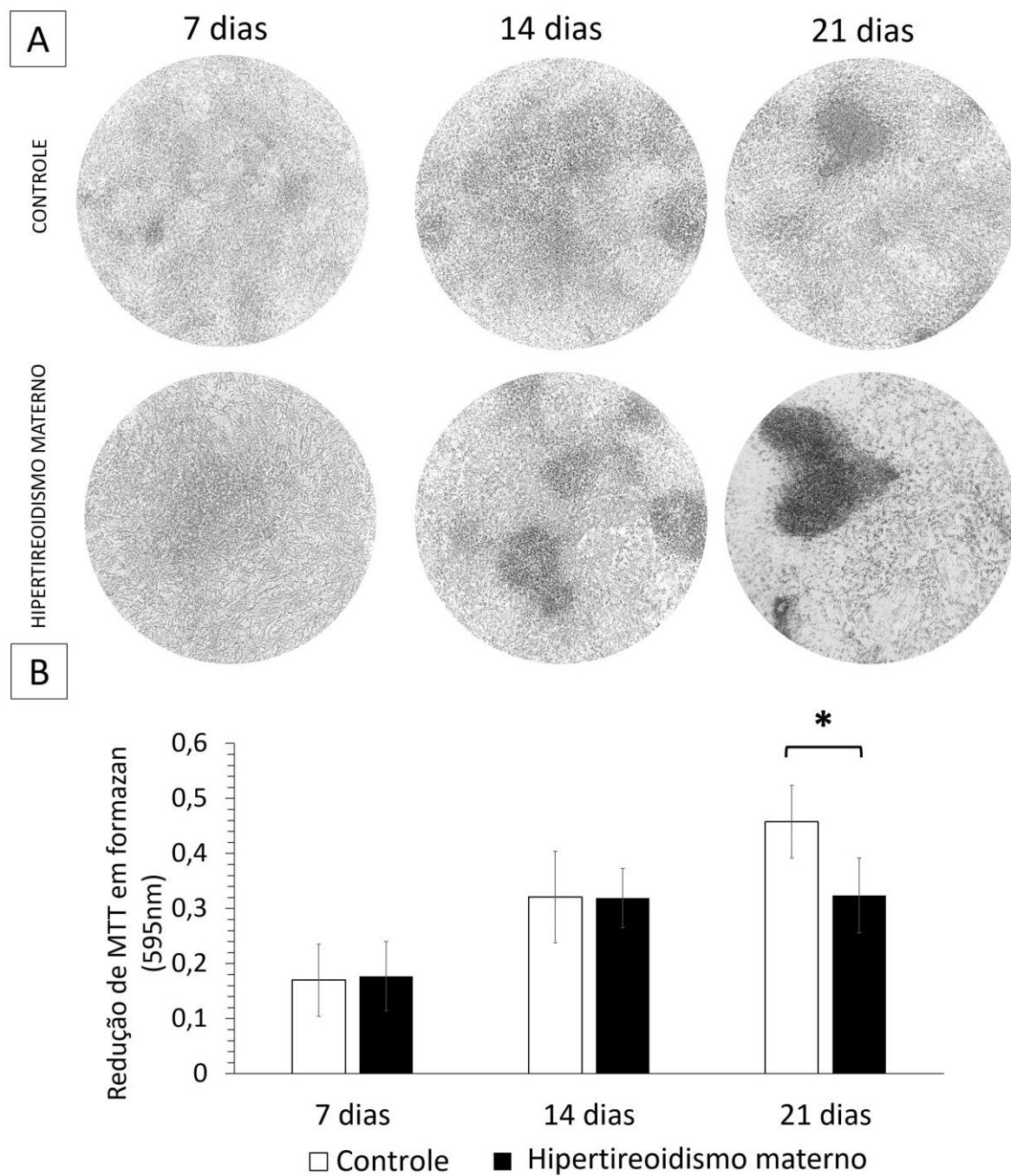


Figura 17. (A) Fotomicrografias da redução do MTT em cristais de formazan. (B) Conversão de MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas bidimensionais de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição o hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

Atividade da Fosfatase Alcalina pelo método BCIP/NBT

A atividade da fosfatase alcalina não diferiu significativamente entre grupos aos 7 dias. No entanto, aos 14 e 21 dias, os osteoblastos extraídos de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno apresentaram atividade de fosfatase alcalina significativamente maior quando comparados ao grupo controle (Fig. 18).

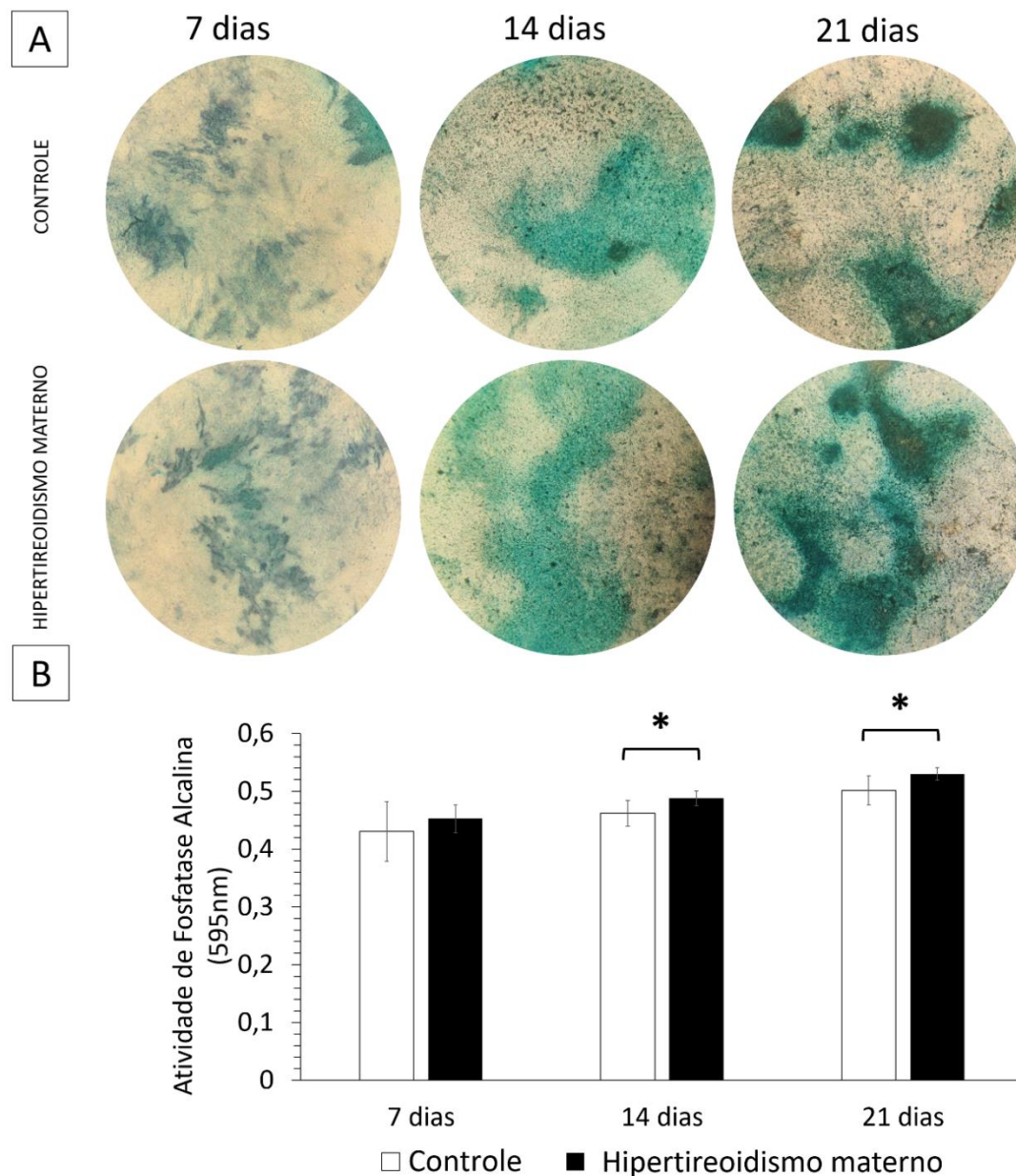


Figura 18. (A) Fotomicrografias da atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT. (B) Atividade da fosfatase alcalina (média \pm desvio padrão) em culturas bidimensionais de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno aos 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

Determinação da área total de matriz mineralizada

Aos 21 dias, as culturas de osteoblastos de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno apresentaram área total de matriz mineralizada significativamente maior quando comparada à do grupo controle (Figura 19).

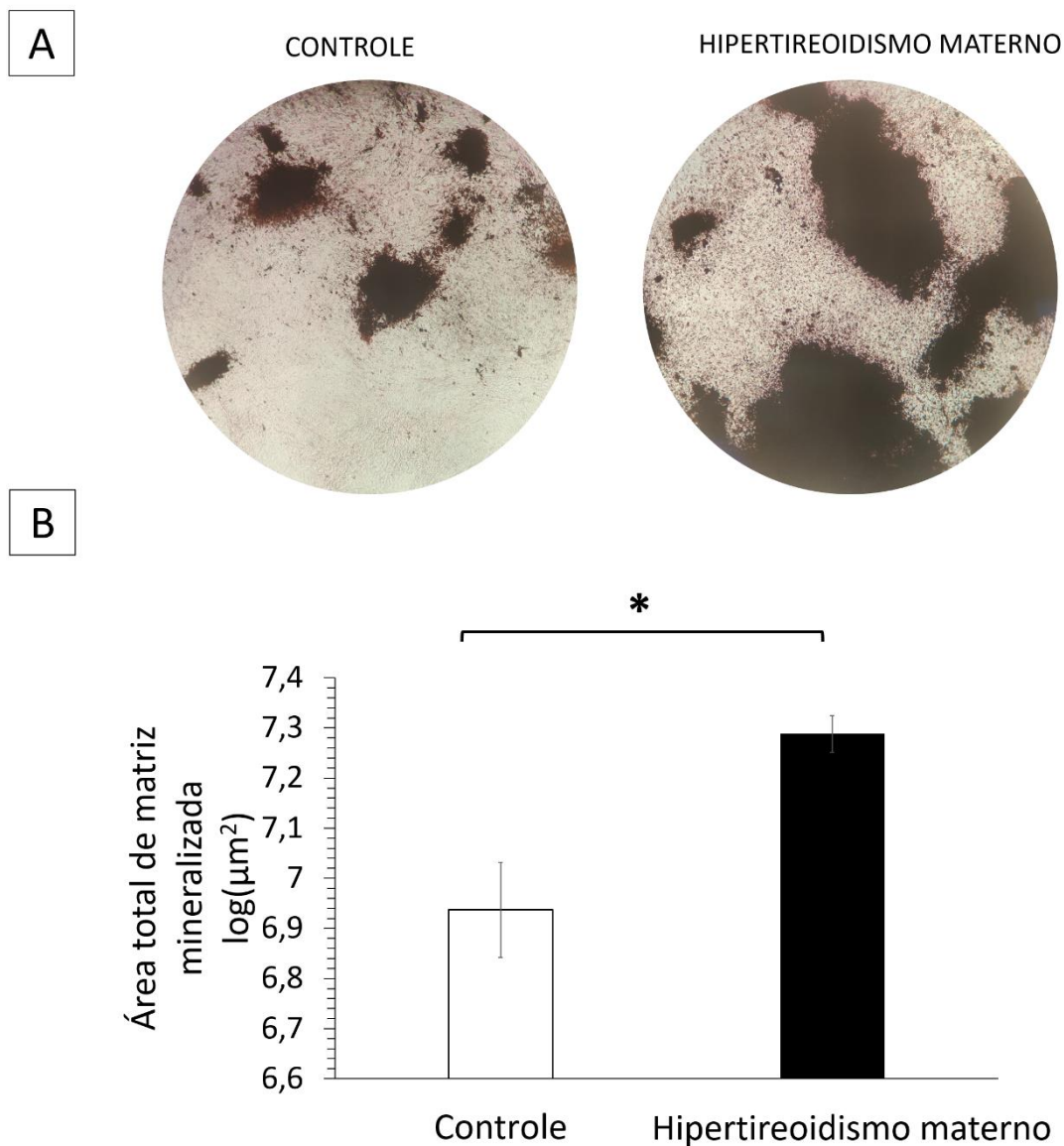


Figura 19. (A) Fotomicrografias da cultura de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno com aumento da área total de matriz mineralizada aos 21 dias. Coloração Von Kossa. (B) Área total de matriz mineralizada de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

Avaliação da expressão dos transcritos gênicos

Aos 21 dias, as culturas de osteoblastos extraídos de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno apresentaram aumento significativo da expressão dos transcritos gênicos para *Oc* e *Op* quando comparado ao controle. Não houve diferença significativa entre grupos quanto à expressão de *Runx2*, *Bmp2*, *Fgfr1* e *Col1* (Fig. 20).

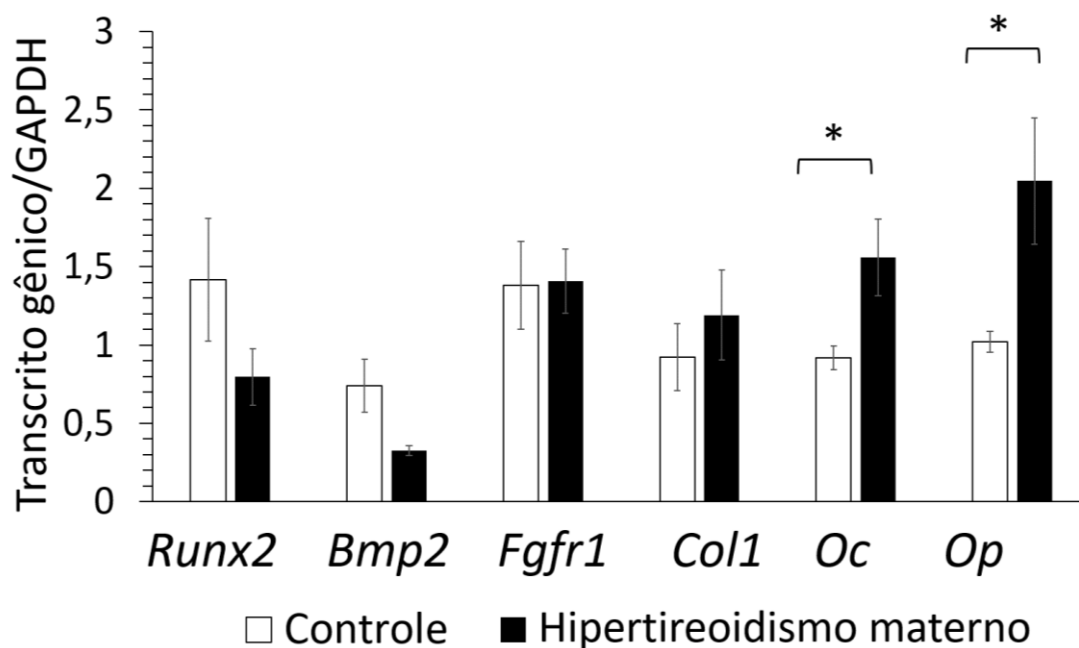


Figura 20. Expressão de transcritos gênicos (média \pm desvio padrão) de *Runx2*, *Bmp2*, *Fgfr1*, *Col1*, *Oc* e *Op* pela RT-qPCR em osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos controle e com exposição ao hipertireoidismo materno, aos 21 dias. * $P < 0,05$ (teste t de Student).

DISCUSSÃO

A administração de L-tiroxina via oral para ratas adultas durante o período de gestação induziu ao hipertireoidismo, conforme demonstrado pela elevação significativa de T4 livre. Este resultado coincide com outros estudos, que também obtiveram sucesso em induzir o hipertireoidismo durante a gestação (Silva *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2016; Ribeiro *et al.*, 2018a, 2018b). Os sinais clínicos também reforçaram a indução do hipertireoidismo, uma vez que a hiperatividade é uma manifestação clínica importante do

hipertireoidismo em humanos (Ahmed *et al.*, 2008), e a agressividade já foi relatada em ratas com hipertireoidismo induzido (Silva *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2018a, 2018b).

Sabe-se que o nível plasmático dos hormônios tireoidianos da mãe, durante a gestação e a lactação, afeta diretamente a tireoide da prole, uma vez que estes hormônios são capazes de atravessar a placenta atingindo a circulação fetal (Ahmed *et al.*, 2008). A elevação dos hormônios tireoidianos em ratas induzidas ao hipertireoidismo é acompanhada pela elevação dos hormônios tireoidianos da prole nas primeiras três semanas de nascimento (El-bakry *et al.*, 2010). Além disso, o hipertireoidismo materno também altera a arquitetura da tireoide da prole, diminuindo a altura do epitélio de revestimento e alterando o tamanho e número de folículos. Essas alterações ficam mais pronunciadas com o avanço da idade do dia 1 ao dia 21 pós-natal (Ahmed *et al.*, 2010). Dessa forma, a diminuição da altura do epitélio dos folículos tireoidianos nos neonatos aos 3 dias de idade confirma mais uma vez o hipertireoidismo materno e sua influência sobre a prole.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o hipertireoidismo materno aumenta a atividade de síntese de matriz pelos osteoblastos extraídos da calvaria da prole, uma vez que houve maior área total de matriz mineralizada, aumento da atividade da fosfatase alcalina e da expressão gênica de osteocalcina e osteopontina.

A fosfatase alcalina, um importante marcador da diferenciação osteogênica, é uma das primeiras enzimas expressas durante o processo da mineralização. Embora os mecanismos pelos quais essa enzima exerce suas funções não estejam bem estabelecidos, acredita-se que a fosfatase alcalina seja responsável por aumentar a concentração local de fosfato inorgânico, um promotor de mineralização, e diminuir a concentração de pirofosfato extracelular, um inibidor da mineralização (Golub e Boesze-Battaglia, 2007). Além de ser um importante marcador, Nakamura *et al.* (2020) demonstraram que a fosfatase alcalina também funciona como um regulador da diferenciação osteogênica, tanto pelo controle da concentração extracelular de fosfato inorgânico, quanto pela regulação da expressão de *Runx2*.

Nossos resultados demonstraram que a maior atividade da fosfatase alcalina e da expressão gênica de osteocalcina e osteopontina resultaram em maior área total de matriz mineralizada nas culturas de osteoblastos extraídos dos neonatos que foram expostos ao hipertireoidismo materno. Esses resultados corroboram com as alterações observadas *in vitro*, que demonstraram que a adição de hormônios tireoidianos aumenta a atividade de

síntese dos osteoblastos (Ohishi *et al.*, 1994; Varga *et al.*, 1997; Gouveia *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 2009). A expressão de proteínas não colagênicas, incluindo a osteocalcina e osteopontina são essenciais para a maturação e mineralização da matriz, que se caracteriza, *in vitro*, pela formação de nódulos mineralizados. A osteopontina é uma fosfoproteína importante, que possui domínios ligantes de cálcio, estando diretamente relacionada à mineralização da matriz. A osteocalcina, por sua vez, promove a mineralização da matriz óssea por meio da regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita, sendo considerada um importante marcador de osteoblastos bem diferenciados (Roach, 1994; Nefussi *et al.*, 1997). Dessa forma, o aumento da atividade de síntese dos osteoblastos pode ser um dos mecanismos responsáveis pela aceleração do crescimento intramembranoso, com desaparecimento precoce das suturas e fusão prematura dos ossos do crânio decorrente do hipertireoidismo materno.

A conversão de MTT em cristais formazan foi menor nos osteoblastos extraídos do grupo exposto ao hipertireoidismo materno aos 21 dias. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um ensaio colorimétrico amplamente utilizado para avaliação de estudos de proliferação, citotoxicidade e viabilidade celular, que se baseia na redução do MTT em cristais formazan por células metabolicamente ativas (Stockert *et al.*, 2012; Prábst *et al.*, 2017). Wang *et al.* (2004) demonstraram que os valores de MTT correspondem ao número de condrócitos. Da mesma forma, outros estudos utilizaram o MTT para avaliação da proliferação de osteoblastos (Xu *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Varga *et al.* (1997) demonstraram que a adição de T3 em osteoblastos *in vitro* diminui a proliferação e estimula a diferenciação osteoblástica, com aumento da expressão de genes como osteocalcina e fosfatase alcalina. Os autores sugerem que a diminuição da proliferação é consequência da diferenciação induzida por T3 nos osteoblastos. A proliferação dos osteoblastos tem uma relação inversamente proporcional com a diferenciação. O aumento da expressão gênica de fatores de transcrição associados a mineralização (FA, OC, OP) regula negativamente a proliferação (Stein *et al.*, 1990; Lian e Stein, 1992). Dessa forma, postula-se que a redução da conversão de MTT em cristais formazan no grupo exposto ao hipertireoidismo materno ocorreu pela diminuição da proliferação, associada ao aumento da diferenciação, comprovada pelo aumento da área total de matriz mineralizada e da expressão de osteocalcina e osteopontina.

Considerando que o RUNX2 é um fator de transcrição essencial para diferenciação osteogênica (Komori, 2020), o esperado seria o aumento também da expressão de *Runx2* no grupo exposto ao hipertireoidismo materno. Todavia, assim como em nosso estudo, a adição de tiroxina em cultura de osteoblastos da calvária de camundongos resultou em aumento da atividade da fosfatase alcalina e da expressão de osteocalcina sem aumento da expressão gênica de *Runx2*. Os pesquisadores sugeriram que seria necessário avaliar a expressão de *Runx2* em um período anterior ao momento em que foi detectada a elevação da fosfatase alcalina e da osteocalcina, para captar o aumento da expressão de *Runx2* (Cray *et al.*, 2013). RUNX2 é expresso em resposta à sinalização de BMP2, que também é um importante fator expresso durante a diferenciação osteogênica e a mineralização (Marie, 2008; Chen *et al.*, 2012), mas assim como o *Runx2* não houve diferença significativa entre os grupos aos 21 dias com relação à expressão de *Bmp2*.

Em nosso estudo não foi encontrada diferença significativa na expressão gênica de *Fgfr1* entre os osteoblastos extraídos dos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno quando comparados ao grupo controle. Em contraste, a adição de T3 em cultura de osteoblastos aumenta a expressão de *Fgfr1* e *Fgf2* e aprimora a ativação FGF/FGFR (Stevens *et al.*, 2003). Em condições normais, a sinalização FGF/FGFR induz a diferenciação e a atividade de osteoblastos e tem papel importante na regulação da ossificação intramembranosa no crânio, sendo sua alteração uma importante causa de craniossinostose (Ornitz e Marie, 2002; Rice *et al.*, 2003). Uma vez que a diferenciação osteogênica está bem estabelecida, *Fgfr1* é regulado negativamente (Iseki *et al.*, 1999). No entanto, seria interessante investigar a expressão do transcrito *Fgfr1* nas suturas dos neonatos filhos de mães com hipertireoidismo e até mesmo investigar a expressão da proteína e não somente do transcrito.

Conclui-se que o hipertireoidismo materno aumenta nos osteoblastos da prole, extraídos da calvaria, a atividade de síntese da matriz, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão dos transcritos gênicos para osteocalcina e osteopontina, podendo ser esse um dos mecanismos pelos quais há fusão prematura das suturas cranianas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, V. *et al.* (2002) 'The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis', *Endocrinology*, 143(5), pp. 1851–1857. doi: 10.1210/endo.143.5.8776.

Abu-Issa, R. *et al.* (2002) 'Fgf8 is required for pharyngeal arch and cardiovascular

development in the mouse', *Development*, 129(19), pp. 4613–4625.

Adams, S. L., Cohen, A. J. e Lassová, L. (2007) 'Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation', *Journal Cellular Physiology*, 213, pp. 635–641. doi: 10.1002/JCP.

Aghajanian, P. *et al.* (2017) 'Epiphyseal bone formation occurs via thyroid hormone regulation of chondrocyte to osteoblast transdifferentiation', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-11050-1.

Aghajanian, P. e Mohan, S. (2018) 'The art of building bone: Emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification', *Bone Research*, 6(19), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41413-018-0021-z.

Ahmed, M. e Janjua, Z. (2003) 'Effect of hypothyroidism and thyroxin replacement on growth of long bones in prenatally treated albino rats.', *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 53(1), pp. 18–21.

Ahmed, O. M. *et al.* (2008) 'Thyroid hormones states and brain development interactions', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 26(2), pp. 147–209. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.09.011.

Ahmed, O. M., Abd El-Tawab, S. M. e Ahmed, R. G. (2010) 'Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones-neurotransmitters and adenosinergic system interactions', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(6), pp. 437–454. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.06.007.

Ahmed, Y. A. *et al.* (2007) 'Physiological death of hypertrophic chondrocytes', *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(5), pp. 575–586. doi: 10.1016/j.joca.2006.10.016.

Aigner, T. *et al.* (2003) 'SOX9 expression does not correlate with type II collagen expression in adult articular chondrocytes', *Matrix Biology*, 22(4), pp. 363–372. doi: 10.1016/S0945-053X(03)00049-0.

Akiyama, H. *et al.* (2004) 'Interactions between Sox9 and B-catenin control chondrocyte differentiation', *Genes & Development*, 18, pp. 1072–1087. doi: 10.1101/gad.1171104.Wagner.

Al-Rekabi, Z., Cunningham, M. L. e Sniadecki, N. (2017) 'Cell Mechanics of

Craniosynostosis', *ACS Biomaterials Science Engineering*, 3(11), pp. 2733–2743. doi: 10.1038/s41395-018-0061-4.

Alini, M. *et al.* (1996) 'In serum-free culture thyroid hormones can induce full expression of chondrocyte hypertrophy leading to matrix calcification', *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(1), pp. 105–113. doi: 10.1002/jbmr.5650110115.

Allen, M. R. e Burr, D. B. (2019) 'Bone Growth, Modeling, and Remodeling', in *Basic and Applied Bone Biology*, pp. 85–100. doi: 10.1016/b978-0-12-813259-3.00005-1.

Andersen, S. L. *et al.* (2013) 'Low Birth Weight in Children Born to Mothers with Hyperthyroidism and High Birth Weight in Hypothyroidism, whereas Preterm Birth Is Common in Both Conditions: A Danish National Hospital Register Study', *European Thyroid Journal*, 2, pp. 135–144. doi: 10.1159/000350513.

Andersen, S. L. e Andersen, S. (2021) 'Hyperthyroidism in pregnancy: evidence and hypothesis in fetal programming and development', *Endocrine Connections*, Jan 1, p. EC-20-0518.R1.

Andrade, A. C. *et al.* (200AD) 'Wnt gene expression in the post-natal growth plate: regulation with chondrocyte differentiation', *Bone*, 40(5), pp. 1361–1369.

Asai, S. *et al.* (2009) 'Thyroid hormone non-genomically suppresses Src thereby stimulating osteocalcin expression in primary mouse calvarial osteoblasts', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(1), pp. 92–96. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.131.

Assis, H. A. *et al.* (2018) 'Dose-dependent effect of triiodothyronine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from the bone marrow of female rats', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(1), pp. 89–100. doi: 10.1111/jphp.12842.

Aubin, J. E. (2001) 'Regulation of osteoblast formation and function', *Endocrine and Metabolic Disorders*, 2, pp. 81–94.

Aubin, J. E. e Heersche, J. N. M. (2003) 'Bone Cell Biology Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts', in *Pediatric Bone: Biology & Diseases*. 1st edn. United States of America: Elsevier, pp. 43–75. doi: 10.1016/B978-012286551-0/50004-X.

Baek, J. E., Choi, J. Y. e Kim, J. E. (2014) 'Skeletal analysis and differential gene expression in Runx2/Osterix double heterozygous embryos', *Biochemical and*

Biophysical Research Communications, 451(3), pp. 442–448. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.010.

Bakos, B. *et al.* (2018) ‘Skeletal Effects of Thyroid Hormones’, *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 16(2), pp. 57–66. doi: 10.1007/s12018-018-9246-z.

Ballock, R. T. e O’Keefe, R. J. (2003) ‘The Biology of the Growth Plate’, *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 85(4), pp. 715–726. doi: 10.2106/00004623-200304000-00021.

Ballock, R. T. e Reddi, A. H. (1994) ‘Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium’, *Journal of Cell Biology*, 126(5), pp. 1311–1318. doi: 10.1083/jcb.126.5.1311.

Bártholo, B. B. G. R., Monteiro, D. L. M. e Trajano, A. J. B. (2014) ‘Hipertireoidismo na gestação’, *Revista HUPE*, 13(3), pp. 72–79. doi: 10.12957/rhupe.2014.12131.

Baskin, H. J. *et al.* (2002) ‘American association of clinical endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the evaluation and treatment of american association of clinical endocrinologists medical guidelines for clinical practice’, *Endocrine Practice*, 8(6), pp. 457–469.

Bassett, J. H. D. *et al.* (2006) ‘Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate’, *Endocrinology*, 147(1), pp. 295–305. doi: 10.1210/en.2005-0485.

Bassett, J. H. D. *et al.* (2007) ‘Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism’, *Molecular Endocrinology*, 21(5), pp. 1095–1107. doi: 10.1210/me.2007-0033.

Bassett, J. H. D. e Williams, G. R. (2003) ‘The molecular actions of thyroid hormone in bone’, *Endocrinology and Metabolism*, 14(8), pp. 356–364. doi: 10.1016/S1043-2760(03)00144-9.

Bassett, J. H. D. e Williams, G. R. (2016) ‘Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance’, *Endocrine Reviews*, 37(2), pp. 135–187.

Bassett, J. H. D. e Williams, G. R. (2018) *Thyroid Hormone in Bone and Joint Disorders*. 2nd edn, *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease*. 2nd edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-804182-6/00031-9.

Bassleer, C. *et al.* (1986) 'Human chondrocytes in tridimensional culture', *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 22(3), pp. 113–119. doi: 10.1007/BF02623497.

Beederman, M., Farina, E. M. e Reid, R. R. (2014) 'Molecular basis of cranial suture biology and disease: Osteoblastic and osteoclastic perspectives', *Genes and Diseases*, 1(1), pp. 120–125. doi: 10.1016/j.gendis.2014.07.004.

Bi, W. *et al.* (1999) 'Sox9 is required for cartilage formation', *Nature Genetics*, 22(1), pp. 85–89. doi: 10.1038/8792.

Birlik, M. *et al.* (2016) 'Effect of sex steroids on bone formation in an orthopedically expanded suture in rats', *Journal of Orofacial Orthopedics*, 77(2), pp. 94–103. doi: 10.1007/s00056-016-0021-9.

Boelaert, K. e Franklyn, J. A. (2005) 'Thyroid hormone in health and disease', *Journal of Endocrinology*, 187, pp. 1–15. doi: 10.1677/joe.1.06131.

Boeloni, J. N. *et al.* (2009) 'Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells', *Hormone Research*, 72(2), pp. 88–97. doi: 10.1159/000232161.

Bohme, K. *et al.* (1992) 'Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: The role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine', *Journal of Cell Biology*, 116(4), pp. 1035–1042. doi: 10.1083/jcb.116.4.1035.

Bonilla-Claudio, M. *et al.* (2012) 'Bmp signaling regulates a dose-dependent transcriptional program to control facial skeletal development', *Development*, 139(4), pp. 709–719. doi: 10.1242/dev.073197.

Brent, G. A. (2000) 'Tissue-Specific Actions of Thyroid Hormone: Insights from Animal Models', *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 1(1–2), pp. 27–33. doi: 10.1023/A:1010056202122.

Brenta, G. *et al.* (2013) 'Diretrizes clínicas práticas para o manejo do hipotireoidismo', *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, 57(4), pp. 265–299.

Bristol, R. E., Lekovic, G. P. e ReKate, H. L. (2004) 'The effects of craniosynostosis on the brain with respect to intracranial pressure', *Seminars in Pediatric Neurology*, 11(4), pp. 262–267. doi: 10.1016/j.spen.2004.11.001.

Brown, R. S. *et al.* (2000) 'Developmental regulation of thyrotropin receptor gene expression in the fetal and neonatal rat thyroid: Relation to thyroid morphology and to thyroid-specific gene expression', *Endocrinology*, 141(1), pp. 340–345. doi: 10.1210/endo.141.1.7258.

Brugmann, S. A. *et al.* (2007) 'Wnt signaling mediates regional specification in the vertebrate face', *Development*, 134(18), pp. 3283–3295. doi: 10.1242/dev.005132.

Burch, W. M. e Lebovitz, H. E. (1982) 'Triiodothyronine stimulates maturation of porcine growth-plate cartilage in vitro', *Journal of Clinical Investigation*, 70(3), pp. 496–504. doi: 10.1172/JCI110641.

Carballo, C. B. *et al.* (2017) 'Basic Science of Articular Cartilage', *Clinics in Sports Medicine*, 36(3), pp. 413–425. doi: 10.1016/j.csm.2017.02.001.

Carlevaro, M. F. *et al.* (2000) 'Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: Auto-paracrine role during endochondral bone formation', *Journal of Cell Science*, 113(1), pp. 59–69.

Carmichael, S. L. *et al.* (2015a) 'Craniosynostosis and Risk Factors Related to Thyroid Dysfunction', *American Journal of Medical Genetics A*, 0(4), pp. 701–707. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Carmichael, S. L., Clarke, C. M. e Cunningham, M. L. (2015b) 'Craniosynostosis: The Potential Contribution of Thyroid-Related Mechanisms', *Current Epidemiology Reports*, 2(1), pp. 1–7. doi: 10.1007/s40471-015-0036-6.

Carretero, A. *et al.* (2017) 'Osteology', *Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging*, pp. 7–53. doi: 10.1016/B978-0-12-812972-2.50002-7.

Chagin, A. S. e Newton, P. T. (2020) 'Postnatal skeletal growth is driven by the epiphyseal stem cell niche: potential implications to pediatrics', *Pediatric Research*, 87(6), pp. 986–990. doi: 10.1038/s41390-019-0722-z.

Chan, C. K. F. *et al.* (2015) 'Identification and specification of the mouse skeletal stem cell', *Cell*, 160(1–2), pp. 285–298. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.002.

Chan, C. K. F. *et al.* (2018) 'Identification of the Human Skeletal Stem Cell', *Cell*, 175(1), pp. 43-56.e21. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.029.

- Chan, S. e Kilby, M. D. (2000) 'Thyroid hormone and central nervous system development', *Journal of Endocrinology*, 165(1), pp. 1–8. doi: 10.1677/joe.0.1650001.
- Chawla, R. *et al.* (2015) 'Squamosal suture craniosynostosis due to hyperthyroidism caused by an activating thyrotropin receptor mutation (T632I)', *Thyroid*, 25(10), pp. 1167–1172. doi: 10.1089/thy.2014.0503.
- Chen, G., Deng, C. e Li, Y. P. (2012) 'TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation', *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), pp. 272–288. doi: 10.7150/ijbs.2929.
- Chen, M. *et al.* (2008) 'Inhibition of β -catenin signaling causes defects in postnatal cartilage development', *Journal of Cell Science*, 121(9), pp. 1455–1465. doi: 10.1242/jcs.020362.
- Chokdeemboon, C. *et al.* (2013) 'FGFR1 and FGFR2 mutations in pfeiffer syndrome', *Journal of Craniofacial Surgery*, 24(1), pp. 150–152. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182646454.
- Choksi, N. Y. *et al.* (2003) 'Role of Thyroid Hormones in Human and Laboratory Animal Reproductive Health', *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 68(6), pp. 479–491. doi: 10.1002/bdrb.10045.
- Cohen, M. M. (1991) 'Etiopathogenesis of craniosynostosis.', *Neurosurgery clinics of North America*, 2(3), pp. 507–513. doi: 10.1016/s1042-3680(18)30714-9.
- Cooper, K. L. *et al.* (2013) 'Multiple Phases of Chondrocyte Enlargement Underlie Differences in Skeletal Proportions', *Nature*, 495(7441), pp. 375–378. doi: 10.1038/nature11940.Multiple.
- Cray, J. J. *et al.* (2013) 'Effects of Thyroxine Exposure on Osteogenesis in Mouse Calvarial Pre-Osteoblasts', *PLoS ONE*, 8(7), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0069067.
- Croteau, W. *et al.* (1995) 'Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase', *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), pp. 16569–16575. doi: 10.1074/jbc.270.28.16569.
- Czekanska, E. M. *et al.* (2012) 'In search of an osteoblast cell model for in vitro research', *European Cells and Materials*, 24, pp. 1–17. doi: 10.22203/eCM.v024a01.

Dasgupta, K. e Jeong, J. (2019) 'Developmental biology of the meninges', *Genesis*, 57(5), pp. 1–12. doi: 10.1002/dvg.23288.

Datta, H. K. *et al.* (2008) 'The cell biology of bone metabolism', *Journal of Clinical Pathology*, 61(5), pp. 577–587. doi: 10.1136/jcp.2007.048868.

Day, T. F. *et al.* (2005) 'Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis', *Developmental Cell*, 8(5), pp. 739–750. doi: 10.1016/j.devcel.2005.03.016.

DeLise, A. M., Fischer, L. e Tuan, R. S. (2000) 'Cellular interactions and signaling in cartilage development', *Osteoarthritis and Cartilage*, 8(5), pp. 309–334. doi: 10.1053/joca.1999.0306.

Durham, E. *et al.* (2017) 'Thyroxine Exposure Effects on the Cranial Base', *Calcified Tissue International*, 101(3), pp. 300–311. doi: 10.1007/s00223-017-0278-z.

Eames, B. F. e Helms, J. A. (2004) 'Conserved molecular program regulating cranial and appendicular skeletogenesis', *Developmental Dynamics*, 231(1), pp. 4–13. doi: 10.1002/dvdy.20134.

El-bakry, A. M., El-Gareib, A. W. e Ahmed, R. G. (2010) 'Comparative study of the effects of experimentally induced hypothyroidism and hyperthyroidism in some brain regions in albino rats', *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(5), pp. 371–389. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.04.003.

Eng, L. e Lam, L. (2020) 'Thyroid function during the fetal and neonatal periods', *NeoReviews*, 21(1), pp. e30–e36. doi: 10.1542/neo.21-1-e30.

Ernst, M. e Froesch, E. R. (1987) 'Triiodothyronine stimulates proliferation of osteoblast-like cells in serum-free culture', *FEBS Letters*, 220(1), pp. 163–166. doi: 10.1016/0014-5793(87)80896-7.

Eurell, J. A. e Van Sickle, D. C. (2006) 'Connective and supportive tissues', *Textbook of Veterinary Histology*, 6, pp. 31–60.

Fakhry, M. (2013) 'Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts', *World Journal of Stem Cells*, 5(4), p. 136. doi: 10.4252/wjsc.v5.i4.136.

- Fan, X. *et al.* (2016) 'Tissue interactions, cell signaling and transcriptional control in the cranial mesoderm during craniofacial development', *AIMS Genetics*, 3(1), pp. 74–98. doi: 10.3934/genet.2016.1.74.
- Ferguson, J. e Atit, R. P. (2019) 'A tale of two cities: the genetic mechanisms governing calvarial bone development', *Genesis*, 57(1), p. e23248. doi: 10.1002/dvg.23248.A.
- Fernández-Pernas, P. *et al.* (2016) '3, 3', 5-triiodo-L-thyronine Increases In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells From Human Umbilical Cord Stroma Through SRC2', *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(9), pp. 2097–2108. doi: 10.1002/jcb.25515.
- Fisher, D. A. e Odell, W. D. (1969) 'Acute release of thyrotropin in the newborn.', *The Journal of clinical investigation*, 48(9), pp. 1670–1677. doi: 10.1172/JCI106132.
- Flaherty, K., Singh, N. e Richtsmeier, J. T. (2016) 'Understanding craniosynostosis as a growth disorder', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 5(4), pp. 429–459. doi: 10.1002/wdev.227.
- Flamant, F. *et al.* (2002) 'Congenital hypothyroid Pax8 $-/-$ mutant mice can be rescued by inactivating the TR α gene', *Molecular Endocrinology*, 16(1), pp. 24–32. doi: 10.1210/me.16.1.24.
- Forhead, A. J. e Fowden, A. L. (2014) 'Thyroid hormones in fetal growth and prepartum maturation', *Journal of Endocrinology*, 221(3). doi: 10.1530/JOE-14-0025.
- Fraichard, A. *et al.* (1997) 'The T3R α gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production', *EMBO Journal*, 16(14), pp. 4412–4420. doi: 10.1093/emboj/16.14.4412.
- Franz-Odendaal, T. A. (2011) 'Induction and patterning of intramembranous bone.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 17(1), pp. 3734–3746.
- Fratzl-Zelman, N. *et al.* (2003) 'The expression of matrix metalloproteinase-13 and osteocalcin in mouse osteoblasts is related to osteoblastic differentiation and is modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and thyroid hormones', *Cell Biology International*, 27(6), pp. 459–468. doi: 10.1016/S1065-6995(03)00037-4.
- Fujita, T. *et al.* (2004) 'Effects of sex hormone disturbances on craniofacial growth in newborn mice', *Journal of Dental Research*, 83(3), pp. 250–254. doi:

10.1177/154405910408300313.

Gao, B. e Yang, Y. (2013) ‘Planar cell polarity in vertebrate limb morphogenesis’, *Current Opinion in Genetics and Development*, 23(4), pp. 438–444. doi: 10.1016/j.gde.2013.05.003.

Ge, G. M. *et al.* (2020) ‘Maternal thyroid dysfunction during pregnancy and the risk of adverse outcomes in the offspring: a systematic review and meta-analysis Grace’, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(20), pp. 3821–3841.

Gerber, H. P. e Ferrara, N. (2000) ‘Angiogenesis and bone growth’, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 10(5), pp. 223–228. doi: 10.1016/S1050-1738(00)00074-8.

Gereben, B. *et al.* (2008) ‘Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(4), pp. 570–590. doi: 10.1007/s00018-007-7396-0.

Gil-Garay, R. *et al.* (1991) ‘Maternal hypothyroidism and fetal chondro-osseous development in rats’, *Biology of the Neonate*, 60, pp. 385–394. Available at: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>.

Goldring, M. B. (2006) ‘Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases’, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 20(5), pp. 1003–1025. doi: 10.1016/j.berh.2006.06.003.

Golub, E. E. e Boesze-Battaglia, K. (2007) ‘The role of alkaline phosphatase in mineralization’, *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), pp. 444–448. doi: 10.1097/BCO.0b013e3282630851.

Goodnough, L. H. *et al.* (2014) ‘Distinct Requirements for Cranial Ectoderm and Mesenchyme-Derived Wnts in Specification and Differentiation of Osteoblast and Dermal Progenitors’, *PLoS Genetics*, 10(2), pp. 12–14. doi: 10.1371/journal.pgen.1004152.

Gouveia, C. H. *et al.* (2001) ‘Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms’, *Journal of Endocrinology*, 170(3), pp. 667–675. doi: 10.1677/joe.0.1700667.

Gouveia, C. H. A. *et al.* (2018) ‘Thyroid hormone and skeletal development’, in *Vitamins and hormones*. Elsevier, pp. 383–472.

- Greenberg, A. H. *et al.* (1970) 'Observations on the maturation of thyroid function in early fetal life.', *The Journal of clinical investigation*, 49(10), pp. 1790–1803. doi: 10.1172/JCI106397.
- Griffin, J. N. *et al.* (2013) 'Fgf8 Dosage Determines Midfacial Integration and Polarity within the Nasal and Optic Capsules', *Developmental Biology*, 374(1), pp. 185–197. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.11.014.Fgf8.
- Grimsrud, C. D. *et al.* (2001) 'BMP signaling stimulates chondrocyte maturation and the expression of Indian hedgehog', *Journal of Orthopaedic Research*, 19(1), pp. 18–25. doi: 10.1016/S0736-0266(00)00017-6.
- Guerri, G. *et al.* (2019) 'Hypothyroidism and hyperthyroidism', *Acta Biomedica*, 90, pp. 83–86. doi: 10.23750/abm.v90i10-S.8765.
- Hajihosseini, M. K. (2008) 'Fibroblast Growth Factor Signaling in Cranial Suture Development and Pathogenesis', in *Craniofacial Sutures Development, Disease and Treatment*, pp. 160–177. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.003.
- Hall, B. K. e Miyake, T. (2000) 'All for one and one for all: Condensations and the initiation of skeletal development', *BioEssays*, 22(2), pp. 138–147. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4.
- Hallett, S. A., Ono, W. e Ono, N. (2019) 'Growth plate chondrocytes: Skeletal development, growth and beyond', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), pp. 1–17. doi: 10.3390/ijms20236009.
- Han, J. *et al.* (2007) 'Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development', *Mechanisms of Development*, 124(9–10), pp. 729–745. doi: 10.1016/j.mod.2007.06.006.
- Hashmi, S. S. *et al.* (2012) 'The association between neonatal thyroxine and craniosynostosis, Texas, 2004-2007', *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 94(12), pp. 1004–1009. doi: 10.1002/bdra.23077.
- Hata, K. *et al.* (2017) 'Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification', *Journal of Bone Metabolism*, 24(2), p. 75. doi: 10.11005/jbm.2017.24.2.75.
- Hattori, T. *et al.* (2010) 'SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification', *Development*, 137(6), pp. 901–

911. doi: 10.1242/dev.045203.

Hay, E. D. (2005) 'The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it', *Developmental Dynamics*, 233(3), pp. 706–720. doi: 10.1002/dvdy.20345.

Higashino, T. e Hirabayashi, S. (2013) 'A secondary craniosynostosis associated with juvenile hyperthyroidism', *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 66(10), pp. 284–286. doi: 10.1016/j.bjps.2013.04.030.

Hill, T. P. *et al.* (2005) 'Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes', *Developmental Cell*, 8(5), pp. 727–738. doi: 10.1016/j.devcel.2005.02.013.

Hirano, A., Akita, S. e Fuji, T. (1995) 'Craniofacial Deformities Associated with Juvenile Hyperthyroidism', *Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 32(4), pp. 328–333.

Howie, R. N. *et al.* (2016) 'Effects of In Utero thyroxine exposure on murine cranial suture growth', *PLoS ONE*, 11(12), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0167805.

Hüffmeier, U., Tietze, H. U. e Rauch, A. (2007) 'Severe skeletal dysplasia caused by undiagnosed hypothyroidism', *European Journal of Medical Genetics*, 50(3), pp. 209–215. doi: 10.1016/j.ejmg.2007.02.002.

Hunziker, E. B., Kapfinger, E. e Geiss, J. (2007) 'The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development', *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(4), pp. 403–413. doi: 10.1016/j.joca.2006.09.010.

Idris, I. *et al.* (2005) 'Maternal hypothyroidism in early and late gestation: Effects on neonatal and obstetric outcome', *Clinical Endocrinology*, 63(5), pp. 560–565. doi: 10.1111/j.1365-2265.2005.02382.x.

Di Ieva, A. *et al.* (2013) 'Cranial sutures: A multidisciplinary review', *Child's Nervous System*, 29(6), pp. 893–905. doi: 10.1007/s00381-013-2061-4.

Inada, M. *et al.* (2004) 'Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), pp. 17192–17197. doi: 10.1073/pnas.0407788101.

- Iseki, S., Wilkie, A. O. M. e Morriss-Kay, G. M. (1999) 'Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault', *Development*, 126(24), pp. 5611–5620. doi: 10.1242/dev.126.24.5611.
- Ishii, M. *et al.* (2003) 'Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault', *Development*, 130(24), pp. 6131–6142. doi: 10.1242/dev.00793.
- Ishii, M. *et al.* (2015) *The Development of the Calvarial Bones and Sutures and the Pathophysiology of Craniosynostosis*. 1st edn, *Current Topics in Developmental Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.004.
- Ishikawa, Y. *et al.* (1998) 'Thyroid hormone inhibits growth and stimulates terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes', *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(9), pp. 1398–1411. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.9.1398.
- Jackson, M. E., Sundquist, K. T. e Marks, S. C. (1996) 'Use of bone cell cultures to study skeletal pathology', *Microscopy Research and Technique*, 33(2), pp. 232–239. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19960201)33:2<232::AID-JEMT12>3.0.CO;2-V.
- James, A. W. *et al.* (2009) 'Estrogen/estrogen receptor alpha signaling in mouse posterofrontal cranial suture fusion', *PLoS ONE*, 4(9). doi: 10.1371/journal.pone.0007120.
- Jiang, X. *et al.* (2002) 'Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault', *Developmental Biology*, 241(1), pp. 106–116. doi: 10.1006/dbio.2001.0487.
- Jin, S. W., Sim, K. B. e Kim, S. D. (2016) 'Development and growth of the normal cranial vault: An embryologic review', *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 59(3), pp. 192–196. doi: 10.3340/jkns.2016.59.3.192.
- Johnsonbaugh, R. E. *et al.* (1978) 'Premature craniosynostosis: A common complication of juvenile thyrotoxicosis', *The Journal of Pediatrics*, 93(2), pp. 188–191. doi: 10.1016/S0022-3476(78)80493-4.
- Kabbani, H. e Raghuveer, T. S. (2004) 'Craniosynostosis', *American Family Physician*, 69(12), pp. 2863–2870. doi: 10.1097/01.ccn.0000457312.34253.a5.
- Karaplis, A. C. (2008) 'Embryonic Development of Bone and Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation', in *Principles of Bone Biology*, pp.

53–84. doi: 10.1016/B978-0-12-373884-4.00025-2.

Karsenty, G., Kronenberg, H. M. e Settembre, C. (2009) ‘Genetic control of bone formation’, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, pp. 629–648. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113308.

Karsenty, G. e Wagner, E. F. (2002) ‘Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development’, *Developmental Cell*, 2(4), pp. 389–406. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00157-0.

Kesterke, M. J. *et al.* (2018) ‘Maternal environment and craniofacial growth: geometric morphometric analysis of mandibular shape changes with in utero thyroxine overexposure in mice’, *Journal of Anatomy*, 233(1), pp. 46–54. doi: 10.1111/joa.12810.

Kim, H. J. *et al.* (2003) ‘The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp. 319–326. doi: 10.1074/jbc.M203750200.

Kim, Y. *et al.* (2011) ‘Generation of transgenic mice for conditional overexpression of Sox9’, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 29(1), pp. 123–129. doi: 10.1007/s00774-010-0206-z.

Kindblom, J. M. *et al.* (2001) ‘GH substitution reverses the growth phenotype but not the defective ossification in thyroid hormone receptor $\alpha 1$ -/ β -/- mice’, *Journal of Endocrinology*, 171(1), pp. 15–22. doi: 10.1677/joe.0.1710015.

Kiviranta, I. *et al.* (1985) ‘Demonstration of chondroitin sulphate and glycoproteins in articular cartilage matrix using periodic acid-Schiff (PAS) method’, *Histochemistry*, 83(3), pp. 303–306. doi: 10.1007/BF00684375.

Knecht, A. K. e Bronner-Fraser, M. (2002) ‘Induction of the neural crest: A multigene process’, *Nature Reviews Genetics*, 3(6), pp. 453–461. doi: 10.1038/nrg819.

Köhrle, J. (1999) ‘Local activation and inactivation of thyroid hormones: The deiodinase family’, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151(1–2), pp. 103–119. doi: 10.1016/S0303-7207(99)00040-4.

Komori, T. *et al.* (1997) ‘Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts’, *Cell*, 89, pp. 755–764. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Komori, T. (2006) 'Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors', *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(5), pp. 1233–1239. doi: 10.1002/jcb.20958.

Komori, T. (2010) 'Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2', *Cell and Tissue Research*, 339(1), pp. 189–195. doi: 10.1007/s00441-009-0832-8.

Komori, T. (2018) 'Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation', *Histochemistry and Cell Biology*, pp. 313–323. doi: 10.1007/s00418-018-1640-6.

Komori, T. (2020) 'Molecular Mechanism of Runx2-Dependent Bone Development', *Molecules and cells*, 43(2), pp. 168–175. doi: 10.14348/molcells.2019.0244.

Kong, L. *et al.* (2020) 'Isolation and Characterization of Human Suture Mesenchymal Stem Cells In Vitro', *International Journal of Stem Cells*, 13(3), pp. 377–385. doi: 10.15283/IJSC20024.

Kopelman, A. E. (1983) 'Delayed Cerebral Development in Twins With Congenital Hyperthyroidism', *American Journal of Diseases of Children*, 137(9), pp. 842–845. doi: 10.1001/archpedi.1983.02140350020006.

Kozhemyakina, E., Lassar, A. B. e Zelzer, E. (2015) 'A pathway to bone: Signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation', *Development (Cambridge)*, 142(5), pp. 817–831. doi: 10.1242/dev.105536.

Krakow, D. (2017) 'Craniosynostosis', in *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care, 2nd Edition*, pp. 301-304.e1. doi: 10.1016/B978-0-323-44548-1.00062-0.

Krassas, G. E., Poppe, K. e Glinoe, D. (2010) 'Thyroid Function and Human Reproductive Health', *Endocrine Reviews*, 31(5), pp. 702–755. doi: 10.1210/er.2009-0041.

Kronenberg, H. M. (2003) 'Developmental regulation of the growth plate', *Nature*, 423(332–336). Available at: www.nature.com/nature.

Lakatos, P. A. *et al.* (2019) 'Thyroid hormone and bone', in *Principles of Bone Biology*. Elsevier Inc., pp. 895–914. doi: 10.1016/B978-0-12-814841-9.00038-5.

de Lara, R. M. *et al.* (2020) 'The role of postnatal estrogen deficiency on cranium dimensions', *Clinical Oral Investigations*. doi: 10.1007/s00784-020-03655-0.

Lefebvre, V., Agelozzi, M. e Haseeb, A. (2019) 'SOX9 in cartilage development and disease', *Current Opinion in Cell Biology*, 61, pp. 39–47. doi: 10.1016/j.ceb.2019.07.008.SOX9.

Lefebvre, V. e Dvir-Ginzberg, M. (2017) 'SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage', *Connective Tissue Research*, 58(1), pp. 2–14. doi: 10.1002/cncr.27633.Percutaneous.

Leitch, V. D., Bassett, J. H. D. e Williams, G. R. (2020) 'Role of thyroid hormones in craniofacial development', *Nature Reviews Endocrinology*, 16(3), pp. 147–164. doi: 10.1038/s41574-019-0304-5.

Lenton, K. A. *et al.* (2005) 'Cranial Suture Biology', *Current Topics in Developmental Biology*, 66, pp. 287–328. doi: 10.1016/S0070-2153(05)66009-7.

Levine, J. P. *et al.* (1998) 'Studies in Cranial Suture Biology: Regional Dura Mater Determines Overlying Suture Biology', *Plastic and Reconstructive Surgery*, 101, pp. 1441–1447.

Li, Y. e Dudley, A. T. (2009) 'Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes', *Development*, 136(7), pp. 1083–1092. doi: 10.1242/dev.023820.

Lian, J. B. e Stein, G. S. (1992) 'Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation', *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 3(3), pp. 269–305. doi: 10.1177/10454411920030030501.

Lima, M. A. *et al.* (1999) 'Congenital hyperthyroidism: autopsy report', *Revista do Hospital das Clínicas*, 54(3), pp. 103–106. doi: 10.1590/s0041-87811999000300007.

Litsas, G. (2013) 'Growth hormone therapy and craniofacial bones: A comprehensive review', *Oral Diseases*, 19(6), pp. 559–567. doi: 10.1111/odi.12041.

Litsas, G. (2015) 'Growth Hormone and Craniofacial Tissues. An update', *The Open Dentistry Journal*, 9(1), pp. 1–8. doi: 10.2174/1874210601509010001.

Liu, C. F. *et al.* (2017) 'Transcriptional control of chondrocyte specification and

differentiation', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 62, pp. 34–49. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.10.004.

Liu, J. Q., Li, Q. W. e Tan, Z. (2019) 'New insights on properties and spatial distributions of skeletal stem cells', *Stem Cells International*, 2019. doi: 10.1155/2019/9026729.

Liu, M. *et al.* (2017) 'Osteoblasts proliferation and differentiation stimulating activities of the main components of *Epimedii folium*', *Pharmacognosy Magazine*, 13(49), pp. 90–94. doi: 10.4103/0973-1296.197654.

Liu, X. *et al.* (2016) 'Effects of nano tantalum implants on inducing osteoblast proliferation and differentiation', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(6), pp. 3541–3544. doi: 10.3892/etm.2016.3801.

Liu, Y. *et al.* (2018) 'The association between maternal subclinical hypothyroidism and growth, development, and childhood intelligence: A meta-analysis', *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 10(2), pp. 153–161. doi: 10.4274/jcrpe.4931.

Loevy, H. T., Aduss, H. e Rosenthal, I. M. (1987) 'Tooth eruption and craniofacial development in congenital hypothyroidism: report of case.', *Journal of the American Dental Association (1939)*, 115(3), pp. 429–431. doi: 10.14219/jada.archive.1987.0254.

Long, F. *et al.* (2001) 'Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation', *Development*, 128(24), pp. 5099–5108.

Long, F. (2012) 'Building strong bones: Molecular regulation of the osteoblast lineage', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(1), pp. 27–38. doi: 10.1038/nrm3254.

Long, F. e Ornitz, D. M. (2013) 'Development of the endochondral skeleton', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), pp. 1–20. doi: 10.1101/cshperspect.a008334.

Mackie, E. J. (2003) 'Osteoblasts: Novel roles in orchestration of skeletal architecture', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(9), pp. 1301–1305. doi: 10.1016/S1357-2725(03)00107-9.

Mackie, E. J. *et al.* (2008) 'Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(1), pp. 46–62. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.009.

- Mackie, E. J., Tatarczuch, L. e Mirams, M. (2011) 'The skeleton: A multi-functional complex organ. The growth plate chondrocyte and endochondral ossification', *Journal of Endocrinology*, 211(2), pp. 109–121. doi: 10.1530/JOE-11-0048.
- Maeda, Y. *et al.* (2007) 'Indian Hedgehog produced by postnatal chondrocytes is essential for maintaining a growth plate and trabecular bone', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), pp. 6382–6387. doi: 10.1073/pnas.0608449104.
- Maes, C. e Kronenberg, H. M. (2012) 'Postnatal Bone Growth: Growth Plate Biology, Bone Formation, and Remodeling', in *Pediatric Bone*. Second Edi. Elsevier Inc., pp. 55–82. doi: 10.1016/B978-0-12-382040-2.10004-8.
- Maia, M. Z. *et al.* (2016) 'Effects of excess maternal thyroxin on the bones of rat offspring from birth to the post-weaning period', *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 60(2), pp. 130–137. doi: 10.1590/2359-3997000000168.
- Makihira, S. *et al.* (2003) 'Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage', *Endocrinology*, 144(6), pp. 2480–2488. doi: 10.1210/en.2002-220746.
- Marie, P. J. (2008) 'Transcription factors controlling osteoblastogenesis', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), pp. 98–105. doi: 10.1016/j.abb.2008.02.030.
- Matsushita, Y., Ono, W. e Ono, N. (2020) 'Growth plate skeletal stem cells and their transition from cartilage to bone', *Bone*, 136(March), p. 115359. doi: 10.1016/j.bone.2020.115359.
- McCarthy, P. H. e Wood, A. K. (1988) 'Anatomic and radiologic observations of the clavicle of adult dogs.', *American journal of veterinary research*, 49(6), pp. 956–959.
- Mendoza, A. e Hollenberg, A. N. (2017) 'New insights into thyroid hormone action', *Pharmacology and Therapeutics*, 173, pp. 135–145. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.012.
- Merrill, A. E. *et al.* (2006) 'Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis', *Human Molecular Genetics*, 15(8), pp. 1319–1328. doi: 10.1093/hmg/ddl052.
- Milošević, I. *et al.* (2018) 'Effect of subclinical and overt form of rat maternal

hypothyroidism on offspring endochondral bone formation', *Acta Veterinaria*, 68(3), pp. 301–320. doi: 10.2478/acve-2018-0026.

Minina, E. *et al.* (2002) 'Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation', *Developmental Cell*, 3(3), pp. 439–449. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00261-7.

Miura, M. *et al.* (2002) 'Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate', *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(3), pp. 443–454. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.3.443.

Mizuhashi, K. *et al.* (2018) 'Resting zone of the growth plate harbors a unique class of skeletal stem cells', *Nature*, 563(7730), pp. 254–258. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Mizuhashi, K. *et al.* (2019) 'Growth Plate Borderline Chondrocytes Behave as Transient Mesenchymal Precursor Cells', *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(8), pp. 1387–1392. doi: 10.1002/jbmr.3719.

Mizuta, H. *et al.* (1983) 'Thyroid hormones in human milk and their influence on thyroid function of breast-fed babies', *Pediatric Research*, 17(6), pp. 468–471. doi: 10.1203/00006450-198306000-00008.

Morriss-Kay, G. M. e Wilkie, A. O. M. (2005) 'Growth of the normal skull vault and its alteration in craniosynostosis: Insights from human genetics and experimental studies', *Journal of Anatomy*, 207(5), pp. 637–653. doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00475.x.

Muenke, M. *et al.* (1994) 'A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome', *Nature Genetics*, 8(3), pp. 269–274. doi: 10.1038/ng1194-269.

Nakagawa, M. *et al.* (2000) 'Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts', *FEBS Letters*, 473(2), pp. 161–164. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01520-9.

Nakamura, H. *et al.* (1996) 'Urinary excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline measured by immunoassay in hypothyroidism', *Clinical Endocrinology*, 44(4), pp. 447–451. doi: 10.1046/j.1365-2265.1996.691513.x.

- Nakamura, T. *et al.* (2020) 'Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 524(3), pp. 702–709. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.136.
- Neale, D. M., Cootauco, A. C. e Burrow, G. (2007) 'Thyroid Disease in Pregnancy', *Clinics in Perinatology*, 34(4), pp. 543–557. doi: 10.1016/j.clp.2007.10.003.
- Nefussi, J. R. *et al.* (1997) 'Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45(4), pp. 493–503. doi: 10.1177/002215549704500402.
- Newton, P. T. *et al.* (2019) 'A radical switch in clonality reveals a stem cell niche in the epiphyseal growth plate', *Nature*, 567(7747), pp. 234–238. doi: 10.1038/s41586-019-0989-6.
- Nilsson, O. *et al.* (2005) 'Endocrine regulation of the growth plate', *Hormone Research*, 64(4), pp. 157–165. doi: 10.1159/000088791.
- Nishio, Y. *et al.* (2006) 'Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene', *Gene*, 372(1–2), pp. 62–70. doi: 10.1016/j.gene.2005.12.022.
- O'Shea, P. J. *et al.* (2003) 'A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone', *Molecular Endocrinology*, 17(7), pp. 1410–1424. doi: 10.1210/me.2002-0296.
- O'Shea, P. J. *et al.* (2005) 'Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormone receptor $\alpha 1$ or β ', *Molecular Endocrinology*, 19(12), pp. 3045–3059. doi: 10.1210/me.2005-0224.
- Oberkotter, L. V (1986) 'Thyroid Hormones in Milk', in Hamosh, M. e Goldman, A. S. (eds) *Human Lactation 2: Maternal and Environmental Factors*. Boston, MA: Springer US, pp. 195–204. doi: 10.1007/978-1-4615-7207-7_17.
- Ohba, S. (2016) 'Hedgehog signaling in endochondral ossification', *Journal of Developmental Biology*, 4(2). doi: 10.3390/jdb4020020.
- Ohishi, K. *et al.* (1994) 'Thyroid hormone suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells to osteoblasts, but enhances functional activities of mature osteoblasts in cultured rat calvaria cells', *Journal of Cellular Physiology*, 161(3), pp. 544–

552. doi: 10.1002/jcp.1041610318.

Ohrling, H. *et al.* (2014) 'Decreased birth weight, length, and head circumference in children born by women years after treatment for hyperthyroidism', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(9), pp. 3217–3223. doi: 10.1210/jc.2014-1168.

Okubo, Y. e Reddi, A. H. (2003) 'Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(1), pp. 186–190. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00912-4.

Olsen, B. R., Reginato, A. M. e Wang, W. (2000) 'BONE DEVELOPMENT', *Cell and Developmental Biology*, 16, pp. 191–220. doi: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.191.

Omoteyama, K. e Takagi, M. (2009) 'FGF8 regulates myogenesis and induces Runx2 expression and osteoblast differentiation in cultured cells', *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(4), pp. 546–552. doi: 10.1002/jcb.22012.

Ono, N., Balani, D. H. e Kronenberg, H. M. (2019) 'Stem and progenitor cells in skeletal development', in *Current Topics in Developmental Biology*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 1–24. doi: 10.1016/bs.ctdb.2019.01.006.

Ono, N. e Kronenberg, H. M. (2018) *Developmental biology of musculoskeletal tissues for tissue engineers, Developmental Biology and Musculoskeletal Tissue Engineering: Principles and Applications*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-811467-4.00001-2.

Opperman, L. A. *et al.* (1993) 'Tissue interactions with underlying dura mater inhibit osseous obliteration of developing cranial sutures', *Developmental Dynamics*, 198(4), pp. 312–322. doi: 10.1002/aja.1001980408.

Opperman, L. A. (2000) 'Cranial sutures as intramembranous bone growth sites', *Developmental Dynamics*, 219(4), pp. 472–485. doi: 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1073>3.0.CO;2-F.

Opperman, L. A. *et al.* (2002) 'Transforming growth factor- β 3 (Tgf- β 3) down-regulates Tgf- β receptor type I (T β r-I) during rescue of cranial sutures from osseous obliteration', *Orthodontics and Craniofacial Research*, 5(1), pp. 5–16. doi: 10.1034/j.1600-0544.2002.01179.x.

Opperman, L. A., Adab, K. e Gakunga, P. T. (2000) 'Transforming growth factor- β 2 and TGF- β 3 regulate fetal rat cranial suture morphogenesis by regulating rates of cell

proliferation and apoptosis', *Developmental Dynamics*, 219(2), pp. 237–247. doi: 10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1044>3.0.CO;2-F.

Opperman, L. A., Nolen, A. A. e Ogle, R. O. Y. C. (1997) 'Expression During Cranial Suture Formation and Obliteration In Vivo and In Vitro *', *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(3).

Ornitz, D. M. (2005) 'FGF signaling in the developing endochondral skeleton', *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(2 SPEC. ISS.), pp. 205–213. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.02.003.

Ornitz, D. M. e Itoh, N. (2015) 'The fibroblast growth factor signaling pathway', *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), pp. 215–266. doi: 10.1002/wdev.176.

Ornitz, D. M. e Marie, P. J. (2002) 'FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease', *Genes and Development*, 16(12), pp. 1446–1465. doi: 10.1101/gad.990702.

Ornitz, D. M. e Marie, P. J. (2015) 'Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease', *Genes and Development*, 29(14), pp. 1463–1486. doi: 10.1101/gad.266551.115.

Penfold, J. L. e Simpson, D. A. (1975) 'Premature craniosynostosis-a complication of thyroid replacement therapy', *The Journal of Pediatrics*, 86(3), pp. 360–363. doi: 10.1016/S0022-3476(75)80963-2.

Pezzuti, I. L., De Lima, P. P. e Dias, V. M. A. (2009) 'Hipotireoidismo congênito: Perfil clínico dos recém-nascidos identificados pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais', *Jornal de Pediatria*, 85(1), pp. 72–79. doi: 10.2223/JPED.1863.

Poole, A. R. *et al.* (2002) 'Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61(SUPPL. 2), pp. 78–81. doi: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii78.

Präbst, K. *et al.* (2017) 'Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin', *Methods in Molecular Biology*, 1601, pp. 1–17. doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1.

Provot, S. *et al.* (2008) 'Development of the skeleton', in *Osteoporosis*, pp. 242–269. doi:

10.1007/978-3-642-76533-9_27.

Purushothaman, R. *et al.* (2011) 'Facial suture synostosis of newborn Fgfr1P250R/+ and Fgfr2S252W/+ mouse models of Pfeiffer and Apert syndromes', *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 91(7), pp. 603–609. doi: 10.1002/bdra.20811.

Qin, X. *et al.* (2019) 'Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells', *Human Molecular Genetics*, 28(6), pp. 896–911. doi: 10.1093/hmg/ddy386.

Ralston, S. H. (2017) 'Bone structure and metabolism', *Medicine (United Kingdom)*, 45(9), pp. 560–564. doi: 10.1016/j.mpmed.2017.06.008.

Rasmussen, S. A. *et al.* (2007) 'Maternal Thyroid Disease as a Risk Factor for Craniosynostosis', *Obstetrics & Gynecology*, 110(2), pp. 369–377. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.11.032.

Reis, A. M. S. *et al.* (2015) 'Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 16(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12891-015-0467-8.

Ribeiro, A. F. *et al.* (2004) 'Efeito da associação hipotireoidismo-castração no osso e nas paratireóides de ratas adultas', *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 48(4), pp. 525–534. doi: 10.1590/s0004-27302004000400014.

Ribeiro, L. G. R., *et al.* (2018a) 'Excess maternal and postnatal thyroxine alters chondrocyte numbers and the composition of the extracellular matrix of growth cartilage in rats', *Connective Tissue Research*, 59(1), pp. 73–84. doi: 10.1080/03008207.2017.1290084.

Ribeiro, L. G. R., *et al.* (2018b) 'Excess Maternal Thyroxine Alters the Proliferative Activity and Angiogenic Profile of Growth Cartilage of Rats at Birth and Weaning', *Cartilage*, 9(1), pp. 89–103. doi: 10.1177/1947603516684587.

Rice, D. P. C. *et al.* (2000) 'Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development', *Development*, 127(9), pp. 1845–1855.

Rice, D. P. C., Rice, R. e Thesleff, I. (2003) 'Fgfr mRNA isoforms in craniofacial bone development', *Bone*, 33(1), pp. 14–27. doi: 10.1016/S8756-3282(03)00163-7.

- Riggs, W., Wilroy, R. S. e Etteldorf, J. N. (1972) 'Neonatal hyperthyroidism with accelerated skeletal maturation, craniosynostosis, and brachydactyly.', *Radiology*, 105(3), pp. 621–625. doi: 10.1148/105.3.621.
- Rivkees, S. A., Bode, H. H. e Crawford, J. D. (1998) 'Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature', *The New England journal of medicine*, 318(10), pp. 599–602. doi: 10.1056/NEJM199311113292002.
- Roach, H. I. (1994) 'Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption.', *Cell Biology International*, pp. 617–628. doi: 10.1006/cbir.1994.1088.
- Robinson, D. C., Hall, R. e Munro, D. S. (1969) 'Graves's disease, an unusual complication: Raised intracranial pressure due to premature fusion of skull sutures', *Archives of Disease in Childhood*, 44(234), pp. 252–257. doi: 10.1136/adc.44.234.252.
- Robson, H. *et al.* (2000) 'Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation', *Endocrinology*, 141(10), pp. 3887–3897. doi: 10.1210/endo.141.10.7733.
- Robson, H. *et al.* (2002) 'Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth', *Pediatric Research*, 52(2), pp. 137–147. doi: 10.1203/00006450-200208000-00003.
- Rodd, C., Jourdain, N. e Alini, M. (2004) 'Action of estradiol on epiphyseal growth plate chondrocytes', *Calcified Tissue International*, 75(3), pp. 214–224. doi: 10.1007/s00223-004-0197-7.
- Ronning, O. e Kantomaa, T. (1988) 'The growth pattern of the clavicle in the rat', *Journal of Anatomy*, 159, pp. 173–179.
- Roscioli, T. *et al.* (2000) 'Clinical findings in a patient with FGFR1 P252R mutation and comparison with the literature', *American Journal of Medical Genetics*, 93(1), pp. 22–28. doi: 10.1002/1096-8628(20000703)93:1<22::AID-AJMG5>3.0.CO;2-U.
- Roughley, P. J. (2006) 'The structure and function of cartilage proteoglycans', *European Cells and Materials*, 12, pp. 92–101. doi: 10.22203/eCM.v012a11.
- Rugh, R. (1968) *The mouse; its reproduction and development*. Burgess Publishing

Company.

Salerno, M. *et al.* (2001) 'Longitudinal growth, sexual maturation and final height in patients with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening', *European Journal of Endocrinology*, 145(4), pp. 377–383. doi: 10.1530/eje.0.1450377.

Salerno, M. *et al.* (2004) 'Effect of long-term L-thyroxine treatment on bone mineral density in young adults with congenital hypothyroidism', *European Journal of Endocrinology*, 151(6), pp. 689–694. doi: 10.1530/eje.0.1510689.

Samsa, W. E., Zhou, X. e Zhou, G. (2017) 'Signaling pathways regulating cartilage growth plate formation and activity', *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 62, pp. 3–15. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.07.008.

Satokata, I. *et al.* (2000) 'Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation', *Nature Genetics*, 24(4), pp. 391–395. doi: 10.1038/74231.

Segni, M. *et al.* (1999) 'Special features of Graves' disease in early childhood', *Thyroid*, 9(9), pp. 871–877. doi: 10.1089/thy.1999.9.871.

Serakides, R. *et al.* (2004) 'Efeito da associação hipertireoidismo-castração no osso de ratas adultas', *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 48(6), pp. 875–884. doi: 10.1590/s0004-27302004000600015.

Setiawati, R. e Rahardjo, P. (2018) 'Bone Development and Growth', in *Osteogenesis and Bone Regeneration*, pp. 1–20. doi: 10.5772/intechopen.82452.

Shao, Y. Y., Wang, L. e Ballock, R. T. (2006) 'Thyroid hormone and the growth plate', *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 7(4), pp. 265–271. doi: 10.1007/s11154-006-9012-2.

Shkil, F. *et al.* (2019) 'Effects of hyperthyroidism in the development of the appendicular skeleton and muscles of zebrafish, with notes on evolutionary developmental pathology (Evo-Devo-Path)', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-41912-9.

Sichieri, R. *et al.* (2007) 'Low prevalence of hypothyroidism among black and Mulatto people in a population-based study of Brazilian women', *Clinical Endocrinology*, 66(6), pp. 803–807. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.02816.x.

- Silva, J. F., Ocarino, N. M. e Serakides, R. (2014) ‘Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics’, *Reproduction*, 147, pp. 803–816. doi: 10.1530/REP-13-0374.
- Singh, P. e Schwarzbauer, J. E. (2012) ‘Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis’, *Journal of Cell Science*, 125(16), pp. 3703–3712. doi: 10.1242/jcs.095786.
- Sivaraj, K. K. e Adams, R. H. (2016) ‘Blood vessel formation and function in bone’, *Development (Cambridge)*, 143(15), pp. 2706–2715. doi: 10.1242/dev.136861.
- Slater, B. J. *et al.* (2008) ‘Cranial sutures: A brief review’, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 121(4), pp. 170–178. doi: 10.1097/01.prs.0000304441.99483.97.
- Smith, D. W. *et al.* (2019) *Articular Cartilage Dynamics*. Springer.
- Som, P. M. e Naidich, T. P. (2013) ‘Development of the Skull Base and Calvarium: An Overview of the Progression from Mesenchyme to Chondrification to Ossification’, *Neurographics*, 3(4), pp. 169–184. doi: 10.3174/ng.4130069.
- Song, H. e Park, K. H. (2020) ‘Regulation and function of SOX9 during cartilage development and regeneration’, *Seminars in Cancer Biology*, 67(April), pp. 12–23. doi: 10.1016/j.semcancer.2020.04.008.
- de Souza Junior, P. *et al.* (2020) ‘Clavicle in Carnivorans: A Forgotten Bone’, *Anatomical Record*, 303(7), pp. 1831–1841. doi: 10.1002/ar.24294.
- Springer, D. *et al.* (2017) ‘Thyroid in pregnancy: From physiology to screening’, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54(2), pp. 102–116. doi: 10.1080/10408363.2016.1269309.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. e McMahon, A. P. (1999) ‘Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation’, *Genes and Development*, 13(16), pp. 2072–2086. doi: 10.1101/gad.13.16.2072.
- St-Jacques, B. e Helms, J. A. (2003) *Prenatal Bone Development Ontogeny and Regulation, Pediatric Bone: Biology & Diseases*. Elsevier Science (USA). doi: 10.1016/B978-012286551-0/50005-1.

Stagnaro-green, A. *et al.* (2011) ‘Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and Postpartum’, *Thyroid*, 21(10), pp. 1081–1125. doi: 10.1089/thy.2011.0087.

Stagnaro-Green, A. e Pearce, E. (2012) ‘Thyroid disorders in pregnancy’, *Nature Reviews Endocrinology*, 8(11), pp. 650–658. doi: 10.1038/nrendo.2012.171.

Stein, G. S., Lian, J. B. e Owen, T. A. (1990) ‘Bone cell differentiation: A functionally coupled relationship between expression of cell-growth- and tissue-specific genes’, *Current Opinion in Cell Biology*, 2(6), pp. 1018–1027. doi: 10.1016/0955-0674(90)90151-4.

Stevens, D. A. *et al.* (2000) ‘Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation’, *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(12), pp. 2431–2442. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.12.2431.

Stevens, D. A. *et al.* (2003) ‘Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone’, *Molecular Endocrinology*, 17(9), pp. 1751–1766. doi: 10.1210/me.2003-0137.

Stickens, D. *et al.* (2004) ‘Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice’, *Development*, 131(23), pp. 5883–5895. doi: 10.1038/jid.2014.371.

Stockert, J. C. *et al.* (2012) ‘MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets’, *Acta Histochemica*, 114(8), pp. 785–796. doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006.

Sun, J. *et al.* (2013) ‘Foxc1 controls the growth of the murine frontal bone rudiment by direct regulation of a Bmp response threshold of Msx2’, *Development (Cambridge)*, 140(5), pp. 1034–1044. doi: 10.1242/dev.085225.

Sylvia, V. L. *et al.* (2000) ‘The membrane effects of 17 β -estradiol on chondrocyte phenotypic expression are mediated by activation of protein kinase C through phospholipase C and G-proteins’, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 73(5), pp. 211–224. doi: 10.1016/S0960-0760(00)00078-9.

Talwar, R. M. *et al.* (2006) ‘Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage’, *Journal of Oral and Maxillofacial*

Surgery, 64(4), pp. 600–609. doi: 10.1016/j.joms.2005.12.006.

Taylor, P. N. *et al.* (2018) ‘Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism’, *Nature*, 14, pp. 301–316. doi: 10.1038/nrendo.2018.18.

Thompson, D. N. P., *et al.* (1995a) ‘Intracranial pressure in Single-Suture craniosynostosis’, *Pediatric Neurosurgery*, 22, pp. 235–240.

Thompson, D. N. P., *et al.* (1995b) ‘Subdural intracranial pressure monitoring in craniosynostosis: its role in surgical management’, *Child’s Nervous System*, 11(5), pp. 269–275. doi: 10.1007/BF00301758.

Thorpe-Beeston, J. G. *et al.* (1991) ‘Maturation of the Secretion of Thyroid Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone in the Fetus’, *New England Journal of Medicine*, 324(8), pp. 532–536. Available at: <http://content.nejm.org/cgi/content/abstract/329/14/977%5Cnhttp://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199309303291401>.

Tran, S. e Hall, B. K. (1989) ‘Growth of the clavicle and Development of Clavicular Secondary Cartilage in the embrionyc mouse’, *Acta Anatomica*, 135, pp. 200–207.

Tran, T. H. *et al.* (2010) ‘Role of canonical Wnt signaling/ β -catenin via Dermo1 in cranial dermal cell development’, *Development*, 137(23), pp. 3973–3984. doi: 10.1242/dev.056473.

Tríbulo, C. *et al.* (2003) ‘Regulation of Msx genes by a Bmp gradient is essential for neural crest specification’, *Development*, 130(26), pp. 6441–6452. doi: 10.1242/dev.00878.

Tsang, K. Y., Chan, D. e Cheah, K. S. E. (2015) ‘Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: Death or lineage extension?’, *Development Growth and Differentiation*, 57(2), pp. 179–192. doi: 10.1111/dgd.12203.

Tubbs, R. S., Bosmia, A. N. e Cohen-Gadol, A. A. (2012) ‘The human calvaria: A review of embryology, anatomy, pathology, and molecular development’, *Child’s Nervous System*, 28(1), pp. 23–31. doi: 10.1007/s00381-011-1637-0.

Twigg, S. R. F. e Wilkie, A. O. M. (2015) ‘A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis’, *American Journal of Human Genetics*, 97(3), pp. 359–377. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.07.006.

- Van der Eerden, B. C. J. *et al.* (2002) 'Evidence for genomic and nongenomic actions of estrogen in growth plate regulation in female and male rats at the onset of sexual maturation', *Journal of Endocrinology*, 175(2), pp. 277–288. doi: 10.1677/joe.0.1750277.
- Van Der Eerden, B. C. J., Karperien, M. e Wit, J. M. (2003) 'Systemic and Local Regulation of the Growth Plate', *Endocrine Reviews*, 24(6), pp. 782–801. doi: 10.1210/er.2002-0033.
- Vandeberg, J. R., Buschang, P. H. e Hinton, R. J. (2004) 'Craniofacial growth in growth hormone-deficient rats', *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 278(2), pp. 561–570. doi: 10.1002/ar.a.20051.
- Varga, F. *et al.* (1997) 'Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: Depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression', *Calcified Tissue International*, 61(5), pp. 404–411. doi: 10.1007/s002239900356.
- Voisin, J. L. (2006) 'Clavicle, a neglected bone: Morphology and relation to arm movements and shoulder architecture in primates', *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 288(9), pp. 944–953. doi: 10.1002/ar.a.20354.
- Vucic, S. *et al.* (2017) 'Thyroid Function during Early Life and Dental Development', *Journal of Dental Research*, 96(9), pp. 1020–1026. doi: 10.1177/0022034517708551.
- Vulsma, T., Gons, M. H. e de Vijlder, J. J. M. (1989) 'Maternal-Fetal Transfer of Thyroxine in Congenital Hypothyroidism Due to a Total Organification Defect or Thyroid Agenesis', *The New England journal of medicine*, 321(1), pp. 13–16.
- Wang, G. *et al.* (2004) 'RhoA/ROCK Signaling Suppresses Hypertrophic Chondrocyte Differentiation', *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), pp. 13205–13214. doi: 10.1074/jbc.M311427200.
- Wang, L., Shao, Y. Y. e Ballock, R. T. (2007) 'Thyroid hormone interacts with the Wnt/ β -catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes', *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(12), pp. 1988–1995. doi: 10.1359/jbmr.070806.

- Wang, W., Rigueur, D. e Lyons, K. M. (2014) 'TGF β signaling in cartilage development and maintenance', *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 102(1), pp. 37–51. doi: 10.1002/bdrc.21058.
- Wang, Y. *et al.* (2010) 'Activation of p38 MAPK pathway in the skull abnormalities of Apert syndrome Fgfr2+P253R mice', *BMC Developmental Biology*, 10, pp. 1–20. doi: 10.1186/1471-213X-10-22.
- Van Wassenauer, A. G. *et al.* (2002) 'The quantity of thyroid hormone in human milk is too low to influence plasma thyroid hormone levels in the very preterm infant', *Clinical Endocrinology*, 56(5), pp. 621–627. doi: 10.1046/j.1365-2265.2002.01526.x.
- Van Wassenauer, A. G. e Kok, J. H. (2004) 'Hypothyroxinaemia and thyroid function after preterm birth', *Seminars in Neonatology*, 9(1), pp. 3–11. doi: 10.1016/S1084-2756(03)00114-3.
- Waung, J. A., Bassett, J. H. D. e Williams, G. R. (2012) 'Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(4), pp. 155–162. doi: 10.1016/j.tem.2011.11.002.
- Williams, G. R. (2013) 'Thyroid Hormone Actions in Cartilage and Bone', *European Thyroid Journal*, 2, pp. 3–13. doi: 10.1159/000345548.
- Williams, G. R. e Bassett, J. H. D. (2018) 'Thyroid diseases and bone health', *Journal of Endocrinological Investigation*, 41(1), pp. 99–109. doi: 10.1007/s40618-017-0753-4.
- Wojcicka, A., Bassett, J. H. D. e Williams, G. R. (2013) 'Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(7), pp. 3979–3986. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.05.005.
- Xing, W. *et al.* (2014) 'Epiphyseal chondrocyte secondary ossification centers require thyroid hormone activation of Indian hedgehog and osterix signaling', *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(10), pp. 2262–2275. doi: 10.1002/jbmr.2256.
- Xu, W. *et al.* (2012) 'The effects of low dose X-irradiation on osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro', *BMC Musculoskeletal Disorders*, 13. doi: 10.1186/1471-2474-13-94.
- Yen, P. M. (2001) 'Physiological and molecular basis of Thyroid hormone action', *Physiological Reviews*, 81(3), pp. 1097–1142. doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1097.

- Yeung Tsang, K. *et al.* (2014) 'The chondrocytic journey in endochondral bone growth and skeletal dysplasia', *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 102(1), pp. 52–73. doi: 10.1002/bdrc.21060.
- Yoshida, C. A. *et al.* (2004) 'Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog', *Genes and Development*, 18(8), pp. 952–963. doi: 10.1101/gad.1174704.
- Yoshida, T. *et al.* (2008) 'Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme', *Mechanisms of Development*, 125(9–10), pp. 797–808. doi: 10.1016/j.mod.2008.06.007.
- Zelzer, E. *et al.* (2001) 'Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2', *Mechanisms of Development*, 106, pp. 97–106. doi: 10.1016/S0925-4773(01)00428-2.
- Zelzer, E. *et al.* (2002) 'Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis', *Development*, 129(8), pp. 1893–1904.
- Zelzer, E. *et al.* (2004) 'VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development', *Development*, 131(9), pp. 2161–2171. doi: 10.1242/dev.01053.
- Zhao, H. *et al.* (2015) 'The suture provides a niche for mesenchymal stem cells of craniofacial bones', *Nature Cell Biology*, 17(4), pp. 386–396. doi: 10.1038/ncb3139.
- Zhou, Y. X. *et al.* (2000) 'A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures', *Human Molecular Genetics*, 9(13), pp. 2001–2008. doi: 10.1093/hmg/9.13.2001.
- Zhou, Z. Q. *et al.* (2015) 'Mutant activated FGFR3 impairs endochondral bone growth by preventing SOX9 downregulation in differentiating chondrocytes', *Human Molecular Genetics*, 24(6), pp. 1764–1773. doi: 10.1093/hmg/ddu594.
- Zhu, J. X. *et al.* (2001) 'Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats', *Histochemical Journal*, 33(1), pp. 25–35. doi: 10.1023/A:1017587712914.
- Zhu, W., Robey, P. G. e Boskey, A. L. (2008) 'The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone', in *Osteoporosis*, pp. 191–240. doi: 10.1016/B978-012370544-0.50011-2.

Zwickl, H. *et al.* (2016) 'Correlation Analysis of SOX9, -5, and -6 as well as COL2A1 and Aggrecan Gene Expression of Collagen I Implant-Derived and Osteoarthritic Chondrocytes', *Cartilage*, 7(2), pp. 185–192. doi: 10.1177/1947603515615388.

ANEXOS

Anexo 1: Certificado de aprovação do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Fenótipo e atividade de síntese de condroctos articulares extraídos de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno e mantidos sob cultura e alterações articulares de ratas expostas ao hipertireoidismo materno e induzidas a osteoartrite na vida adulta", protocolo do CEUA: 216/2019 sob a responsabilidade de Rogeria Serakides que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 16/09/2019.

Vigência da Autorização	16/09/2019 a 15/09/2024
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	200g / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	200g / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	12
Peso/Idade	200g / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	12
Peso/Idade	200g / 45(dias)
Sexo	feminino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	12
Peso/Idade	200g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	48

Peso/idade	10g / 3(dias)
Sexo	Indiferente
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireóideas ou controle.
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	48
Peso/idade	10g / 3(dias)
Sexo	Indiferente
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireóideas ou controle.
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	24
Peso/idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireóideas ou controle.
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	24
Peso/idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireóideas ou controle.
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	24
Peso/idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireóideas ou controle.
*Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	24
Peso/idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireóideas ou controle.

Considerações posteriores:

16/09/2019	Aprovado na reunião do dia 16/09/2019. Validade: 16/09/2019 a 15/09/2024
------------	--

Belo Horizonte, 16/09/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceu/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Fenótipo, proliferação e atividade de síntese in vitro de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos expostos ao hipertireoidismo materno durante a gestação", protocolo do CEUA: 156/2020 sob a responsabilidade de Rogeria Serakides que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 31/08/2020.

Vigência da Autorização	31/08/2020 a 30/08/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	7
Peso/idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	7
Peso/idade	200g / 2(meses)
Sexo	feminino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	36
Peso/idade	20g / 3(dias)
Sexo	Indiferente
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireoideas ou controle.
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	36
Peso/idade	20g / 3(dias)
Sexo	Indiferente
Origem	Os animais serão provenientes do cruzamento das mães hipertireoideas ou controle.
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/idade	300g / 3(meses)
Sexo	masculino
Origem	Biotério ICB UFMG (CEBIO)

Considerações posteriores:

31/08/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 31/08/2020. Validade: 31/08/2020 a 30/08/2025.
------------	--

Belo Horizonte, 01/09/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@ppq.ufmg.br

Anexo 2: Preparo da solução de tiroxina (50 μ g/5mL) para indução do hipertireoidismo

- Pesar 0,01g de tiroxina em balança de precisão farmacêutica.
- Adicionar 600mL de água destilada e agitar em agitador magnético.
- Transferir a solução para um balão volumétrico, completando o volume para 1000mL.
- Armazenar em frasco âmbar na geladeira por no máximo uma semana.

Anexo 3: Meio para cultivo de célula tronco indiferenciada (DMEM)

- Diluir em 800ml de água ULTRAPURA, o DMEM + 2g de bicarbonato de sódio 7,5% (em agitador automático).
- Acertar o pH para 7,2.
- Acrescentar 60 mg de gentamicina.
- Acrescentar 1 mL do PSA (descongelado).
- Completar o volume para 1000mL.
- Dentro do fluxo laminar, fazer a filtragem em bomba a vácuo com membrana de 0,22 μ m

DMEM com 10% de soro fetal bovino: 180mL de DMEM + 20mL de soro fetal bovino inativado (descongelado). Filtrar novamente em bomba à vácuo com membrana de 0,22 μ m

Anexo 4: Meio de diferenciação condrogênica

Para 100 mL de meio condrogênico:

- 99 mL de DMEM estoque
- 1mL de soro fetal bovino (1% SFB)
- 0,0125g de albumina sérica bovina (BSA)
- 1 μ L da solução de Piruvato de sódio (100 μ M)
- 65 μ L de transferrina (5 μ g/ml)
- 10 μ L de dexametasona 4mg/ml
- 200 μ L de insulina (100u/mL)

- 4,3 μ L de solução de ácido ascórbico diluído em água deionizada (50mg/mL) e filtrada. Acrescentar somente no dia do uso.

Após homogeneização, filtrar em bomba a vácuo com membrana de 0,22 μ m.

Anexo 5: Meio osteogênico

Para 200 mL de meio osteogênico:

- 200mL de DMEM 10% SFB
- 0,01g de ácido ascórbico
- 0,55g de β -glicerofosfato
- 2,17 μ L de dexametasona 4mg/ml

Após homogeneização, filtrar em bomba a vácuo com membrana de 0,22 μ m. Proteger o frasco com papel alumínio.

Anexo 6: Extração e digestão enzimática de cartilagem para obtenção de condrócitos.

Procedimento fora do fluxo:

- Após eutanásia, imergir os neonatos em dois frascos contendo álcool 70% por 1 minuto em cada.

Procedimento na ante sala e dentro do fluxo:

- Passar iodopovidine em toda a região depilada
 - Fazer incisão na pele e retirar a musculatura que envolve o fêmur (bilateral), colocando os ossos em tubo falcon com 30mL de DMEM.
- Obs.: Utilizar pinças e tesouras estéreis diferentes para pele e musculatura.

Procedimento dentro do fluxo da sala de cultura

- Remover o excesso de musculatura do fêmur.
- Em uma placa de petri, remover fatias finas de cartilagem das epífises proximais e distais utilizando bisturi e pinça estéreis. Não abrir o canal medular. Caso isso ocorra, descartar o osso.
- Lavar as fragmentos de cartilagem duas vezes com PBS 0,15 molar estéril.
- Em um tubo falcon, adicionar colagenase a 0,4% até cobrir os fragmentos (3mL) e acrescentar 3mL de DEMEM com 5 % de SFB. Homogeneizar e incubar por

16h, na estufa a 37°C e 5% de CO₂. (Desenroscar levemente a tampa do tubo falcon, semelhante ao que faz com as garrafas de cultivo, não esquecendo de fechar antes de retirá-los da estufa).

- Após 16 horas, homogeneizar e centrifugar por 10 min a 1400g.
- Desprezar o sobrenadante, lavar com PBS (qual PBS 1X) e centrifugar a 1.400g por 5 min (repetir 2x este procedimento).
- Re-suspender o *pellet* em meio condrogênico 1% SFB e transferir para garrafa T75, completando com meio condrogênico 1% SFB. (A quantidade vai variar de acordo com o número de células obtidas.)
- Incubar em estufa a 37°C e 5% CO₂.

OBS: Na primeira troca de meio, retirar o meio da garrafa, centrifugar por 10 min a 1.400g e resuspender o *pellet*. Nas demais trocas, desprezar o meio antigo.

Colagenase 0,4%: 0,08 g de colagenase em 20 mL de PBS 0,15 molar e filtrar com auxílio de filtro membrana de 0,22 µm acoplado à seringa.

Anexo 7: Extração de osteoblastos da calvária

Procedimentos fora do fluxo:

- Após eutanásia, imergir os neonatos em dois frascos contendo álcool 70% por 1 minuto em cada.

Procedimentos na ante sala e dentro do fluxo:

- Passar iodopovidine em todo neonato.
- Retirar a pele que recobre os ossos parietais e frontais do crânio com material estéril.
- Com um material estéril diferente do utilizado para pele, retirar a calvária.
- Colocar os fragmentos da calvária em tubo falcon de 40 mL contendo PBS 0,15 molar estéril (quantidade suficiente para cobrir os fragmentos).

Procedimentos dentro do fluxo da sala de cultura

- Limpar os ossos em placas de petri com PBS estéril e picotar as bordas dos fragmentos utilizando tesoura (não retirar fragmentos).

- Desprezar o PBS e transferir os fragmentos para tubo falcon, adicionando tripsina 0,5% até cobrir os fragmentos.
- Incubar por 15 min a 37°C e 5% CO₂.
- Descartar a tripsina e adicionar colagenase II a 0,2%.
- Incubar por 30 a 40 min a 37°C e 5% CO₂, agitando de 10 em 10 min.
- Descartar a colagenase.
- Adicionar colagenase a 0,2% e incubar por mais 30 min a 37°C e 5% CO₂.
- Recolher todo a colagenase centrifugar 5min a 1400g
- Adicionar novamente colagenase nos fragmentos a 0,2% e incubar por mais 30 min a 37°C e 5% CO₂.
- Recolher a segunda colagenase e centrifugar por 5 min a 1400g.
- Descartar o sobrenadante dos dois tratamentos de colagenase e re-suspender o *pellet* com DMEM 10% SFB e transferir para garrafa T 75.

Colagenase 0,2%: 0,08 g de colagenase em 40 mL de PBS 0,15 molar e filtrar com auxílio de filtro membrana de 0,22 µm acoplado à seringa.

Anexo 8: Tripsinização e contagem de células

Tripsinização para repique em garrafas

- Quando a garrafa estiver com aproximadamente 80% de confluência, retirar o meio e lavar com 5 mL de PBS 0,15 molar.
- Retirar o PBS e adicionar 1,5-2,0 mL de tripsina 0,5% na garrafa T75.
- Incubar por 8-10 min a 37°C e 5% CO₂.
- Após a retirada da estufa, agitar gentilmente a garrafa para favorecer a soltura das células.
- Acrescentar 10 mL de DMEM + 10% de SFB para inativar a tripsina e transferir 5 mL para outra garrafa T75.
- Completar ambas as garrafas com mais 5 mL de DMEM + 10% de SFB.

Obs.: Quem inativa a tripsina é o DMEM acrescido de 10% de SFB.

Contagem de células

- Proceder a tripsinização das células como descrito anteriormente, recolher todo o conteúdo da garrafa em tubo falcon de 50 mL (o volume do tubo não deve ultrapassar 30 mL).
- Centrifugar por 10 min a 1400g.
- Desprezar o sobrenadante e re-suspender o *pellet* com 2 mL de DMEM + 10% de SFB.
- Transferir 2 μ L para um eppendorf e acrescentar 98 μ L da solução de Tuck
- Retirar 10 μ L da nova solução e transferir para cada parte da câmara de Newbauer. Fazer a contagem das células dos dois quadrantes (1° e 2°).

n° de células/mL = média dos quadrantes (1° e 2°) x 50 (fator de diluição) x 10⁴

- Contar em aumento de 10x, somente as células dentro dos quadrantes menores. Não contar as células fora dos quadrantes.
- Fazer regra de três, para calcular o volume com células a ser utilizado em cada well.

Anexo 9: Ensaio de MTT

- Aspirar todo o meio e descartar.
- Colocar 210 μ L de meio de cultura utilizado com 10% de SFB/well. (Se o meio em questão for o osteogênico ou condrogênico, deve-se colocar o osteogênico ou condrogênico).
- Acrescentar 170 μ L de MTT (5 mg/mL).
- Incubar a placa 2 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. O branco (210 μ L do meio utilizado + 170 μ L de MTT) também deve ser colocado na estufa neste momento.
- Observar no microscópio a formação de cristais.
- Colocar 210 μ L de SDS – 10% de HCl.
- Incubar a placa overnight em estufa a 37°C, 5% CO₂.
- Retirar 100 μ L de cada well, transferir para placas de 96 wells e ler a 595 nm. Fazer duplicata de cada well. Cuidado para não haver a formação de bolhas de ar! (Se formar bolhas, as mesmas devem ser estouradas com a ponta de uma agulha).

MTT estéril: 5 mg/mL de MTT em PBS 0,15M. Dissolver o pó (150mg em 30mL de PBS 0,15M) e filtrar a solução em membrana de 0,22 µm. Manter a 4° C, no escuro.

SDS 10% - HCl: 10 g de SDS em 100 mL de água deionizada + 333 µL de HCl concentrado (colocar 100 µL de HCl para cada 30 mL de solução). Manter a temperatura ambiente.

Anexo 10: Ensaio da Fosfatase Alcalina

- Aspirar todo o meio e descartar.
- Lavar a placa 2 x com PBS 0,15M estéril
- Colocar 200 µL da solução de BCIP/NBT (1 mL de BCIP + 1mL de NBT + 8 mL de PBS 0,15 M) (Invitrogen, CA, EUA) em cada poço.
- Incubar a placa 2 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂.
- Observar no microscópio.
- Colocar 200 µL da solução de SDS – 10% HCl.
- Incubar a placa overnight em estufa a 37°C, 5% CO₂.
- Retirar 100µL de cada well, transferir para placas de 96 wells e ler a 595 nm.
Fazer duplicata de cada well. Cuidado para não haver a formação de bolhas de ar!

Branco: 200 µl da solução de NBT/BCIP e 200 µl de SDS. Dessa mistura, pipetar 100 µl para cada poço da placa de 96 wells.

Anexo 11: Processamento dos *pellets*

- Retirar o meio, lavar com PBS 0,15M e ficar com paraformaldeído 4%
- Retirar o paraformaldeído e fazer o processamento:

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 12: Coloração de ácido periódico de Schiff (PAS)

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	30 minutos
Água destilada	2 segundos
Reativo de schiff	50 minutos
Água corrente	10 minutos
Hematoxilina	3 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

Anexo 13: Coloração Von Kossa

- Lavar o poço em água corrente, e depois em água destilada.
- Colocar em solução de nitrato de prata 5% por 2h sob luz (lâmpada de 100 watts).
- Lavar por 2x em água destilada.
- Colocar em solução de tiosulfato de sódio 5% por 5 min.
- Lavar em água corrente por 2 x.
- Contra corar com eosina por 40 segundos.
- Lavar em água corrente por 2 x.
- Lavar com álcool absoluto.

Solução de nitrato de prata: 5g de Nitrato de prata em 100mL de água destilada.

Solução Tiosulfato de sódio: 5g de Tiosulfato de sódio em 100mL de água destilada.

Anexo 14: Extração de RNA total

- Após lavar os tubos falcons e ou garrafas com PBS 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 μ L 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 μ L 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 μ L).
- Incubar por 10 minutos a 55°C.
- Dosar o RNA em NanoVue™.

Anexo 15: Síntese de cDNA

Kit utilizado: Kit Super Script III Platinum Two-Step qPCR com SYBR Green (cat. n. 11735-032).

- Após dosagem do RNA, calcular a quantidade de RNA que será necessária para fazer o MIX.

Concentração de RNA - 1 μ g de RNA total.

Ex.: a dosagem de um determinado RNA foi: 400 μ g/1000 μ L

400 μ g _____ 1000 μ L

1 μ g _____ x

x = 2,5 μL 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	5x
2x RT reaction MIX	10 μL	50 μL
RT enzyme MIX	2 μL	10 μL
RNA (1 μg)	2 μL	-----
Água DEPC	6 μL	-----

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*.

- Pipetar 12 μL de MIX em cada tudo e acrescentar 8 μL de RNA + água DEPEC (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 μL 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 16: 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 μL , porém faz-se 25 μL de volume final, ou seja, 2,5 μL de cDNA para 25 μL de reação.
- Preparar o Mix:

Mix	1x	6x
SYBR green	12,5 μL	75 μL
Primer forward	1 μL	6 μL
Primer reverse	1 μL	6 μL
Rix	1 μL	6 μL
cDNA	2,5 μL	-----
Água DEPC	7 μL	42 μL

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 22,5 μ L de MIX em cada poço 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 60°C	15 segundos 30 segundos