

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIA**

---

---

**Efeitos *in vivo* e *in vitro* da cafeína sobre o tecido cartilaginoso de ratos em crescimento**

---

---

**Amanda Maria Sena Reis**

**Belo Horizonte - MG  
2012**

**Amanda Maria Sena Reis**

# **Efeitos *in vivo* e *in vitro* da cafeína sobre o tecido cartilaginoso de ratos em crescimento**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Patologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Co-orientadora: Profa. Dra. Natália de Melo Ocarino

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2012**

R375e Reis, Amanda Maria Sena, 1986-  
Efeitos *in vivo* e *in vitro* da cafeína sobre o tecido cartilaginoso de ratos em crescimento  
/ Amanda Maria Sena Reis. – 2012.  
115 p. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides

Co-orientadora: Natália de Melo Ocarino

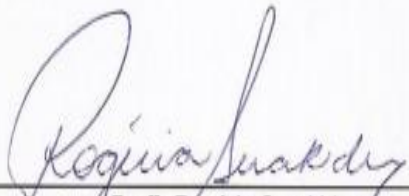
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

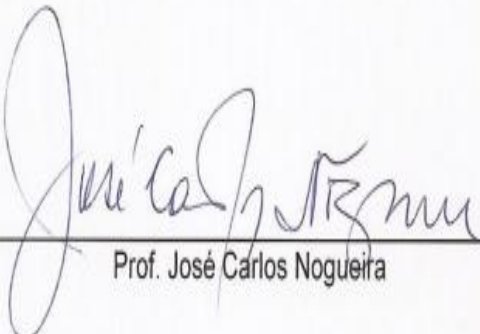
Inclui bibliografia

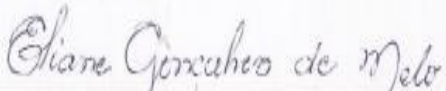
1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Apoptose – Teses. 3. Cafeína – Efeito fisiológico – Teses. I. Serakides, Rogéria. II. Ocarino, Natália de Melo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.088 5

Dissertação defendida e aprovada em 28 de setembro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Rogéria Serakides  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. José Carlos Nogueira

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Eliane Gonçalves de Melo

*O segredo é não correr atrás das borboletas...  
É cuidar do jardim para que elas venham até você.*

*Mário Quintana*

---

## *AGRADECIMENTOS*

---

A Deus, por caminhar sempre ao meu lado em todas as jornadas da minha vida, e especialmente naqueles momentos em que neste caminho havia apenas uma pegada, sempre em meus momentos de maior cansaço e de dificuldades, quando pude perceber claramente que quando mais precisei ele não me desamparou, e sim me carregou, trilhando por mim para que mais tarde pudéssemos novamente caminhar juntos.

A Nossa senhora, a minha maior confidente durante este trabalho, pelo auxílio imediato, e por me cobrir de bençãos com o seu manto estrelado.

Aos meus amados pais José Roberto e Maria do Carmo, por simplesmente existirem, e me apoiarem incondicionalmente independente das minhas escolhas, por estarem sempre ao meu lado, mesmo na distância, sendo os meus alicerces e exemplos de profissionalismo e caráter. Agradeço de alma, por não medirem esforços para me ajudar e vivenciarem intimamente todos os meus sentimentos durante esses dois anos, por fazerem dos nossos encontros o néctar para alcançar a vitória. A vocês dedico este trabalho com muito carinho e amor.

A minha irmã Roberta, pelo exemplo de pessoa, de amizade, de força, de segurança, de apoio, e por ser um exemplo de conduta e ética pessoal e profissional. Obrigada por fazer parte da minha vida tão intensamente.

Ao Daniel, pois com você aprendi que “o amor é paciente e bondoso; que o amor não se ufana, não se ensoberbece; O amor não é rude nem egoísta, não se exaspera e não se ressentido do mal. O amor não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade. Está sempre pronto para perdoar, crer, esperar e suportar o que vier.” Por estar sempre presente na minha vida e pela paciência por todos estes anos. Pela compreensão e por muitas vezes abrir mão do tempo em prol da minha pesquisa. Obrigada por dividir comigo as minhas alegrias e tristezas. A você também dedico este trabalho com muito carinho.

Aos meus queridos avós, Sena e Amanda, por me proporcionarem com a sua presença o alcance de um pedacinho do paraíso na terra.

Aos meus tios e primos, pelos momentos de descontração e de apoio incondicional, sempre dispostos a ajudar e na torcida.

As minhas grandes amigas Rafaela, Fernanda, Renatinha, Renata, Ana Paula, e Roberta, que me ensinaram que com o tempo agente aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. Aprende que não temos que mudar de amigos se Compreendemos que os amigos mudam, e que você e seus amigos podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos. Amigos são anjos na terra e são eles que nos emprestam as suas asas quando não conseguimos alçar voo. Obrigada a todas vocês por me ajudarem a voar.

A Márcia, Ana Cláudia, Luciana, André, Mário, Ediléia, Lucía, Clarice, Valmara, Denise, Eliete, Carol e KK, amigos com os quais tive o prazer de morar nestes dois anos de mestrado e com os quais aprendi a arte da convivência e o aprendizado individual que cada um de vocês me proporcionou. Obrigada pela Companhia, pelas risadas, pelos conselhos, e por construir comigo uma família em BH.

A Denise, que me acolheu como uma filha, e a Daniel, KK, Eliete, Carol e Marcella por me receberem de braços abertos. Vocês tem toda a minha consideração.

À minha orientadora Professora Rogéria Serakides, a qual tive o prazer de conhecer ainda durante a minha Iniciação científica quando prontamente se dispôs a me ajudar durante a necessidade de um reagente para conclusão de minha pesquisa. Desde aquele momento pude perceber o esforço e a seriedade desta grande pesquisadora para colaborar com outras pesquisas em andamento no país e desde então a minha admiração. Agradeço por toda a orientação e ensinamentos durante esses dois anos. Admiro a maneira correta como conduz as pesquisas, e a paixão que a move. Orientar é uma arte, e nessa arte só é vitorioso quem consegue transcender o objeto de pesquisa. E você não só transcende como vive, trazendo o conhecimento não apenas escrito e falado, mas também pintado assim como uma grande obra em tela. Obrigada por lapidar, e pincelar a minha formação como pesquisadora.

A minha co-orientadora Professora Natália de Melo Ocarino, pela sua participação constante e imprescindível. Obrigada por contribuir com este trabalho de maneira tão intensa e sempre tão solícita. Obrigada pela co-orientação, sempre muito segura e competente. Com você aprendi que maturidade no âmbito acadêmico está relacionado com seriedade, ética, e a intensidade com que permitimos com que o conhecimento se adentre a nós e não com relação a idade. Cada um aprende no seu tempo e você aproveita intensamente o seu. Obrigada por ajudar a construir cada centímetro desta pesquisa.

As bolsistas de Iniciação científica, Ana Cláudia, Ana Flávia, Lidiane e Raquel, pela colaboração e participação durante os experimentos, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos de descontração, por serem sempre solícitas. Obrigada por terem contribuído com este trabalho.

A bolsista de Iniciação científica e minha grande amiga Aninha, por todos os momentos e sentimentos Compartilhados. Obrigada pela ajuda experimental, mas principalmente por estar comigo nos momentos de dificuldade e apreensão. Obrigada por espalhar pétalas de rosas no meu caminho e amortecer minhas quedas. Obrigada por cuidar das minhas feridas enquanto elas pareciam incuráveis. Obrigada por me ajudar a me reencontrar e por me carregar quando levantar parecia impossível. A sua amizade foi fundamental durante a execução deste projeto. *Com você aprendi que as pessoas não entram na nossa vida por acaso, e tampouco é por acaso que elas permanecem.*

Aos amigos e colegas da Patologia, Juneo, Jankerle, Lorena, Débora, Silvia, Silvinha, Fernanda, Ana Patrícia, Auricélio, Ingrid, Juliana, karine, Carlos, Andréia, Karen, Michele e todos os demais que me falham a memória. Obrigada pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Juneo, por todos os ensinamentos, paciência, momentos de descontração e amizade.

À ex-residente da patologia, Ana Letícia, pela amizade sincera, e inúmeros momentos de descontração.

A técnica do laboratório, Leymar, obrigada por toda a ajuda na realização deste trabalho, momentos de descontração e amizade.

Às ex-técnicas do laboratório, Marilene e Rosi, obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar.

Às funcionárias da limpeza, da esterelização e ao porteiro Fábio, obrigada pela convivência agradável.

Ao funcionário Adão, pela sensibilidade, disposição, e amizade, Obrigada pelas palavras amigas.

Aos professores do Setor de patologia: Rogéria Serakides, Natália de Melo Ocarino, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Ernane Fagundes do Nascimento, Roselene Ecco e Renato de Lima Santos, pelos conhecimentos de patologia adquiridos durante o mestrado.

Aos Componentes da banca, Eliane Gonçalves de Melo e José Carlos Nogueira pela prontidão em Compor a banca para avaliação desta dissertação.

Aos animais, Kassy, Meg, Yuri, Gaia, Luna, Maia e Baio, seres especiais com os quais tive o prazer de conviver.

Aos ratinhos do laboratório, pois foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A 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 destinado a realização deste trabalho.



---

## *SUMÁRIO*

---

Lista de tabelas.....	10
Lista de figuras.....	12
Lista de abreviaturas.....	16
Resumo.....	20
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Objetivos.....	23
Revisão de literatura.....	23
1.Sistema esquelético.....	23
1.1.Morfogênese do esqueleto axial.....	24
1.2.Morfogênese do esqueleto apendicular.....	24
1.3.Formação óssea endocondral.....	26
1.4.Crescimento ósseo endocondral.....	27
1.5.Genes e fatores que influenciam a formação e o crescimento ósseo endocondral	28
1.5.1.Proteínas ósseas morfogenéticas.....	29
1.5.2.Fator de transcrição Sox-9.....	30
1.5.3.Fator de transcrição Runx-2.....	32
1.5.4.PTHrP e Ihh.....	32
1.5.5.Fator de crescimento fibroblástico (FGF).....	34
1.5.6.Outros fatores potenciais.....	36
1.6.Apoptose na formação e no crescimento ósseo endocondral.....	37
2.Cafeína.....	39
2.1.Farmacocinética da cafeína.....	40
2.1.1.Absorção e distribuição.....	40

2.1.2. Metabolismo e eliminação.....	<b>41</b>
2.2. Efeito da cafeína sobre as células ósseas e suas células precursoras.....	<b>41</b>
2.3. Efeito da cafeína na formação pré-natal e sobre o tecido ósseo de indivíduos jovens.....	<b>42</b>
2.4. Efeito da cafeína sobre os metablismos ósseo e mineral de individuos adultos	<b>43</b>
Material e métodos.....	<b>44</b>
Resultados.....	<b>48</b>
Discussão.....	<b>71</b>
Conclusão.....	<b>77</b>
Referências bibliográficas.....	<b>77</b>
Anexo 1.....	<b>94</b>
Anexo 2.....	<b>107</b>
Anexo 3.....	<b>108</b>
Anexo 4.....	<b>109</b>
Anexo 5.....	<b>110</b>
Anexo 6.....	<b>111</b>
Anexo 7.....	<b>115</b>

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Lista de genes e iniciadores para RT-PCR em tempo real.....	48
Tabela 2	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da dosagem plasmática de cortisol (mcg/dL) de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle aos 21 dias de lactação.....	49
Tabela 3	Número de malformações, ao nascimento, nos filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	49
Tabela 4	Mediana (variação) e resultado da análise estatística do número de filhotes nascidos e da porcentagem de filhotes mortos nos grupos de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	50
Tabela 5	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso dos filhotes (g) de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle do nascimento até o desmame.....	51
Tabela 6	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento corporal medido da nuca até a base da cauda de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e controle.....	52
Tabela 7	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento (mm) dos membros de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	53
Tabela 8	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento (mm) do corpo vertebral de ratos de três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	53
Tabela 9	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento e largura (cm) do fêmur (F), tíbia (T) e úmero (U) dos ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e controle....	54
Tabela 10	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento vertebral (mm) de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	54
Tabela 11	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura da placa epifisária vertebral (mm) dos ratos de três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	55
Tabela 12	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de tecido ósseo trabecular no tecido ósseo esponjoso primário da tíbia proximal e nas vértebras lombares de ratos de três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	57
Tabela 13	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas de condroblastos e de matriz nas epífises cartilaginosas da tíbia e do	

	fêmur de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	59
Tabela 14	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas vazias em 100 células nas epífises cartilaginosas do fêmur e da tíbia de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	59
Tabela 15	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura (mm) da cartilagem articular dos ossos longos (fêmur, tíbia, úmero) de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	62
Tabela 16	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura (mm) da placa epifisária dos ossos longos (fêmur, tíbia, úmero) de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	62
Tabela 17	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífise e esponjosa primária dos ossos longos e das vértebras de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.....	65
Tabela 18	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas vazias de condroblastos nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).....	67
Tabela 19	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas de condroblastos com núcleo picnótico nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle)....	67
Tabela 20	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de condroblastos com expressão de CDC-47 nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).....	68
Tabela 21	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de condroblastos apoptóticos/campo marcado pela técnica de Túnel nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).....	69
Tabela 22	Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da expressão de transcriptos gênicos para caspase-3, Runx-2 e Sox-9 pela técnica de RT-PCR tempo real nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos.....	71

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1	Malformações nos filhotes de ratas tratadas com cafeína na dose de 100 mg. A) Rato de 21 dias de idade com abaulamento da região fronto-nasal do crânio. B) Rato de três dias de idade com sindactilia no membro pélvico esquerdo, caracterizada pela união dos espaços interdigitais. C) Rato de três dias de idade com braquidactilia no terceiro dedo do membro pélvico esquerdo, caracterizada pelo encurtamento do dígito.....	50
Figura 2	Ratos com três dias de idade, filhotes de ratas do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg com menor tamanho em comparação ao grupo controle.....	51
Figura 3	Ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg com tamanho inferior ao do grupo controle.....	52
Figura 4	Comprimento vertebral de ratos com três dias de idade. HE, Bar = 236,51 $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. O comprimento vertebral do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg é menor em comparação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg.....	53
Figura 5	Vértebras lombares de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 236,51 $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. O comprimento vertebral do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg é menor em comparação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com cafeína 25 e 50 mg/Kg.....	55
Figura 6	Ratos com três dias de idade. HE, Bar = 47,29 $\mu$ m. A, B, C e D) Placa epifisária da tibia dos grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. A) Placa epifisária do grupo controle com as zonas (proliferação, diferenciação e hipertrofia) bem distintas. B, C) Zona de diferenciação estreita e pouco organizada em colunas. D) Indiferenciação das zonas de proliferação, diferenciação e hipertrofia. E, F, G e H) Placa epifisária vertebral dos grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. A espessura da placa epifisária vertebral do grupo tratado com cafeína nas doses de 50 e 100 mg é menor em Comparação ao grupo controle.....	56
Figura 7	Placa epifisária vertebral de ratos com três dias de idade. Safranina O, Bar = 47,29 $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. Grupo controle com matriz cartilaginosa avermelhada como característica aparente da grande quantidade de glicosaminoglicanos. Nos grupos tratados com cafeína, três ou quatro dos cinco animais apresentam matriz cartilaginosa de coloração esverdeada, como característica aparente da deficiência no conteúdo de glicosaminoglicanos. Nos grupos tratados com 50 e 100mg/Kg de cafeína, as cartilagens que se coraram de vermelho apresentam coloração de menor intensidade em Comparação ao grupo controle.....	57

Figura 8	Rato com três dias de idade. HE, Barra = 94,59 µm. A, B, C e D) Tecido ósseo esponjoso primário da tíbia dos grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A quantidade de tecido ósseo trabecular nos grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg (C, D) é menor em Comparação ao grupo controle (A) e ao grupo tratado com cafeína 25 mg (B). E, F, G e H) Tecido ósseo esponjoso primário da vértebra dos grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A quantidade de tecido ósseo trabecular nos grupos tratados com cafeína nas doses de 25 mg/Kg (B), 50 mg/Kg (C) e 100 mg/Kg (D) é menor em comparação ao grupo controle (A).....	58
Figura 9	Epífises cartilaginosas do fêmur de ratos com três dias de idade. HE, Bar = 23,64 µm. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Lacunas vazias de condroblastos presentes em todos os grupos tratados com cafeína, sendo os grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína aqueles que apresentam a maior quantidade de núcleos picnóticos e de lacunas vazias de condroblastos em comparação ao grupo controle.....	59
Figura 10	Epífises cartilaginosas do fêmur de ratos com três dias de idade. HE, Bar = 23,64 µm. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Lacunas vazias de condroblastos presentes em todos os grupos tratados com cafeína, sendo os grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína aqueles que apresentam a maior quantidade de núcleos picnóticos e de lacunas vazias de condroblastos em comparação ao grupo controle.....	60
Figura 11	Epífises cartilaginosas do fêmur de ratos com três dias de idade. Safranina O, Bar = 23,64 µm. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Grupo controle com matriz cartilaginosa avermelhada como característica aparente da grande quantidade de glicosaminoglicanos. Nos grupos tratados com cafeína, quatro dos cinco animais apresentam matriz cartilaginosa de coloração esverdeada, como característica aparente da deficiência no conteúdo de glicosaminoglicanos. Um animal de cada um dos grupos tratados com cafeína com matriz de coloração avermelhada, sendo que nos grupos tratados com 50 e 100mg/Kg de cafeína, a coloração vermelha e de menor intensidade em comparação ao grupo controle.....	60
Figura 12	Zona média da cartilagem articular do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45 µm. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A) Números condrócitos com núcleos volumosos e com cromatina frouxa. B) Condrócitos com núcleos volumosos de permeio a núcleos picnóticos. C) Condrócitos com picnose nuclear. D) Condrócitos com picnose nuclear associados a lacunas desprovidas de núcleo.....	61

Figura 13	Cartilagem articular do úmero de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 236,51 $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A cartilagem articular do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg é maior em comparação ao grupo controle e demais grupos.....	61
Figura 14	Cartilagem articular do úmero de ratos com 21 dias de idade. Safranina O, Bar = 236,51 $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Todos os grupos tratados apresentam matriz cartilaginosa avermelhada como característica aparente da presença de glicosaminoglicanos, semelhante ao grupo controle.....	62
Figura 15	Zona de proliferação da placa epifisária do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45 $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente A) Números condrócitos com núcleos volumosos e de cromatina frouxa. B) Números condrócitos com núcleos volumosos com cromatina discretamente condensada. C) Condrócitos com núcleos picnóticos e com algumas lacunas vazias. D) Condrócitos com núcleos intensamente picnóticos e com algumas lacunas vazias.....	63
Figura 16	Zona colunar da placa epifisária do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45 $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A) Condrócitos dispostos em colunas com núcleos volumosos e de cromatina frouxa. B) Condrócitos dispostos em colunas com núcleos menores em relação ao controle e com cromatina ligeiramente condensada. C) Condrócitos pobremente organizados em colunas e com núcleos pequenos e com cromatina discretamente condensada. D) Condrócitos com grande quantidade de núcleos picnóticos e achatamento da zona colunar.....	64
Figura 17	Zona hipertrófica da placa epifisária do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45 $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Em todos os grupos, observa-se semelhança das características morfológicas, onde os condrócitos apresentam lacunas amplas, pouca matriz e invasão vascular.....	64
Figura 18	Placa epifisária das vértebras torácicas de ratos com 21 dias de idade. Safranina O, Bar = 47,29 $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25,50 e 100 mg, respectivamente. Placa epifisária de todos os animais e de todos os grupos com a matriz cartilaginosa de coloração vermelha intensa, característica aparente da presença de glicosaminoglicanos.....	64
Figura 19	Tecido ósseo esponjoso primário da vértebra de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 94,59 $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25,50 e 100 mg, respectivamente. A porcentagem de tecido ósseo trabecular nos grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg é menor em	

	comparação ao grupo controle.....	66
Figura 20	Trabécula óssea de ratos com 21 dias de idade. HE. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25,50 e 100 mg, respectivamente. Em todos os grupos, o revestimento osteoblástico é uniforme e formado por osteoblastos volumosos dispostos em uma ou mais camadas. Barra = 9,45 $\mu$ m.....	66
Figura 21	Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). HE, Bar = 23, 64 $\mu$ m. A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. Grupos controle e tratado com cafeína com aumento gradativo do número de lacunas vazias de condroblastos ao longo de todo o período de cultivo em comparação ao dia 0. Aos 21 dias de cultivo, grupo tratado com cafeína apresentando menor número de lacunas vazias de condroblastos em comparação ao controle no mesmo período.....	67
Figura 22	Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). Safranina O, Bar = 9,45 $\mu$ m. A, B, C) Grupo controle no tempo zero de cultivo, grupo controle com 21 dias de cultivo e grupo tratado com cafeína com 21 dias de cultivo, respectivamente. Matriz cartilaginosa intensamente avermelhada com redução da intensidade de coloração aos 21 dias de cultivo em ambos os grupos, com exceção de uma epífise que apresentou coloração vermelha de intensidade semelhante a do dia zero.....	68
Figura 23	Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracoloração pelo Metil green. Bar = 23, 64 $\mu$ m. A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. Grupos controle e tratado com cafeína com redução de núcleos de condroblastos com expressão de CDC-47, em marron, ao longo de todo o período de cultivo em comparação ao dia 0.....	69
Figura 24	Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). Técnica de túnel, contra-coloração pelo Metil green. Bar = 23, 64 $\mu$ m. A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. Grupos controle e tratado com cafeína com aumento gradativo do número de condroblastos apoptóticos, em marron, ao longo de todo o período de cultivo em comparação ao dia 0. Aos 21 dias de cultivo, grupo tratado com cafeína apresentando maior número de condroblastos apoptóticos em comparação ao controle no mesmo período.....	70



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- AER: Crista ectodérmica apical
- AMPc: adenosina monofosfato cíclico
- ANOVA: análise de variância
- APAF-1: Fator de ativação da proteinase apoptótica-1
- BAX: proteína da família Bcl-2
- BMPs: proteínas morfogenéticas do osso
- BMP-2: proteína morfogenética do osso 2
- BMP-4: proteína morfogenética do osso 4
- BMP7: proteína morfogenética do osso 7
- BMP1a: Receptor tipo 1 da proteína morfogenética do osso
- BMP2b: Receptor tipo 2 da proteína morfogenética do osso
- Caspase – proteases de cisteína com especificidade de aspartato
- Cbfa-1/Runx-2: fator ligante de núcleo A1/fator de transcrição 2 relacionado ao Runt
- CCD: Displasia cleidocraniana
- CDC-47 – proteína 47 de controle de divisão celular
- Col-2: Colágeno 2
- Col-2a1: Colágeno 2a1
- Col-9a2: Colágeno 9a2
- Col-11a2: Colágeno 11a2
- CRH - hormônio liberador de corticotropina
- DAB – diaminobenzidina
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- En1- Engrailed
- EUA: Estados Unidos da América

FGF: fator de crescimento fibroblástico

FGF-1 – fator de crescimento fibroblástico 1

FGF-2 - fator de crescimento fibroblástico 2

FGF-3 - fator de crescimento fibroblástico 3

FGF4 - fator de crescimento fibroblástico 4

FGF-5 - fator de crescimento fibroblástico 5

FGF-6 - fator de crescimento fibroblástico 6

FGF-7 - fator de crescimento fibroblástico 7

FGF-8 - fator de crescimento fibroblástico 8

FGF-9 - fator de crescimento fibroblástico 9

FGF10 - fator de crescimento fibroblástico 10

FGF-15 - fator de crescimento fibroblástico 15

FGF-17- fator de crescimento fibroblástico 17

FGF-18- fator de crescimento fibroblástico 18

FGF-19 - fator de crescimento fibroblástico 19

FGF-22 - fator de crescimento fibroblástico 22

FGFR–receptor do fator de crescimento fibroblástico

FGFR-1 – receptor do fator de crescimento fibroblástico 1

FGFR-2 – receptor do fator de crescimento fibroblástico 2

GDF: Fator de diferenciação e crescimento

GDF-5: Fator de diferenciação e crescimento 5

GH: hormônio do crescimento

HE: Hematoxilina e Eosina

HES: fator de transcrição (Hairy Enhancer of Split)

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina

IHH: Indian hedgehog

IL: interleucina

MMPs: Metaloproteinases

MSX2: Gene que codifica membros da família homeobox

OPG: osteoprotegerina

PAX-1: Fator de transcrição 1 da família PAX

PBS: solução tampão de fosfato padrão

PCR: reação em cadeia da polimerase

Pi: fósforo inorgânico

PSM: pré-somítico

PTC: patched

PTH: paratormônio

PTHrP: Peptídeo relacionado ao paratormônio

Raldh2: Enzima sintetizadora de Ácido Retinóico

RANKL: receptor ativador NF-kapa beta ligante

RNA: ácido ribonucléico

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

Runx-2: fator de transcrição 2 relacionado ao Runt

SFB: soro fetal bovino

Shh: *sonic hedgehog*

SMAD: proteína intracelular

SNK: *Student Newman Keuls*

Sox-5: gene que codifica a proteína ligante do DNA (Sox-9-SRY (sex determining region Y)-box 5)

Sox-6: gene que codifica a proteína ligante do DNA (Sox-9-SRY (sex determining region Y)-box 6)

Sox-9: gene que codifica a proteína ligante do DNA (Sox-9-SRY (sex determining region Y)-box 9)

SRY: Região Y determinante do sexo

TBS – solução de Tris tamponado

TBX5: Fator de transcrição 5 da família T-box

TdT - Terminal deoxynucleotidyl transferase

TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante  $\beta$

TIMPs: Inibidores tissulares de metaloproteinases

TNF: fator de necrose tumoral

TUNEL – terminal deoxynucleotidyl transferase – TdT dUTP nick and labeling

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

WNT: via de sinalização (Wingless –type MMTV integration site family)

WNT2b: gene da via de sinalização WNT (wingless-type MMTV integration site family, member 2B).

WNT7a: gene da via de sinalização WNT (wingless-type MMTV integration site family, member 7a).

WNT8c: gene da via de sinalização WNT (wingless-type MMTV integration site family, member 8c).

ZPA: Zona de atividade polarizante

## **RESUMO**

Foi avaliado o efeito da cafeína sobre o crescimento ósseo endocondral de ratos (experimento 1) e sobre a proliferação, apoptose e a diferenciação de condroblastos (experimento 2). No experimento 1, 38 ratas Wistar adultas foram distribuídas nos grupos controle e tratados com cafeína (25, 50 e 100 mg/Kg) durante a gestação e lactação. Foram avaliados os níveis plasmáticos de cortisol da mãe e o crescimento ósseo endocondral dos filhotes com três e 21 dias de idade. No experimento 2, epífises cartilaginosas de fêmures de ratos Wistar neonatos foram cultivadas com e sem cafeína por 0, 7, 14 e 21 dias. As cartilagens foram submetidas ao exame morfométrico, imunohistoquímico, da técnica de túnel e de RT-PCR em tempo real. As médias foram comparadas pelo teste SNK. No experimento 1, conclui-se que a cafeína inibe o crescimento ósseo endocondral; que os efeitos da cafeína são mais danosos em ratos com três dias de idade, causando degeneração e morte de condoblastos e que altas doses de cafeína (100 mg/Kg) aumentam os níveis plasmáticos de cortisol das ratas mães, o que está associado as alterações mais intensas do tecido cartilaginoso da prole. Conclui-se no experimento 2, que a cafeína *in vitro* aumenta a apoptose, mas ao mesmo tempo, impede a queda do índice proliferativo e aumenta a expressão de transcriptos gênicos da diferenciação celular, representados pelo Sox-9 e pelo Runx-2.

Palavras-chave: Cafeína, cartilagem, proliferação, diferenciação, apoptose, ratas

## ***ABSTRACT***

The effect of caffeine on endochondral bone growth in rats (experiment 1) and on proliferation, apoptosis and differentiation of chondroblasts (experiment 2) was evaluated. In experiment 1, 38 female Wistar rats were distributed in the control groups and treated with caffeine (25, 50 and 100 mg / kg) during pregnancy and lactation. The plasma cortisol levels of mother and endochondral bone growth of offspring aging three and 21 days were evaluated. In experiment 2, cartilaginous epiphyses of femurs from newborn Wistar rats were cultured with and without caffeine for 0, 7, 14 and 21 days. The cartilages were subjected to morphometric analysis, immunohistochemical, Tunel technique and RT-PCR in real time. The means were compared by SNK. In experiment 1, it was concluded that caffeine inhibits endochondral bone growth; the effects of caffeine are more damaging in rats three days old, causing degeneration and death of chondroblast and that high doses of caffeine (100 mg / Kg) increase levels of plasma cortisol from mother rats, which is associated with more severe changes of the cartilage tissue of the offspring. It was concluded in experiment 2, that caffeine increases apoptosis in vitro, but at the same time, prevents the decrease of proliferative index and increased expression of cell differentiation gene transcripts represented by Sox-9, and by Runx-2.

Keywords: caffeine, cartilage, proliferation, differentiation, apoptosis, rats

## **Introdução**

A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) é um alcalóide natural e farmacologicamente ativo presente em cafés, chás, refrigerantes, energéticos, chocolates e alimentos a base de cacau e medicamentos, sendo, portanto, amplamente consumida na dieta humana (Dews, 1982; Barone e Roberts, 1996; Reissig et al., 2009; Heckman et al., 2010). Apesar de existir alguns efeitos benéficos da cafeína, há vários relatos dos seus efeitos adversos no organismo (Nakamoto et al., 1989; Wink et al., 1996; Duarte et al., 2009; Heckman et al., 2010; Liu et al., 2011). No entanto, a despeito disso, a gênese das alterações causadas pela cafeína, particularmente sobre o osso, tem sido pouco elucidada, particularmente no que concerne ao seu efeito sobre a formação e o crescimento ósseos.

Estudos prévios têm demonstrado que a cafeína causa alterações nos ossos de fetos e de ratos jovens. Em fetos de ratas tratadas com doses muito elevadas de cafeína, têm sido observadas alterações teratogênicas como a palatosquise, malformações de membros e a ectrodactilia (Scott, 1983; Narod et al., 1991) e redução do conteúdo mineral ósseo (Nakamoto et al., 1989). A dose capaz de causar malformação fetal em modelos animais excede muito àquela consumida diariamente pela população humana, mas tendo como base somente uma estimativa da quantidade consumida em cafés e chás. Postula-se que, por isso, a maioria dos estudos epidemiológicos demonstra não haver evidências de que a cafeína cause malformações congênitas em seres humanos (Larroque et al., 1993). No entanto, a maioria dos casos de malformações congênitas em seres humanos ocorre sem o conhecimento dos reais fatores etiológicos (Scott, 1983; Nakamoto et al., 1989; Narod et al., 1991; Larroque et al., 1993).

Em ratos jovens, altas doses de cafeína inibem o crescimento ósseo endocondral (Huang et al., 2002), uma vez que fragmentos de osso desmineralizado implantados no subcutâneo, de ratos em crescimento tratados com cafeína, apresentaram inibição da condrogênese e redução da expressão de colágeno II, histona e TGF beta (Barone et al., 1993). Acredita-se que um dos mecanismos de ação da cafeína sobre o crescimento ósseo seja por inibir as fases iniciais da proliferação e da diferenciação das células mesenquimais em células cartilagenosas (Barone et al., 1993). Entretanto, ainda pouco se conhece sobre os efeitos e mecanismos pelos quais a cafeína atua sobre as cartilagens de animais em crescimento.

Estudos demonstram que ratos jovens, com rápido crescimento e que tiveram sua dieta suplementada com 20% de cafeína apresentaram alterações do tecido ósseo semelhantes aquelas que ocorrem com o envelhecimento, apresentando área óssea transversal menor com menor número de osteócitos. Neste estudo, não foi feita menção aos efeitos da cafeína sobre o tecido cartilagenoso (Sasahara et al., 1994; Wink et al., 1996). Esses autores sugerem que as alterações ósseas observadas se devem à redução de alguns minerais, tais como zinco e cobre, que são importantes para a atividade osteoblástica e para a síntese de colágeno, além da redução dos níveis de cálcio, essencial para a mineralização óssea (Heaney e Reeker, 1982; Sasahara et al., 1994; Wink et al., 1996; Huang et al., 2002).

Há mais estudos sobre o efeito da cafeína no tecido ósseo do que sobre a cartilagem. No osteoblasto, a cafeína atua negativamente, reduzindo a viabilidade celular e aumentando a apoptose dessa célula (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010). Além disso, a adição de cafeína em culturas de

osteoblastos diminui a síntese protéica e a expressão de genes como o colágeno, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina, histona e Cbfa1/Runx-2 (Tassinari et al., 1991; Zhou et al., 2010). Pesquisas recentes sugerem que a cafeína pode atuar também nos osteoclastos, onde concentrações pequenas desse alcalóide (0,005-0,1mM) estimulam a osteoclastogênese, sem alterar a viabilidade e a atividade da fosfatase alcalina durante a diferenciação osteoblástica (Liu et al., 2011). Devido a esses efeitos no osso, a cafeína é considerada um fator de risco para a osteoporose e para a doença periodontal (Kamagata-Kiyoura et al., 1999). No entanto, embora, existam vários estudos que analisaram os efeitos *in vitro* da cafeína sobre as células ósseas, ainda há carência de informações sobre os efeitos *in vitro* desse alcalóide nas células cartilaginosa de indivíduos em crescimento.

## Objetivos

- Avaliar por histomorfometria a formação óssea endocondral em ratos de 3 dias de idade, filhotes de mães tratadas com diferentes doses de cafeína durante a gestação e lactação (experimento 1).
- Avaliar por histomorfometria o crescimento ósseo endocondral de ratos após o desmame, filhotes de mães tratadas com diferentes doses de cafeína durante a gestação e lactação (experimento 1).
- Dosar os níveis plasmáticos de cortisol de ratas tratadas com cafeína e correlacioná-los com as alterações ósseas observadas nos filhotes (experimento 1).
- Avaliar a morfologia e quantificar as taxas de proliferação e apoptose

celular no tecido cartilaginoso mantido em meio de cultura acrescido de cafeína por até 21 dias (experimento 2).

- Quantificar os transcriptos gênicos para *caspase-3*, *Runx-2* e *Sox-9* pela técnica RT-PCR em tempo real no tecido cartilaginoso mantido em meio de cultura acrescido de cafeína por até 21 dias (experimento 2).

## Revisão de literatura

### 1. Sistema esquelético

O sistema esquelético não somente cumpre funções mecânicas, de suporte e proteção como também controla a homeostasia sérica dos níveis de cálcio. Durante o desenvolvimento do esqueleto, ainda no interior do útero materno, a proliferação, diferenciação, sobrevivência e organização celular são processos fundamentais (Crombrugge et al., 2001, Koedam et al., 2002; Ballock e O'Keefe, 2004; Nilsson et al., 2005; Yang, 2009).

O sistema esquelético é derivado do mesoderma e sua formação se inicia com a condensação mesenquimal das células precursoras esqueléticas também conhecidas como células progenitoras osteocondrais que dão origem a condrócitos para formar a cartilagem no processo de ossificação endocondral ou originam osteoblastos para formar osso durante o processo de ossificação intramembranosa (formação óssea intramembranosa) (Vaes et al., 2006; Yang, 2009).

A ossificação endocondral é um processo de formação óssea que ocorre a partir de um modelo cartilaginoso e, por isso, também é conhecida como formação óssea endocondral. Esse processo de formação óssea ocorre nos ossos dos membros, costelas, vértebras, mandíbula, maxila e nos



ossos da base do crânio (Schipani e Provot, 2003; Yu e Ornitz, 2007; Belluoccio et al, 2008; Horton e Degrin, 2009), enquanto que a formação óssea intramembranosa ocorre nos ossos chatos do crânio (Ornitz e Marie, 2002; Horton e Degrin, 2009).

O objetivo desta revisão é descrever a morfogênese do sistema esquelético com ênfase na formação e no crescimento ósseo endocondral.

### ***1.1 Morfogênese do esqueleto axial***

A morfogênese do esqueleto axial inicia-se com a condensação do mesoderma lateral à notocorda e ao tubo neural, para formar duas colunas longitudinais de mesoderma paraxial. Essas colunas de mesoderma chamadas pré-somíticas (PSM) se dividem em segmentos curtos que se estendem ao longo da superfície dorso-lateral do embrião, denominados somitos que são precursores dos segmentos da coluna vertebral (Keynes e Stern, 1988; Tuan et al., 1998; Davis e Turner, 2001; Pourquie, 2002; Oate et al., 2012).

O somito divide-se em duas partes, ou seja, no esclerótomo que forma o esqueleto axial e as costelas, e no dermiótomo que forma os mioblastos e a derme. Esse processo é chamado de somitogênese e é controlado pelas vias de sinalização mediadas pelo Sonic hedgehog (shh) e pelo fator de transcrição Pax-1 para induzir a formação do esclerótomo e pela via de sinalização Wnt da ectoderme de superfície e do tubo neural dorsal para a formação do dermiótomo (Keynes e Stern, 1988; Tuan et al., 1998; Yang, 2009; Oate et al., 2012).

O mecanismo da somitogênese está ligado a um oscilador molecular responsável pela segmentação e aos gradientes de moléculas sinalizadoras dentro do mesoderma pré-somítico. A segmentação ocorre pela expressão cíclica de genes, sendo que a

maioria são Componentes das vias de sinalização Wnt e Notch-Delta, sendo codificados por membros da família Hes e Lunatic fringes, dentre outros (Pourquie, 2002; Robertis, 2008; Yang, 2009; Oates et al., 2012).

Além dessas vias, o fator de crescimento fibroblástico e o ácido retinóico também controlam a somitogênese por regularem as células do mesoderma pré-somítico que sofrem segmentação (Robertis, 2008; Yang, 2009). O FGF-8 é expresso em níveis elevados dentro do mesoderma pré-somítico na extremidade caudal, exercendo função de manutenção das células mesenquimais indiferenciadas. Enquanto que a expressão do Raldh2, um gene essencial para a síntese do ácido retinóico, é maior em somitos recém formados e menor na extremidade rostral do mesoderma pré-somítico, exercendo função na manutenção da assimetria direita-esquerda da segmentação. Portanto o FGF-8 e o ácido retinóico agem formando dois gradientes opostos dentro do mesoderma pré-somítico (Yang, 2009, Oates et al., 2012).

A somitogênese é um processo preciso e sincronizado, portanto qualquer anormalidade no processo de segmentação vertebral é suficiente para causar malformações vertebrais. (Zelzer e Olsen, 2003; Shifley e Cole, 2007; Turnpenny, et al., 2007, Yang, 2009; Oates et al., 2012).

### ***1.2 Morfogênese do esqueleto apendicular***

A morfogênese do esqueleto apendicular inicia-se a partir da formação de moldes constituídos por uma massa de mesênquima recoberta por ectoderme, onde se localizam os centros de sinalização que direcionam o crescimento em três dimensões: próximo-distal, dorso-ventral e anterior-posterior (Johnson e Tabin, 1997; Tung et al., 1998; Al-Qattan et al., 2009).

Os moldes dos membros alongam-se através da proliferação do mesênquima, estimulando primeiro as células do mesoderma da placa lateral, que por sua vez estimula o ectodermo mais distal do primórdio, promovendo assim o crescimento das extremidades, sendo que o desenvolvimento dos membros torácicos precede o dos membros pélvicos (Abarca-Buis et al., 2006, Hidaka e Goldring, 2008, Al-Qattan et al., 2009).

As extremidades se formam em sítios bem precisos, estabelecendo padrões espaciais e em igual número; duas extremidades torácicas e duas extremidades pélvicas sempre opostas uma a outra com relação à linha média do embrião, em uma posição adjacente a um determinado somito, de acordo com a espécie animal (Abarca-Buis et al., 2006, Hidaka e Goldring, 2008).

Em primeiro lugar se forma o elemento do estilópodo (úmero/fêmur), então o primórdio da cartilagem se bifurca para formar o zeugópodo (rádio-ulna/tíbia-fíbula) e finalmente se ramifica para formar o autópodo (carpos/tarsos) (Oster et al., 1988; Abarca-Buis et al., 2006).

A expressão de moléculas de sinalização específicas é que determina a formação do membro torácico ou pélvico na localização correta e funcional do embrião. Em ratos, o fator de transcrição Tbx 5 induz a expressão do gene Wnt2b e do fator de crescimento fibrolástico (FGF-8) no mesodermo intermediário e na placa lateral do mesoderma, especificamente no molde da extremidade torácica. Já o wnt8c, se expressa na placa lateral do mesoderma da extremidade pélvica (Church e Francis-West, 2002; Chen e Deng, 2005).

Ambas as sinalizações induzem a expressão do gene FGF-10 que somado ao FGF-8 resulta na formação da crista ectodérmica apical, cuja função é exercer influência indutora sobre o mesênquima, pela

expressão de moléculas como FGFs e shh, promovendo o seu desenvolvimento e crescimento, formando músculos e o modelo cartilaginoso do osso (Johnson e Tabin, 1997; Chen e Deng, 2005; Abarca-Buis et al., 2006; Al-Qattan et al., 2009; Yang, 2009).

A crista ectodérmica apical (AER) direciona o crescimento e estabelece a polaridade próximo-distal da extremidade mediante a expressão de inúmeros genes. No entanto, somente os fatores pertencentes a família FGF, ressaltando-se FGF-4 e FGF-8, são capazes de resgatar o crescimento da extremidade quando a AER é eliminada (Johnson e Tabin, 1997; Abarca-Buis et al., 2006; Al-Qattan et al., 2009).

A polaridade dorso-ventral dos membros na embriogênese é controlada pela ectoderme, sendo que o gene que se expressa na ectoderme dorsal e que irá definir esta polaridade é o wnt7a (Abarca-Buis et al., 2006). Na ectoderme ventral há expressão do gene Engrailed-1 (En1), e do receptor tipo 1a das BMP (Bmpr1a) que definirão a polaridade ventral. A inativação de qualquer um desses genes ou receptor pode resultar em inversão da polaridade resultando em extremidades bi-ventrais ou bi-dorsais (Johnson e Tabin, 1997; Abarca-Buis et al., 2006).

A polaridade ântero-posterior do membro é estabelecida por uma zona do mesoderma com atividade polarizante (ZPA) localizada na região posterior das extremidades embrionárias dos vertebrados. O Sonic hedgehog (Shh) é um gene envolvido no controle desta polaridade, já que ao implantar células que expressam Shh na região anterior do primórdio se induz a duplicação do autópodo da mesma maneira que ao transplantar a ZPA (Johnson e Tabin, 1997; Abarca-Buis et al., 2006; Al-Qattan et al., 2009).

Os três centros sinalizadores (crista ectodérmica apical, ectoderma e zona do mesoderma polarizante) estão completamente inter-relacionados, sendo que qualquer disfunção individual culmina em alterações na anatomia das extremidades. Dessa forma, o crescimento no eixo próximo-distal está sob a influência dos FGFs presentes na AER. O eixo dorso-ventral está sob a influência do Wnt7a do ectoderma dorsal e do En1 e do Bmpr1a presentes no ectodermo ventral e finalmente o Shh na zona do mesoderma com atividade polarizante controla o eixo ântero-posterior (Johnson e Tabin, 1997; Church e Francis-West, 2002; Abarca-Buis et al., 2006; Al-Qattan et al., 2009).

Com relação à formação dos dígitos, a cartilagem não se forma como uma massa amorfa, e sim prefigurando as diferentes falanges. No espaço interdigital existe um tecido que não forma cartilagem, mas é capaz de responder a fatores condrogênicos da família TGF-beta, antes de receber os sinais de morte celular responsáveis por permitir a regressão do tecido interdigital. Portanto, deve existir um equilíbrio entre os sinais promotores da apoptose e da diferenciação que devem ser coordenados durante a formação dos dedos e do espaço interdigital. Qualquer desarmonia entre essas estruturas pode resultar em alterações dos dedos como a sindactilia, a polidactilia, e a braquidactilia, dentre outras (Merino et al., 1999; Zelzer e Olsen, 2003; Abarca-Buis et al., 2006; Lorda-Diez et al., 2011).

### ***1.3 Formação óssea endocondral***

Durante a embriogênese, no início da formação óssea endocondral, as células mesenquimais primeiro sofrem condensação pela interação célula-célula, célula-matriz, pela expressão de moléculas de adesão, formação de *gap* junção e síntese das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), no

centro de áreas do embrião destinadas à formação óssea (Vortkamp et al., 1998; Hall and Miyake 2000; Tsumaki e Yoshikawa, 2005; Goldring, 2006; Shapiro, 2008; Horton e Degnin, 2009; Yang, 2009).

No centro dessas áreas, células progenitoras osteocondrais em condensação se diferenciam em condroblastos sob estímulo de moléculas da família TGF-beta e das vias de sinalização WNT (Leboy, 2006; Yang, 2009). As células da periferia dessa área condensada formam um tecido conjuntivo firmemente aderido chamado de pericôndrio, que circunda a cartilagem, que ainda será formada, exercendo função de nutrição, oxigenação, além de ser fonte de novas células cartilaginosas (Vortkamp, et al., 1998; Kronenberg, 2003; Goldring, 2006).

Os condroblastos se proliferam e expressam fatores de transcrição como o Sox-9 que ativam genes alvos nas células condrogênicas, resultando em secreção de matriz extracelular rica em colágeno II, IX, XI além de proteoglicanos Aggrecan para formar um molde de cartilagem que antecede o esqueleto ósseo. A expressão de Sox-9, que é um marcador da diferenciação condrogênica, é a primeira evidência de desenvolvimento endocondral (Kronenberg, 2003; Tsumaki e Yoshikawa, 2005; Abarca-Buis et al., 2006; Horton e Degnin, 2009).

No molde de cartilagem, por meio de estímulos gerados pelo fator de transcrição Runx-2, os condrócitos tornam-se hipertróficos e sintetizam uma matriz extracelular rica em colágeno X, característico da zona de hipertrofia (Vortkamp, et al., 1998; Crombrughe et al., 2001; Kroneberg, 2006; Vaes et al., 2006; Horton e Degnin, 2009).

As vias de diferenciação dos condroblastos e osteoblastos estão interconectadas durante a formação óssea endocondral e devem ser coordenadas. Fatores de transcrição controlam a diferenciação de condroblastos e osteoblastos e moléculas sinalizadoras

coordenam importantes etapas da formação óssea endocondral (Crombrugge et al., 2001; Belluoccio, et al., 2008).

A diferenciação em condrócitos hipertróficos é acompanhada pela diferenciação das células mesenquimais do pericôndrio em osteoblastos. Esses osteoblastos formam um colar ósseo, que envolve a região hipertrófica de cartilagem (Vortkamp et al., 1998; Goldring, 2006; Vaes et al, 2006).

Moléculas sinalizadoras, receptores transmembranas, fatores de transcrição e proteínas da matriz extracelular incluindo Indian hedgehog (Ihh) e seu receptor patched (Ptc), FGFs e seu receptor (FGFR), fator de transcrição da família Gli, peptídeo relacionada ao paratormônio (PTHrP) e as BMPs também estabelecem elos essenciais para o processo de maturação de condrócitos (Vortkamp et al., 1998; Crombrugge et al., 2001; Miao et al., 2004; Goldring, 2006; Kronenberg, 2006; Hung et al., 2007; Belluoccio, et al., 2008; Horton e Degnin, 2009).

Quando os condroblastos passam da fase proliferativa para a hipertrófica, eles se tornam repletos de retículo endoplasmático rugoso, complexos de golgi e de vesículas secretoras e produzem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteinases, dentre outros fatores. Esses fatores facilitam a invasão da cartilagem por vasos sanguíneos, osteoblastos, osteoclastos e células hematopoéticas, o que resulta na formação do centro de ossificação primário na diáfise de ossos longos (Leach e Gay, 1987; Vortkamp et al., 1998; Crombrugge et al., 2001; Koedam et al., 2002; Horton e Degnin, 2009).

Em seguida, a matriz da cartilagem hipertrófica é degradada, os condrócitos hipertróficos morrem e a cartilagem vai sendo substituída por osso (Kronenberg, 2003; Tsumaki e Yoshikawa, 2005; Yang,

2009). Mais tardiamente, formam-se os centros de ossificação secundários que darão origem às epífises (Horton e Begnin, 2009).

#### **1.4 Crescimento ósseo endocondral**

Ao nascimento, na maioria das espécies animais, quase todo o modelo cartilaginoso já foi substituído por tecido ósseo, com exceção da cartilagem articular, que permanece em cada extremidade do osso e da placa epifisária, que se localiza entre a epífise e a diáfise, a partir das quais ocorre o crescimento ósseo endocondral (Pines e Hurwitz, 1991; Shapiro, 2008).

A placa de crescimento ou placa epifisária consiste de matriz extracelular e de condroblastos que sofrem uma série de complexas mudanças moleculares, bioquímicas e morfológicas durante o processo de diferenciação. Esses diferentes estágios de diferenciação e maturação celulares aparecem como zonas que podem ser divididas em: zona de repouso, zona proliferativa e zona hipertrófica (Ballock e O'Keefe, 2003; Nilsson et al., 2005; Belluoccio et al., 2008; Horton e Degnin, 2009).

Os condroblastos sofrem proliferação unidirecional que resulta em colunas paralelas de células em divisão, e ao final do ciclo celular, tornam-se hipertróficos, sofrem apoptose, e são invadidos por vasos sanguíneos e células ósseas que sintetizam matriz óssea. Esse novo osso gerado a partir das placas de crescimento permite o crescimento ósseo longitudinal (Leach e Gay, 1987; Crombrugge et al., 2001, Koedam et al., 2002; Ballock e O'Keefe, 2003; Nilsson et al., 2005).

O controle do crescimento longitudinal se dá pela íntima interação de hormônios sistêmicos e de fatores de crescimento peptídeos locais, tais como o hormônio de crescimento, os hormônios da tireóide, os

glicocorticóides, o estrógeno, os andrógenos, o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-I), os metabólitos da vitamina D e a leptina. Estes hormônios e fatores agem direta ou indiretamente por meio da modulação de outros sinais endócrinos que controlam a transição entre a proliferação e a hipertrofia que é requerida para completar o processo de maturação, o que provoca uma série de mudanças na expressão gênica dos condrocitos da placa de crescimento (Pines e Hurwitz, 1991; Orth, 1999; Robson et al., 2002; Ballock e O'Keefe, 2003; Eerden et al., 2003; Nilsson et al., 2005; Shapiro e Forriol, 2005).

O hormônio de crescimento influencia o crescimento longitudinal pela diferenciação das células precursoras da placa de crescimento estimulando a produção local e o aumento de células responsivas ao IGF-I (Pines e Hurwitz, 1991; Nilsson et al, 2005), que por sua vez estimula a proliferação celular (Nilsson et al, 2005). Os glicocorticóides inibem a proliferação dos condroblastos, e o fator de crescimento endotelial vascular induz a apoptose dos mesmos (Robson et al., 2002; Koedam et al, 2002; Nilsson et al, 2005). Assim como os glicocorticóides, o estrógeno também inibe a proliferação celular. Em exposição precoce, acelera a maturação do esqueleto, causando o desaparecimento da placa e a fusão prematura da epífise com a metáfise óssea (Pines e Hurwitz, 1991; Weiser et al., 2001; Nilsson et al, 2005). Ao contrário, o andrógeno estimula a proliferação, a síntese de matriz e o aumento da expressão de IGF-I (Nilsson et al, 2005). A triiodotironina, a leptina e a vitamina D são necessários para maturação e crescimento esquelético normal estimulando a diferenciação das células da placa de crescimento (Pines e Hurwitz, 1991; Nilsson et al, 2005).

Algumas moléculas que controlam a ossificação endocondral também são expressas durante o crescimento ósseo pós-natal, sugerindo que esses processos sejam

controlados por fatores similares. O paratormônio (PTH), o peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP), e os receptores PTH/PTHrP, associados ao Indian hedgehog (Ihh) e ao FGF, têm demonstrado papel fundamental destas proteínas no controle da proliferação e da diferenciação dos condroblastos e na gradativa substituição da cartilagem por tecido ósseo (Vortkamp et al., 1998; Schipani e Provot, 2003; Kronenberg, 2006; Horton e Degenin, 2009; Goltzman, 2010).

Ao atingir a maturidade sexual, por influência hormonal, a taxa de crescimento ósseo longitudinal diminui, levando a mudanças estruturais na epífise com declínio da proliferação e da hipertrofia das células das cartilagens de crescimento (Pines e Hurwitz, 1991; Ballock e O'Keefe, 2003).

Portanto, as interações dos hormônios com os fatores de crescimento locais e as vias de sinalização influenciam tanto na formação óssea endocondral, como na taxa de crescimento e declínio que culmina com o desaparecimento da placa ao final da maturidade sexual, resultando em fusão da epífise com a metáfise (Pines e Hurwitz, 1991; Ballock e O'Keefe, 2003; Shapiro e Forriol, 2005; Horton e Degenin, 2009).

### ***1.5 Genes e fatores que influenciam a formação e o crescimento ósseo endocondral***

Muito progresso tem sido alcançado para a compreensão da biologia molecular da cartilagem de crescimento e da formação óssea. Isto inclui a identificação de fatores de transcrição chaves para o controle das vias de diferenciação dos condroblastos e dos osteoblastos, revelando a função crítica de moléculas sinalizadoras que coordenam e controlam estas vias (Hidaka e Goldring, 2008; Lorda-Diez et al., 2011). Além disso, os componentes da matriz extracelular, bem como várias outras proteínas envolvidas na

sinalização, na remodelação da matriz, no transporte de moléculas e no controle de genes também têm funções críticas para a formação e o crescimento ósseo endocondral (Crombrughe et al., 2001; Lorda-Diez et al., 2011).

### **1.5.1 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)**

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são membros da superfamília do fator de crescimento transformador  $\beta$ - (TGF- $\beta$ ), que inclui as famílias de TGFs e BMPs, ativinas e inibinas que desempenham função importante nas formações cartilaginosa e óssea (Lyons et al., 1990; Vortkamp, 1997; Sykaras e Opperman, 2003; Shen et al., 2004; Tsumaki, et al., 2005; Shen et al., 2009).

Baseados em sequências similares, os membros da família BMPs são agrupados em várias classes incluindo a subfamília dos fatores de diferenciação e crescimento (GDF). Além disso, os antagonistas BMPs também têm sido identificados, tais como: Noggin, chordin, chordin-like, follistatin, dentre outros (Vortkamp, 1997; Francis-West, 1999; Canalis et al., 2003; Tsumaki, et al., 2005).

Estudos genéticos sobre o desenvolvimento do esqueleto sugerem que as BMPs sejam indutoras mesodérmicas devido à sua capacidade de induzir a formação óssea endocondral regulando importantes eventos do processo de formação do osso durante a embriogênese. Mas elas também atuam no crescimento ósseo pós-natal, na remodelação e no reparo ósseo (Urist, 1997; Enomoto-Iwamoto, 1998; Murtaugh et al., 1999; Zhao et al., 2002; Tsumaki, et al., 2005; Shen et al., 2009; Suutre et al., 2010).

Essas proteínas agem por meio de mecanismos autócrinos ou parácrinos, ligando-se a receptores da superfície celular.

Os sinais gerados são transduzidos intracelularmente por proteínas SMAD iniciando uma sequência de eventos que têm efeitos sobre vários tipos de células, além de atuar sobre o recrutamento de células-tronco de tecidos circundantes comprometidas para diferenciação osteogênica (Sykaras and Opperman, 2003; Tsumaki, et al., 2005; Shen et al., 2009; Suutre et al., 2010). Portanto as BMPs atuam na diferenciação das células mesenquimais osteoprogenitoras, influenciando direta ou indiretamente a expressão de citocinas e fatores de crescimento que também atuam neste processo (Wozney, 1992).

As BMPs têm sido identificadas nas áreas de condensações das células mesenquimais, encontradas no início da formação óssea endocondral, antes de formar o modelo cartilaginoso, onde regulam a forma e o tamanho dessas áreas de condensação (Duprez et al., 1996; Urist, 1997; Vortkamp, 1997; Tsumaki, et al., 2005).

Além disso, as BMPs também podem afetar a proliferação dos condroblastos e consequentemente comprometer a formação óssea (Wozney, 1992; Peris et al., 1996; Tsumaki, et al., 2005; Kugimiya et al., 2006). Mas, sua expressão também está associada com a maturação de condrócitos da placa de crescimento e da cartilagem articular, o que lhes conferem a possibilidade de desempenhar função importante na diferenciação, maturação e apoptose de condrócitos (Andreson et al., 2000; Tsumaki, et al., 2005). As BMPs atuam de forma diferenciada de acordo com a sua concentração, ou seja, em níveis baixos, elas estimulam a proliferação celular, enquanto que em níveis elevados podem promover a diferenciação (Urist, 1997).

As BMPs também têm sido implicadas em atuar no estabelecimento do eixo do corpo dorso-ventral, na assimetria esquerda-direita, e na somitogênese. Portanto, mudanças

bruscas de gradientes de concentração de BMP podem culminar com malformações do esqueleto axial, sendo possível estabelecer uma ligação entre a expressão de BMP e desenvolvimento do esqueleto axial (Vortkamp A. 1997; Urist, 1997; Murtaugh et al., 1999).

A geração de camundongos mutantes por inativação gênica é uma ferramenta útil para analisar o papel de genes específicos durante o desenvolvimento. A inativação da BMP-2 e da BMP-4 em camundongos resulta em morte nos primeiros estágios da gestação, mostrando a importância da expressão das BMPs em embriões após sua implantação, nos primeiros estágios da gestação (Vortkamp, 1997; Tsumaki, et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2006).

Ratos mutantes com perda de função de outras BMPs como a BMP-7, o GDF-5 ou de seus receptores como o BMPRIa e o BMPRIb, quando viáveis, exibem malformações esqueléticas, como a polidactilia em combinação com defeitos das costelas e do esterno (Tsumaki, et al., 2005). E quando ocorre aumento dos antagonistas das BMPs como do noggin, ocorre inibição da condrogênese do membro por bloquear a diferenciação dos condroblastos e dos osteoblastos (Francis-West, 1999; Tsumaki, et al., 2005; Yoon et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2006; Leboy, 2006). Quando há ganho de função com acréscimo de BMP-2, BMP-4 e do GDF-5, ocorre expansão da cartilagem do membro e comprometimento da diferenciação dos condroblastos (Duprez et al., 1996; Francis-west et al., 1999). Da mesma forma, no caso de inativação do noggin ocorre superexpressão de BMP com expansão da cartilagem e ausência de formação da articulação (Duprez et al., 1996; Tsumaki, et al., 2005).

### **1.5.2 Fator de transcrição Sox-9**

O Sox-9 é um membro da família dos fatores de transcrição Sox, que se caracteriza por ser um grupo de alta mobilidade (HMG-

box) de domínio de ligação de DNA, cuja sequência possui alto grau de homologia com a do fator de determinação sexual SRY (Prior e Walter, 1996; Combrugghe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Kawakami et al., 2006).

O Sox-9 é expresso em todas as células condroprogenitoras e em condrócitos, exceto em condrócitos hipertróficos e em osteoblastos (Zhao et al., 1997; Kawakami et al., 2006). Em humanos, mutações heterozigotas neste gene estão associadas com a malformação esquelética conhecida como displasia campomélica que é uma doença rara caracterizada por uma associação variável de anormalidades esqueléticas (Meyer et al., 1997).

Durante a formação óssea endocondral, a expressão de Sox-9 é essencial em várias etapas sucessivas da diferenciação das células condroprogenitoras via ativação ou repressão transcricional (Leung et al., 2011). Portanto o Sox-9 age como um regulador máster da diferenciação condrogênica (Akiyama et al., 2002; Oh et al., 2010). Na condensação mesenquimal, o Sox-9 age no controle de genes de proteínas de superfície celular que são necessários para a agregação das células mesenquimais. Nesta fase, o Sox-9 também controla moléculas antiapoptóticas tais como o noggin e o Chordin que inibem os sinais responsáveis pela formação dos espaços interdigitais (Combrugghe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Ikeda et al., 2005).

Portanto, o Sox-9 é necessário desde a diferenciação das células progenitoras em condroblastos, até a proliferação destas células e o estabelecimento de colunas paralelas na placa de crescimento. Nas etapas sequenciais, o Sox-9 associado a outros fatores como o PTHrP inibe a transição de condrócitos para condrócitos

hipertróficos, controlando a ossificação endocondral subsequente (Huang et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Leung et al., 2011). Em contrapartida, os hormônios da tireóide agem regulando a expressão de Sox-9 e inibindo sua ação (Okubo e Reddi, 2003).

Outros dois membros da família Sox, o L-Sox-5 e o Sox-6 são co-expressos com o Sox-9 durante a condrogênese, sendo necessários principalmente após a condensação mesenquimal, para a ativação de genes de marcadores fenotípicos da matriz da cartilagem como Col2a1, o Col11a2 e o Aggrecan, além de serem necessários para manter condroblastos em proliferação para formar a zona colunar da placa de crescimento (Zhao et al., 1997; Ng et al., 1997; Bridgewater et al., 1998; Lefebvre et al., 1998; Crombrughe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Smits et al., 2004; Ikeda et al., 2005; Han e Lefebvre, 2008).

Outros fatores parecem exercer influência sobre o Sox-9, pois a inativação de receptores BMP1a e BMP1b em ratos resulta em ausência da expressão de Sox-9, indicando que a sinalização BMP regula sua expressão (Crombrughe et al., 2001; Yoon et al., 2005).

Em pesquisas, onde os precursores de condrócitos hipertróficos apresentam insuficiência de expressão de Sox-9, ocorre mineralização esquelética prematura e as zonas hipertróficas ficam expandidas (Crombrughe et al., 2001), além de resultar na perda da expressão de outros genes como Sox-5 e o Sox-6 (Smits et al 2001). No entanto, estudos com deleção gênica têm demonstrado que a inativação do Sox-9 em brotos iniciais dos membros, antes das condensações mesenquimais, produz membros curtos e deformados, devido a não ocorrência de condensações mesenquimais e a incapacidade da expressão de marcadores condrogênicos, resultando em ausência

completa de cartilagem e osso. Além disso, a inativação do Sox-9 antes das condensações mesenquimais impede a síntese de transcritos para Runx-2, que é normalmente expresso em fases tardias das condensações e é necessário para a diferenciação dos osteoblastos (Akiyama et al., 2002). No entanto, se o Sox-9 for inativado após a formação das condensações mesenquimais, a expressão de Runx-2 e a diferenciação osteogênica ocorre, mas os fetos exibem uma condrodysplasia generalizada grave (Akiyama et al., 2002). Assim, o Sox-9 é necessário para estabelecer células osteocondroprogenitoras que irão se diferenciar tanto em condroblastos quanto em osteoblastos (Akiyama et al., 2002).

A inativação do Sox-9 também pode induzir apoptose no mesênquima do membro, com aumento da expressão de Bax e de caspase-3 clivada, o que indica que o Sox-9 regula a sobrevivência celular do mesênquima de brotos dos membros, pela supressão da apoptose (Crombrughe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Ikeda et al., 2005).

Ratos mutantes com supressão dos genes co-expressos com Sox-9, ou seja, Sox-5 ou Sox-6 nascem com anomalias esqueléticas relativamente discretas. Em contraste, fetos com supressão dupla de Sox-5 e Sox-6 morrem no útero com defeitos muito graves na formação da cartilagem (Smits et al 2001; Smits et al., 2004). Nos fetos com supressão dupla de Sox-5 e Sox-6, a expressão de Col-2a1, de Col-9a2 e de Aggrecan é drasticamente reduzida e os genes para os marcadores de condroblastos em proliferação, tais como o Matrilin-1, Comp e Epipican que praticamente não são expressos. Além disso, a organização celular característica das placas de crescimento não se forma nestes mutantes. Com efeito, as células da condensação do mesênquima retomam a proliferação somente após um longo atraso e se diferenciam precocemente



em condrócitos hipertróficos, levando à uma formação óssea anormal (Ng et al., 1997; Smits et al 2001).

### **1.5.3 Fator de transcrição Runx-2**

O fator de transcrição Runx-2 (Cbfa1/Osf2/Pebp2 $\alpha$ A), pertencente à família Runt é expresso em osteoblastos (Ducy et al., 1997), mas também em condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos (Kim et al., 1999; Takeda et al., 2001; Vaes et al., 2006), sendo que há três isoformas do cbfa1 (I, II e III) (Harada et al., 1999; Banerjee et al., 2001; Yoshida et al., 2004).

A expressão de cbfa1 inicia-se nas condensações mesenquimais do esqueleto em desenvolvimento, sendo regulada pela BMP-7 e pela vitamina D3 (Ducy et al., 1997).

A identificação de genes que são regulados pela atividade transcricional do Runx-2 *in vivo* e *in vitro* tem sido descrita nos últimos anos. Estes genes pertencem principalmente ao grupo das proteínas da matriz extracelular, tais como a osteocalcina, a sialoproteína, a osteopontina, e o colágeno, bem como os fatores de crescimento e seus receptores como a osteoprotegerina e o fator transformador de crescimento (TGF), dentre outros (Ducy et al., 1997; Javed et al., 2001; Kern et al., 2001; Stock et al., 2004; Takagi et al., 2004; Vaes et al., 2006).

O Runx-2 é necessário para a diferenciação das células progenitoras em osteoblastos (diferenciação osteogênica), uma vez que ratos homozigóticos para a mutação do gene Cbfa1 morrem após o nascimento apresentando nanismo, membros curtos e ausência de formações óssea endocondral e intramembranosa, devido a interrupção nas diferenciações osteogênica e condrogênica (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Já os ratos heterozigóticos para a mutação do gene

Cbfa1 são viáveis e apresentam uma série de alterações ósseas como hipoplasia de clavículas e dos ossos nasal, frontal, parietal, interparietal e supraoccipital que são alterações semelhantes às observadas na displasia cleidocraniana (CCD) que ocorre em humanos (Otto et al., 1997; Komori et al., 1997).

Durante o desenvolvimento do esqueleto, o Runx-2 age como um regulador da maturação de condrócitos (Vaes et al., 2006). Fetos Runx-2 (-/-) apresentam ausência de condrócitos hipertróficos nos ossos proximais (úmero e fêmur) e efeitos menos graves nos ossos distais (rádio, ulna, tíbia e fíbula) (Kim et al., 1999; Inada et al., 1999). A relação direta do

Runx-2 com a hipertrofia de condrócitos tem sido evidenciada por meio de estudos com camundongos transgênicos. A super expressão de Runx-2 causa maturação prematura de condrócitos, enquanto que a deleção de Runx-2 inibe a hipertrofia de condrócitos. No entanto, ambos os tipos de camundongos transgênicos desenvolvem nanismo e malformações esqueléticas (Ueta et al., 2001; Takeda et al., 2002).

Portanto, o Runx-2 tem duas funções distintas na formação óssea tanto endocondral, quanto intramembranosa, sendo uma delas essencial para a diferenciação de células progenitoras mesenquimais em osteoblastos e a outra função importante para estimular a diferenciação para condrócitos hipertróficos (Crombrughe et al., 2001). Mas, apesar do Runx-2 ser essencial na via condrogênica e osteogênica, sua ação isolada não é suficiente para desencadear estes processos, sendo crucial sua interação com outros fatores locais, tais como as BMPs e o Ihh (Yamaguchi et al., 2000; Yoshida et al., 2004).

### **1.5.4 PTHrP e Ihh**

O peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) é um fator parácrino que é sintetizado por uma variedade de células adultas e embrionárias, incluindo osteoblastos e condroblastos (Karaplis et al., 1998; Shipani e Provot, 2003). O receptor de PTH/PTHrP (PTHR) também é expresso em vários tipos celulares, incluindo a população de condrócitos pré-hipertrofos da placa de crescimento (Karperien et al., 1994; Lee et al., 1995).

Avanços significativos têm sido obtidos na Compreensão dos mecanismos de ação do PTHrP, do PTH e do receptor para PTH/PTHrP na formação óssea endocondral. Mutações do receptor para PTH/PTHrP têm sido identificadas em algumas doenças como a condrodissplasia metafisária de Jansen, a condrodissplasia letal de Blomstrand e a endocondromatose (Shipani et al., 1996; Karaplis et al., 1998).

O PTH e o PTHrP se ligam e ativam o mesmo receptor com afinidade quase indistinguíveis (Shipani et al., 1996). Os receptores para PTH/PTHrP medeiam tanto as ações endócrinas do PTH quanto as autócrinas e parácrinas do PTHrP (Chung et al., 1998; Kronenberg et al., 2006), o que o torna um regulador central da mineralização óssea. Além disso, a ação coordenada do PTH e do PTHrP é necessária para que a morfogênese esquelética seja normal (Miao et al., 2002; Shipani e Provot, 2003).

Na placa de crescimento, o PTHrP é expresso pelas células pericondriais e pelos condroblastos em proliferação, inibindo a diferenciação hipertrófica dos condrócitos, por meio de sua ação conjunta com o Ihh. No entanto, o receptor para PTH/PTHrP é pouco expresso em condrócitos da zona colunar, sendo mais expresso em condrócitos pré-hipertrofos (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996; Shipani e Provot, 2003; Kronenberg, 2006). Além disso, outros fatores como o TGF-beta2 e o Runx-2 estão interligados com o Ihh e o

PTHrP no controle da diferenciação hipertrófica da cartilagem (Alvarez et al., 2002; Guo et al., 2006).

Manipulações dos genes do PTHrP, do PTH e dos seus receptores têm demonstrado o papel crítico destas proteínas no controle da proliferação e diferenciação dos condroblastos, e na progressiva substituição da cartilagem por tecido ósseo (Weir et al., 1996; Miao et al., 2002; Shipani e Provot, 2003; Kronenberg, 2006).

Ratos deficientes em PTH são dismórficos, porém viáveis, enquanto que a ablação do gene PTHrP ou de seu receptor causa morte fetal no período perinatal. Estes ratos apresentam anormalidades graves nos ossos de formação óssea endocondral, exibindo redução do focinho, da mandíbula e das extremidades, além de reduzir o diâmetro do tórax, sendo esta última alteração a maior responsável pela incapacidade de sobrevivência dos filhotes após o nascimento (Karaplis et al., 1994; Shipani et al., 1997; Miao et al., 2002; Shipani e Provot, 2003).

Ratos com deficiência de PTH apresentam redução da mineralização da matriz cartilaginosa e da neovascularização com expressão reduzida de angiopoietina-1, além de hipoplasia osteoblástica (Miao et al., 2002). Já os ratos isentos de PTHrP apresentam redução da proliferação de condroblastos e maturação acelerada de condrócitos (Karaplis et al., 1994; Shipani et al., 1997; Shipani e Provot, 2003).

Relata-se que a superexpressão de PTHrP em ratos induz a condrodissplasia caracterizada por atraso na ossificação endocondral, com a presença de membros curtos e nanismo. Além disso, os condrócitos tornam-se hipertrófos na periferia dos ossos em desenvolvimento, ao invés das áreas centrais, levando a uma inversão aparente no padrão de diferenciação de condrócitos e na

ossificação. Estes resultados confirmam um dos efeitos do PTHrP como inibidor da diferenciação condrogênica (Weir et al., 1996; Shipani et al., 1997).

O PTHrP e o Ihh estabelecem um ciclo de *feedback* negativo. O Ihh é expresso no limite da zona pré-hipertrofica para a hipertrofica de modo que as células que escapam à ação inibitória do PTHrP na placa de crescimento, expressam Ihh, que por sua vez, irá estimular a expressão de PTHrP (Vortkamp et al., 1996; Chung et al., 1998; St-Jacques et al., 1999; Karp et al., 2000; Crombrughe et al., 2001; Alvarez et al., 2002; Kobayashi et al., 2005; Kronenberg, 2006).

O Ihh é um polipeptídeo que controla etapas críticas da formação óssea endocondral. O Ihh é necessário para a proliferação dos condroblastos normais e para o estabelecimento de colunas características da placa de crescimento (Vortkamp et al., 1996; St-Jacques et al., 1999; Karp et al., 2000; Crombrughe et al., 2001; Long et al., 2001; Kobayashi et al., 2005). Mas, o Ihh é também importante para a diferenciação osteogênica das células tronco

mesenquimais do perióstio (Shipani e Provot, 2003). Por isso, ratos com ausência de Ihh não apresentam osteoblastos no tecido ósseo esponjoso primário e no colar ósseo formado a partir do pericôndrio. Além disso, apresentam membros curtos e nanismo, com redução da proliferação de condroblastos e hipertrofia extensa, características partilhadas por mutantes de PTHrP e do seu receptor (St-Jacques et al., 1999; Karp et al., 2000; Crombrughe et al., 2001; Shipani e Provot, 2003).

A super expressão do Ihh ou a administração de seu substituto, o sonic hedgehog, também causa atrasos na diferenciação de condrocitos em associação com o aumento da expressão de PTHrP (Vortkamp et al., 1996).

### 1.5.5 Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) constituem uma família de pelo menos 22 fatores de crescimento polipeptídicos, que podem se ligar e ativar com alta afinidade uma família de quatro receptores tirosina-quinase (FGFRs 1-4) e proteoglicanos de sulfato de heparano, que medeiam as suas respostas biológicas (Colvin e Feldman, 1999; Ornitz, 2000; Ornitz e Itoh, 2001; Ornitz e Marie, 2002; Chen e Deng, 2005).

Os FGFs e seus receptores exercem funções essenciais no processo de ossificação endocondral e intramembranosa (Ornitz e Marie, 2002; Liu et al., 2007; Lazarus et al., 2007; Horton e Degnin, 2009), que vão desde os primeiros estágios do desenvolvimento do botão do membro até o crescimento e a remodelação do osso já totalmente formado (Wang et al., 2001; Chen e Deng, 2005; Yu e Ornitz, 2007).

Mutações genéticas com aumento dos efeitos dos receptores para o FGF em humanos resultam em, pelo menos, 14 doenças ósseas congênitas classificadas em dois grupos: condrodismplasias e craniosinostoses. A condrodismplasia afeta primariamente os ossos com formação endocondral, resultando em membros curtos e nanismo, enquanto a craniosinostose afeta principalmente os ossos com formação intramembranosa, levando a fusão prematura das suturas craniofaciais (Ohbayashi et al., 2002; Zelzer e Olsen, 2003; Chen e Deng, 2005; Hung et al., 2007; Yu e Ornitz, 2007).

Alguns FGFs, tais como o FGF-3, 4, 8, 15, 17 e 19 são apenas expressos durante o desenvolvimento embrionário, enquanto outros, como o FGF-1, 2, 9, 18 e 22 são expressos durante toda a vida (Chen e Deng, 2005). A expressão de receptores FGF-1 e 2 na embriogênese encontra-se em vários locais do embrião entre eles no mesênquima

do botão do membro, nos somitos, órgãos rudimentares e em órgãos em desenvolvimento (Peters et al., 1992).

As fases iniciais de indução do membro requerem a expressão de FGF-10 na placa mesodérmica lateral, que por sua vez ativa o FGFR-2b na crista ectodérmica apical (Chen e Deng, 2005; Hung et al., 2007; Yu e Ornitz, 2007). O FGF-4, FGF-9 e o FGF-17, dentre outros FGFs também são encontradas na crista ectodérmica apical em fases posteriores do desenvolvimento (Martin et al., 1998; Yu e Ornitz, 2007).

A interação entre a sinalização FGF e outros fatores como o Sonic hedgehog na zona de atividade de polarização é necessária para a formação do botão do membro (Yu e Ornitz, 2007). À medida que o broto do membro se expande, é dado início a formação do modelo esquelético pelo surgimento das condensações mesenquimais já descritas anteriormente, inicialmente marcada pela expressão do Sox-9 (Crombrughe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Ikeda et al., 2005). O FGFR-2 e o Col-2 estão entre os primeiros genes expressos na condensação do mesênquima. O FGFR-1 continua a ser expresso em torno do mesênquima e é também expresso juntamente com FGFR-2 na periferia da condensação (Yu e Ornitz, 2007). O FGF-9 e o FGF-18 são expressos no tecido circundante e dentro da condensação do mesênquima no desenvolvimento inicial dos membros. Os FGFs 2, 5, 6 e 7 são também expressos no mesênquima do membro em torno da condensação (Yu e Ornitz, 2007).

Após o nascimento, nas placas de crescimento dos ossos longos, a proliferação e a diferenciação dos condrócitos são reguladas negativamente pelo receptor para o FGF-3 (FGFR-3), pois camundongos mutantes com inativação deste receptor exibem maior crescimento dos ossos longos e das vértebras (Ohbayashi et al., 2002; Ornitz e Marie, 2002; Goldring et al., 2006;

Liu et al., 2007; Yu e Ornitz, 2007). Em contraste, o FGFR-1 é expresso em condrócitos hipertróficos e em condrócitos articulares e sua inativação resulta em membros curtos, com aumento da zona hipertrófica, sugerindo um papel para o FGFR-1 no controle da sobrevivência celular e na produção de matriz extracelular (Lazarus et al., 2007).

No osso maduro, o FGFR-1 e FGFR-2 são expressos no pericôndrio (Peters et al., 1992; Wang et al., 2001; Yu e Ornitz, 2007), sendo que o FGFR-2 atua como regulador positivo do crescimento ósseo endocondral na placa de crescimento, pois a ablação do FGFR-2 prejudica o crescimento dos ossos longos no período pós-natal (Lazarus et al., 2007). Apesar do FGF-2 ser expresso em condrócitos da placa de crescimento, sua exclusão causa um defeito ósseo relativamente sutil, levando a diminuição da densidade óssea, mas sem defeitos na morfogênese do esqueleto (Montero et al., 2000; Yu e Ornitz, 2007).

A sinalização do FGFR-3 além de regular o crescimento dos condrócitos também regula a expressão do Ihh/PTHrP e a sinalização BMP, os quais são importantes reguladores da condrogênese (Yu e Ornitz, 2007). Os FGFs também influenciam outras vias de sinalização, tais como a do WNT e as vias do TGF-beta (Horton e Degnin, 2009).

Experimentos com inativação de genes para FGF-2, FGF-18 e FGF-23 em ratos causam mutações letais embrionárias. Em alguns casos, a inativação do FGF-4 e do FGF-8 resulta em defeitos esqueléticos nos membros (Horton e Degnin, 2009). A deleção do FGF-4 e do FGF-8 na crista ectodérmica de embriões resulta em aumento da apoptose com os brotos dos membros anormalmente pequenos (Chen e Deng, 2005).

Evidências mais recentes demonstram papéis importantes para o FGF-9 e para o

FGF-18 na sinalização da placa de crescimento (Colvin et al., 1999; Garofalo et al., 1999; Hung et al., 2007; Liu et al., 2007). Camundongos com superexpressão de FGF-9 desenvolvem displasia esquelética envolvendo os ossos longos proximais, semelhantes àquelas observadas na doença humana (Garofalo et al., 1999), enquanto que ratos nulos para FGF-9 exibem elementos esqueléticos proximais desproporcionalmente curtos, apresentando redução da proliferação de condrócitos, atraso na hipertrofia de condrócitos e osteogênese anormal secundária a defeitos na vascularização esquelética (Lazarus et al., 2007; Hung et al., 2007).

O FGF-18 regula negativamente a proliferação e a diferenciação dos condrócitos por sinalização do receptor para o FGF-3 (FGFR3) e regula positivamente a osteogênese pela sinalização de outros FGFRs (Colvin et al., 1996; Ohbayashi et al., 2002; Liu et al., 2007). Camundongos FGF-18 nulos têm atraso na mineralização do esqueleto associada ao retardo da hipertrofia de condrócitos, diminuição da proliferação nas fases iniciais da condrogênese, atraso na vascularização óssea e atraso no recrutamento de osteoblastos e osteoclastos para a placa de crescimento (Ohbayashi et al., 2002; Liu et al., 2007). Além disso o FGF-18 é necessário para a expressão de VEGF em condrócitos hipertróficos e do pericôndrio, coordenando assim a invasão vascular da placa de crescimento (Ohbayashi et al., 2002; Yu e Ornitz, 2007; Liu et al., 2007).

### ***1.5.6 Outros fatores potenciais***

Wnts pertencem a uma família de 22 membros que têm uma gama de funções durante o desenvolvimento de estruturas controlando uma série de processos (proliferação, diferenciação e sobrevivência celular) durante o desenvolvimento dos membros (Church e Francis-West, 2002). A

polaridade dorso-ventral dos membros na embriogenese é controlada pela ectoderme, sendo que o gene que se expressa de maneira característica na ectoderme dorsal que irá definir esta polaridade é o Wnt-7a (Abarca-Buis et al., 2006). Ao eliminar o Wnt-7a ocorre a expressão de genes característicos da região ventral como o gene Engrailed-1 (En-1) ou o receptor 1a das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP1a,) invertendo a polaridade e resultando em extremidades bi-dorsais. Similarmente, a superexpressão desses genes também pode resultar em estruturas bi-dorsais ou biventrals (Abarca-Buis et al., 2006).

O fator de transcrição GLI age juntamente com outros fatores como o Ihh, o PTHrP e o FGF, sendo necessário para a formação óssea endocondral uma vez que na sua ausência, camundongos mutantes morrem ao nascer com defeitos nos membros e vértebras. Os ossos destes animais apresentam aumento da proliferação dos condroblastos, acompanhado por aumento na espessura das placas de crescimento, além de diminuição da formação óssea (Miao et al., 2004).

As metaloproteinasas (MMPs) são enzimas envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos que requerem a remodelação da matriz extracelular. Estas enzimas degradam pelo menos um dos diferentes Componentes da matriz e são reguladas por diferentes inibidores conhecidos como inibidores tissulares de metaloproteinasas (TIMPs) (Mattot et al., 1995). Mutações com inativação das MMPs resultam em anormalidades esqueléticas (Malémud, 2006), já que essas enzimas são fundamentais para o crescimento ósseo, sendo expressas principalmente nos condrócitos hipertrofiados, onde atuam na diferenciação e na apoptose (Mattot et al., 1995).

### ***1.6 Apoptose na formação e no crescimento ósseo endocondral***

Além do controle da proliferação e da diferenciação, a apoptose de condrócitos do modelo cartilaginoso e das placas de crescimento é fundamental para o desenvolvimento e crescimento normal do osso, de modo que qualquer ruptura do equilíbrio entre estes processos pode causar malformações esqueléticas (Orth, 1999).

O esqueleto fetal é composto de cartilagem hialina em vários locais, e a grande maioria dos condrócitos que compreende este tecido é removida por apoptose durante a formação óssea. Apenas os condrócitos da placa de crescimento e da cartilagem articular sobrevivem a intensa morte celular que ocorre durante a ossificação endocondral (Hughes e Boyce, 1997; Horton Jr. et al., 1998; Ploumis et al., 2004).

A morte celular pode ocorrer como um evento fisiológico durante a ossificação endocondral. Os condrócitos hipertróficos desaparecem com a calcificação da placa e são reabsorvidos a partir do tecido ósseo esponjoso primário, sendo que há controvérsias se a morte de condrócitos seria ou não um pré-requisito à calcificação (Hughes e Boyce, 1997; Horton Jr. et al., 1998; Pourmand, et al., 2007).

A proliferação dos condroblastos, a diferenciação e a síntese de matriz cartilaginosa são essenciais para o crescimento ósseo e a apoptose dos condrócitos hipertróficos das placas de crescimento desempenha um papel crucial na transição da condrogênese para a osteogênese (Goldring et al, 2006). A apoptose desempenha um papel importante no esqueleto pós-natal e adulto, sendo essencial para a remodelação óssea fisiológica e para o reparo ósseo (Horton Jr. et al., 1998; Hock et al., 2001; Magne et al., 2003).

A apoptose pode ser considerada uma via celular assim como a diferenciação, a proliferação ou a senescência. A dominância de um caminho em detrimento do outro é o que determina o destino celular com base em uma combinação de moléculas que favorecem uma via particular (Horton Jr. et al., 1998).

A apoptose também denominada morte celular programada é relevante para os eventos celulares normais do osso. Esta consiste de uma seqüência de eventos controlada a partir de dentro da célula por um grande número de fatores de regulação, mas que pode ser induzida ou inibida por fatores externos através de mecanismos mediados por receptores (Hughes e Boyce, 1997; Roach and Clarke, 2000). Está associada com a ativação de caspases, podendo ser desencadeada por ativação de eventos no retículo endoplasmático ou na mitocôndria ou pela ativação de receptores de superfície celular como o fator de necrose tumoral (TNF) (Cohen, 1997; Horton Jr. et al., 1998; Blagosklonny, 2000; Hock et al., 2001; Fan et al., 2005).

Em muitos tecidos, a via mitocondrial pode ser ativada diretamente pelos apoptogênicos ou indiretamente pela ativação das caspases, de tal modo que ocorre permeabilidade da membrana mitocondrial comprometendo a função da organela (Johnson, 2000; Hock et al, 2001). Na presença de inibidores das caspases ou na ausência total de caspases a morte celular é atrasada (Johnson, 2000; Blagosklonny, 2000).

O processo de apoptose envolve uma seqüência de eventos sincronizados na célula: encolhimento, retenção de organelas, condensação de cromatina, alterações na membrana nuclear, fragmentação de proteínas e clivagem do DNA. Eventualmente as células se fragmentam para formar os chamados corpos apoptóticos (Manolagas, 2000; Hock et al, 2001; Noble, 2003).

Esses restos celulares são removidos por células fagocíticas. O envolvimento do conteúdo celular em vesículas (corpos apoptóticos) e sua remoção rápida permitem que a apoptose ocorra com um mínimo ou nenhuma resposta inflamatória. Para a iniciação e execução da cascata apoptótica, um número de enzimas contribuem para a degradação de componentes e estruturas específicas celulares, destruição de inibidores da apoptose e da ativação de estimuladores da mesma (Zuzarte-Luís e Hurlé, 2002; Noble, 2003).

As células são removidas especificamente e de forma eficiente quando estão em excesso ou danificadas. Adicionalmente, algumas células morrem por apoptose como uma resposta normal ao final do processo de diferenciação (Adams e Shapiro, 2002), para manter ou modificar o tamanho dos órgãos ou simplesmente para contrabalancear o grande número de mitoses de células no organismo adulto (Kerr et al., 1972).

Existem numerosas moléculas que são envolvidas na apoptose, e o destino da célula depende de como essas moléculas interagem umas com as outras (Cohen, 1997; Hock et al., 2001; Fan, 2005).

Após a combinação e inserção na membrana mitocondrial de um subconjunto de membros pró-apoptóticos como o Ihh (Indiana Hedgehog) e os membros da família de proteínas Bax, o citocromo c é liberado para o citosol (Horton Jr. et al. 1998, Eskes et al., 2000, Johnson, 2000). Este passo pode ser bloqueado por membros antiapoptóticos da família Bcl-2 ou Bcl-XL. Uma vez liberado, o citocromo c interage com o fator de ativação da protease apoptótica 1 (Apaf-1) e com a pró-caspase-9 para formar um complexo apoptossomo, que promove o processamento e a clivagem de um iniciador da caspase, tal como a pró-caspase-9 (Horton Jr. et al., 1998; Hock et al., 2001; Malladi et al., 2009).

O receptor para PTH/PTHrP é expresso em altos níveis somente em condrócitos pré-hipertróficos durante os últimos estágios da ossificação endocondral (AmLing et al., 1997), mostrando que a ausência do PTHrP é deletéria para o desenvolvimento do esqueleto (Lee et al., 1996; Horton Jr. et al., 1998). O PTHrP estimula a expressão da proteína anti-apoptótica, Bcl-2, em condrócitos da placa de crescimento *in vivo* e *in vitro* (AmLing et al., 1997), de forma que a deleção do gene que codifica o Bcl-2 em ratos transgênicos causa intensa apoptose de condrócitos da placa de crescimento e redução do crescimento dos ossos longos (AmLing et al., 1997; Horton Jr. et al., 1998).

Durante a ossificação endocondral, o controle da maturação dos condrócitos regula o crescimento ósseo. O papel do fosfato inorgânico (Pi), cujos níveis aumentam na zona hipertrófica da placa de crescimento, tanto em compartimentos intra quanto extracelulares, ainda não foi elucidado (Magne et al., 2003; Zhong, 2011). Mas, postula-se que o Pi regula a maturação dos condrócitos e a apoptose associada à mineralização (Teixeira et al., 2001; Magne et al., 2003; Zhong, 2011).

A apoptose também tem um papel fundamental no desenvolvimento embrionário dos membros (Horton Jr. et al., 1998; Hock et al., 2001). A morte celular programada do tecido mole embrionário entre os dígitos é necessária para o desenvolvimento dos membros e tem sido utilizada como um modelo clássico para os estudos de apoptose (Horton Jr. et al., 1998; Hock et al., 2001).

Na morfogênese do membro, os dígitos se formam por processos coordenados de proliferação e apoptose interdígital. As BMPs, especificamente a BMP-2, a BMP-4 e a BMP-7, têm sido identificadas como reguladoras chaves controlando a apoptose

interdigital e dando origem a forma final do membro esquelético (Hock et al., 2001; Zuzarte-Luís e Hurlé, 2002; Guha et al., 2002). O controle da apoptose pelas BMPs está intimamente integrada com outras vias de sinalização implicadas no controle do crescimento e da diferenciação do membro, como a sinalização do FGF, responsável por cooperar no controle da apoptose mesodérmica (Montero et al., 2001). Quando a sinalização de FGF é bloqueada por aplicação local de inibidores, o FGF e as BMPs não são suficientes para provocar a apoptose (Zuzarte-Luís e Hurlé, 2002).

A MSX2 também pode interferir na apoptose interdigital induzida pelas BMPs (Capdevilla and Johnson, 1998). A MSX2 é membro da família de fatores de transcrição homeobox e é um repressor que exerce no tecido, ações específicas durante o desenvolvimento craniofacial, esquelético e neural (Marazzi et al., 2002).

Além das vias dependentes das BMPs e da MSX2, a via do retinóide também pode mediar a apoptose interdigital necessária para o desenvolvimento normal do membro. O tratamento com ácido retinóide em camundongos mutantes com apoptose defeituosa melhorou o fenótipo, promovendo apoptose interdigital (Marazzi et al. 2002; Zuzarte-Luís e Hurlé, 2002).

Outras proteínas e hormônios também são importantes para a apoptose que ocorre no esqueleto, tais como transglutaminases (Fesus et al., 1996), endonucleases, que clivam o DNA (Eastman et al., 1995) e o estrógeno que diminui a proliferação e induz apoptose de condrócitos na placa de crescimento, culminando com o desaparecimento da placa e fusão das epífises e metáfises (Zhong et al., 2011).

Quando o controle da via apoptótica é modificado por fatores internos ou externos ao organismo, quer por inibição ou indução

inapropriada, pode resultar em doença. Na esqueletogênese, alterações no mecanismo de apoptose podem resultar em malformações do crânio e de membros, como a sindactilia, a polidactilia e membros fendidos (Bursch et al., 1992, Kimura et al., 1996). Dentre os fatores externos que afetam a apoptose, têm-se as drogas psicoativas, dentre elas a cafeína que apresenta efeitos diretos sobre o ciclo celular, agindo sobre a proteína p53 ou ativando a protease pró-apoptótica caspase-3 de forma a induzir apoptose em células cancerígenas, neuronais e da epiderme (Moallem e Hales, 1998; Hwan et al., 2002, Lu et al., 2004). No osso, apesar da cafeína ser considerada um agente causador de malformações fetais, o mecanismo pelo qual ela causa essas alterações e sua correlação com a via apoptótica ainda não está claro. O que se sabe é que a adição de cafeína em culturas de osteoblastos pode reduzir a viabilidade celular (Tsuang et al., 2006) e inibir a atividade de síntese dessas células pela ativação da apoptose (Tassinari et al., 1991; Kamagata-Kiyoura et al., 1999, Lu et al., 2008).

## 2. *Cafeína*

A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) é uma das substâncias farmacologicamente ativas mais consumidas pela população, estando presente na dieta na forma de café, chás, chocolates, refrigerantes, energéticos e medicamentos, dentre outros (Heckman et al., 2010). Apesar do seu grande consumo pela população humana, ela pode também ser utilizada na alimentação animal (Cabezas et al., 1987; Mazzafera, 2002).

A cafeína pode ser inserida em dietas animais, quando da utilização da palha de café, um subproduto de baixo custo, que pode ser fornecida aos ruminantes em virtude da grande quantidade produzida durante o processamento do café. Entretanto, como apresenta gosto amargo e baixa



palatabilidade, seu uso, dependendo da quantidade, pode reduzir o consumo de ração e, o ganho de peso diário, aditivamente à hiperatividade nos animais. Por isso, algumas pesquisas têm buscado alternativas visando reduzir seus teores na palha ou polpa do café (Cabezas et al., 1987; Mazzafera, 2002).

Em animais monogástricos, há poucos estudos envolvendo o uso da polpa de café na dieta. Sabe-se que ela é bem aceita por suínos quando administrada em uma quantidade de 8 a 16% da ração consumida (Jarquín et al., 1974). Além disso, a casca de café pode ser incluída em níveis de até 5,0 a 9,5% na ração das fases de crescimento e terminação, respectivamente, sem prejudicar o desempenho do animal, além de produzir carcaças mais magras e de ser economicamente viável (Parra et al., 2008).

Os efeitos da cafeína no organismo humano e animal têm sido amplamente estudados. Algumas pesquisas preconizam seu uso como coadjuvante no tratamento de osteossarcoma e de sarcomas de tecidos moles por potencializar os efeitos citotóxicos da quimioterapia, aumentando a expectativa de vida de pacientes com metástases (Tsuchiya et al., 1998; Tsuchiya et al., 1999; Kawahara et al., 2004; Kimura et al., 2009; Melnik e Kohutova, 2009).

Recentemente, também comprovou-se que a cafeína pode estimular a motilidade espermática por inibir a atividade da fosfodiesterase aumentando o AMPc na cauda do espermatozóide (Milani et al., 2010). Por isso, as metilxantinas têm sido utilizadas no sêmen fresco e congelado humano e de diferentes espécies animais (Sinha et al., 1995; Sharma et al., 1996; Jayaprakash et al., 1997; Gradil e Ball, 2000; Funahashi e Nagai, 2001).

Apesar de algumas ações benéficas da cafeína, há vários relatos também de efeitos adversos no organismo. Tanto em humanos quanto em animais, pode estimular o sistema

nervoso central. Nos seres humanos, estes efeitos são traduzidos por redução da fadiga levando à insônia, ansiedade e ataques de pânico (Fisone et al., 2004). No sistema cardiovascular, a cafeína pode aumentar a frequência cardíaca, a pressão arterial e os batimentos cardíacos (Mandel, 2002), além de efeitos broncodilatador e diurético (Smith, 2002).

Direta ou indiretamente, a cafeína e seus metabólicos são capazes de agir em vários outros tecidos ou sistemas como o digestivo (Mandel, 2002), a pele (Fischer et al., 2007; Lou et al., 2010) e a glândula mamária (Nagasawa e Sakurai, 1986; Sheffield, 1991; Li e Hacker, 1995), dentre outros causando efeitos que vem sendo pouco a pouco elucidados, mas que ainda necessitam ser mais amplamente estudados.

No osso, a cafeína é considerada um fator de risco para a osteoporose (Kamagata-Kiyoura et al., 1999) e um agente causador de malformações fetais (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991). Diante disto, suas ações sobre este tecido têm sido estudadas (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991; Barone et al., 1993; Kamagata-Kiyoura et al., 1999). No entanto, vários mecanismos pelos quais a cafeína altera o osso, ainda são pouco compreendidos (Barone et al., 1993).

## **2.1 Farmacocinética da cafeína**

### **2.1.1 Absorção e distribuição**

A forma não dissociada da molécula da cafeína é solúvel na mucosa gástrica sendo por isso, bem absorvida pela via gastrointestinal. Por distribuir-se em todo o organismo tem sido encontrada uniformemente em todos os tecidos. Cerca de 99% é absorvida quando administrada por via oral, atingindo uma concentração plasmática máxima dentro de 15 a 45 minutos. É principalmente absorvida no

intestino delgado, embora cerca de 20% seja também absorvida no estômago (Per et al., 2004).

Cerca de 10-30% da cafeína está ligada de forma reversível às proteínas plasmáticas e por ser lipofílica atravessa todas as membranas biológicas, incluindo a barreira hematoencefálica e placentária (Maickel e Snodgrass, 1973). Dessa forma, a cafeína e seus metabólitos passam para o embrião e o feto, onde atingem concentrações discretamente inferiores às do plasma materno. É detectada em vários fluidos do corpo, incluindo saliva, bile, sêmen, leite, sangue do cordão umbilical e urina e plasma de neonatos (Souza e Sichieri, 2005).

Em humanos, alguns fatores, como o tabagismo, aumentam a taxa de depuração da cafeína. Além disso, o uso de contraceptivos orais duplica a sua meia-vida e de seus metabólitos, assim como a gestação onde a taxa de depuração é três vezes mais lenta (Neal e Benowitz, 1990).

### **2.1.2 Metabolismo e eliminação**

A cafeína é metabolizada pelos sistemas enzimáticos microssomais do fígado, por desmetilação, envolvendo o citocromo P450 (Neal e Benowitz, 1990). A meia-vida plasmática para os adultos é de duas a quatro horas, no entanto este tempo pode aumentar para cerca de nove horas em casos de overdose (Per et al., 2004). Em fetos e neonatos, a meia-vida é bem maior, com um tempo de 80 a 100 horas, devido à deficiência das enzimas hepáticas do sistema P-450 (Neal e Benowitz, 1990).

A cafeína é degradada por desmetilação originando a teobromina, a paraxantina e a teofilina e quantidades vestigiais de ácido 1,3,7-trimetilúrico e ácido 3-metilúrico que também são metabolicamente ativos (Soares e Fonseca, 2004; Souza e Sichieri, 2005). Em ratos, a desmetilação da cafeína originando a teobromina é a via metabólica

mais importante, constituindo 51% do total das dimetil-xantinas produzidas. Por outro lado, em humanos a principal via metabólica é a da paraxantina (Eteng et al., 1997). Embora a cafeína seja estruturalmente similar aos seus metabólitos, estes podem apresentar efeitos fisiológicos diferentes com importantes aplicações farmacêuticas. A teofilina, por exemplo, é utilizada como dilatador brônquico e no tratamento da apnéia, enquanto que a teobromina tem propriedades diuréticas (Arnaud, 2011).

A eliminação da cafeína pode sofrer influência dos hábitos pessoais e do estado metabólico do indivíduo. Assim, a nicotina aumenta a eliminação da cafeína, enquanto os antibióticos, principalmente as quinolonas, aumentam a sua concentração plasmática (Neal e Benowitz, 1990). Durante a gestação, ocorre redução da eliminação da cafeína, o que aumenta o risco de toxicidade para a mãe e para o feto (Aldridge et al., 1977; Parsons e Pelletiers, 1982). A redução da eliminação da cafeína também varia com a idade. Desta forma, vários estudos demonstram uma redução da eliminação da cafeína e da teofilina com o aumento da idade (Aldridge et al., 1977). Além disso, exercícios físicos, doenças hepáticas e interações medicamentosas também afetam a eliminação da cafeína por inibirem o citocromo P450 (Hallström et al., 2010).

O consumo de cafeína é seguro desde que feito com moderação. Os primeiros estudos sobre as propriedades toxicológicas da cafeína demonstraram que a dose mínima fatal administrada intraperitonealmente em coelhos, porcos da índia e gatos variou de 150 a 250 mg/Kg (Salant e Rieger, 1912 apud Soares e Fonseca, 2004).

### **2.2 Efeito da cafeína sobre as células ósseas e suas células precursoras**

O mecanismo pelo qual a cafeína pode influenciar o metabolismo ósseo ainda não está totalmente elucidado. Postula-se que ela possa afetar indiretamente o osso por aumentar a excreção urinária de cálcio (Bergman et al., 1990), podendo atuar, ainda, sobre a diferenciação osteogênica das células tronco (Liu et al., 2011) ou sobre a viabilidade e atividade de síntese dos osteoblastos (Zhou et al., 2010).

A cafeína tem sido considerada um dos fatores de risco para a osteoporose humana. Pesquisas *in vitro* demonstraram que ela pode ser potencialmente maléfica para os osteoblastos (Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2010). Assim, a sua adição em culturas de osteoblastos pode reduzir a viabilidade celular (Tsuang et al., 2006) e inibir a atividade de síntese dessas células pela ativação da morte celular (Tassinari et al., 1991; Kamagata-Kiyoura et al., 1999, Lu et al., 2008). Culturas de osteoblastos tratadas com elevadas concentrações de cafeína (0,1 a 1mM) podem morrer não só por apoptose, mas também por necrose. Além disso, há menor expressão de genes, enzimas e proteínas que são naturalmente expressos durante a osteogênese, como o Runx-2, fosfatase alcalina, colágeno I, osteocalcina, osteopontina, e histona (Zhou et al., 2010).

Acredita-se que, a interação da cafeína com os receptores da vitamina D em osteoblastos possa ser um possível mecanismo pelo qual ela afeta o tecido ósseo, em virtude desta vitamina possuir um importante papel no controle do metabolismo de cálcio. Rapuri et al., (2007) avaliaram os efeitos de diferentes doses de cafeína (0,2; 0,5; 1 e 10mM) na expressão de receptores para vitamina D em osteoblastos humanos, bem como sobre a atividade da fosfatase alcalina, reconhecidamente um marcador da atividade dessa célula. Observou-se, neste trabalho, uma redução dose-dependente da expressão desses receptores e inibição da atividade da

fosfatase alcalina, que não foi revertida pela adição de vitamina D. Assim, sugeriu-se que a cafeína afeta o metabolismo ósseo por interferir na expressão dos receptores para vitamina D das células osteoblásticas.

As células tronco mesenquimais da medula óssea, precursoras dos osteoblastos, são mais sensíveis que os osteoblastos quando expostos à mesma dose de cafeína. Por isso, postula-se serem essas células os alvos da cafeína no que se refere ao desencadeamento da osteoporose, embora os seus efeitos sejam dose-dependentes. Assim, em baixas concentrações (0,005-0,1 mM), ela não afeta a viabilidade celular e nem a atividade da fosfatase alcalina em culturas de células tronco mesenquimais submetidas à diferenciação osteogênica. No entanto, aumenta significativamente a osteoclastogênese da medula óssea, através da ativação do receptor da NF- $\kappa$ B ligante (RANKL), mediador da osteoclastogênese. Além disso, reduz a expressão das osteoprotegerinas (OPG), proteínas presentes nos osteoblastos, as quais Competem com o RANKL, inibindo a reabsorção óssea por osteoclasia. Sugere-se, então, que dessa forma a cafeína pode reduzir a densidade mineral óssea (Liu et al., 2011).

### ***2.3 Efeito da cafeína na formação óssea pré-natal e sobre o tecido ósseo de indivíduos jovens***

Durante a vida pré-natal, todo o esqueleto é derivado das formações ósseas intramembranosa e endocondral. Um dos efeitos da cafeína parece estar relacionado à inibição da formação óssea endocondral nas fases iniciais da proliferação e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em células cartilaginosas. Entretanto, postula-se também que a cafeína possa interferir nas fases posteriores da formação óssea, durante a diferenciação dos

osteoblastos, causando atraso ou inibição da mineralização do esqueleto fetal (Tassinari et al., 1991; Barone et al., 1993).

Todo o desenvolvimento ósseo fetal é determinado por fatores intrínsecos feto-materno-placentários e por fatores extrínsecos, tais como nutrição, perfil hormonal, dentre outros. Um desequilíbrio entre esses fatores pode resultar em alterações da formação e do crescimento fetal (Neelam, 2009). Desta forma, o consumo de cafeína pela mãe pode afetar a formação óssea endocondral do feto, reduzir o peso corporal e causar alterações teratogênicas como fenda palatina, malformações de membros e ectrodactilia (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991), além de reduzir o conteúdo ósseo mineral. Por ser pobremente metabolizada durante a gestação, a cafeína acumula-se no tecido fetal, prejudicando o desenvolvimento esquelético. Sugere-se que esses efeitos sobre o feto possam ser potencializados quando o consumo de cafeína está associado à desnutrição energético-protéica (Nakamoto e Shaye, 1986; Schneider et al., 1990).

As doses de cafeína capazes de causar malformação fetal em modelos animais excedem muito às doses consumidas diariamente pela população. Diante disso, a maioria dos estudos epidemiológicos em humanos não demonstraram evidências de que a cafeína possa causar malformações congênitas (Larroque et al., 1993). No entanto, embora baixas doses de cafeína (20-100 mg/Kg) não induzem malformações, sabidamente atrasam a formação óssea (Nakamoto et al., 1989; Tassinari et al., 1991).

Em ratos jovens de crescimento rápido, quando expostos à cafeína, observou-se retardo do crescimento ósseo, o que poderia estar relacionado à redução de alguns constituintes minerais do osso como cálcio, cobre, fósforo e zinco (Sasahara et al., 1994; Wink et al., 1996). Além disso, tem sido sugerido que doses altas de cafeína, acima

de 80 mg/Kg, inibem o crescimento ósseo endocondral (Huang et al., 2002). Neste sentido, observou-se que fragmentos de osso desmineralizado implantados no subcutâneo de ratos em crescimento e tratados com cafeína, apresentaram inibição da condrogênese e redução da expressão de colágeno II, histona e do fator de crescimento tumoral beta (TGF  $\beta$ ) (Barone et al., 1993). A ingestão de cafeína durante a gestação e lactação pelas mães e pelos filhotes no período de crescimento afeta também a quantidade de hidroxiprolina óssea (Valdes et al., 1992).

#### ***2.4 Efeito da cafeína sobre os metabolismos ósseo e mineral de indivíduos adultos***

Os efeitos da cafeína sobre o osso de indivíduos adultos são contraditórios, embora haja maior consenso entre os pesquisadores quanto aos malefícios ao osso causados pela sua ingestão (Scott, 1983; Narod et al., 1991; Tassinari et al., 1991; Barone et al., 1993). No entanto, alguns pesquisadores não conseguiram demonstrar seus efeitos negativos sobre o metabolismo ósseo, devido às metodologias de análise empregadas e às inúmeras variáveis, em se tratando de estudos em seres humanos (Johansson et al., 1992; Barger-Lux e Heaney, 1995).

A diferença de resposta do osso à cafeína pode estar relacionada à dose utilizada, idade do indivíduo, ao osso estudado e com as metodologias de análise utilizadas visando avaliar o impacto do seu uso sobre o esqueleto (Massey e Whiting, 1993; Tsuang et al., 2006; Bezerra et al., 2008). Níveis séricos dos hormônios sexuais também são importantes, uma vez que alguns pesquisadores demonstraram que a cafeína pode alterar o osso, apenas quando associada à redução ou ausência do estrogênio. Além disso, tem sido demonstrado que esse

hormônio pode bloquear a ação da cafeína (Zhou et al., 2009).

De forma geral, tem sido comprovado que a cafeína altera a estrutura óssea (Sasahara et al., 1994), reduzindo a densidade óssea mineral e aumentando o risco de fraturas (Heaney e Recker, 1982; Huang et al., 2002). Além disso, inibe o reparo de defeitos ósseos (Duarte et al., 2009) e reduz o conteúdo de zinco (Sasahara et al., 1990) e cobre no osso, importantes para a atividade osteoblástica e para a síntese de colágeno (Wink et al., 1996). Finalmente, reduz os níveis de cálcio (Huang et al., 2002), essenciais para a mineralização da matriz óssea.

Sobre o metabolismo do cálcio, a cafeína age aumentando a excreção fecal e urinária desse mineral (Yeh et al., 1986). Diante disto, Whiting e Whitney (1987) avaliaram os efeitos crônicos da ingestão de cafeína e de teofilina sobre a excreção urinária de cálcio em ratos machos adultos. A excreção urinária de cálcio nos animais tratados com teofilina foi significativamente maior, havendo persistência da hipercalcúria por pelo menos três semanas. Assim, o efeito da cafeína sobre o metabolismo ósseo parece depender do consumo de cálcio diário. Desta forma, em mulheres adultas jovens com consumo adequado de cálcio, a ingestão moderada de cafeína pode ter pouco ou nenhum efeito deletério sobre os níveis séricos deste mineral. Parece que a hipercalcúria pode ser Compensada pela absorção intestinal de cálcio (Barger-Lux et al., 1990). No entanto, mulheres idosas não conseguem Compensar a hipercalcúria quando a ingestão de cálcio está abaixo das recomendações diárias (Massey e Whiting, 1993; Heaney, 2002).

Além dos efeitos sobre o metabolismo mineral, a cafeína também inibe o reparo de defeitos ósseos (Duarte et al., 2009) por reduzir o número de osteoblastos (Yuwono et al., 2006). É provável que esse efeito envolva a inibição da diferenciação das

células mesenquimais em osteoblastos (Liu et al., 2011), como descrito anteriormente.

### ***Material e métodos***

O projeto utilizou as bases físicas e a infraestrutura dos Laboratórios de Experimentação Animal, de Histopatologia e Imunoistoquímica e de Biologia Molecular e do Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo nº 177/2010).

#### ***Experimento 1. Efeitos in vivo da cafeína sobre a formação e o crescimento ósseo endocondral de ratos***

Foram utilizadas 38 ratas Wistar com dois meses de idade alojadas em caixas plásticas (5-6 animais/caixa) onde receberam a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de 30 dias de adaptação, as ratas foram separadas, ao acaso, em quatro grupos, sendo três grupos tratados com diferentes doses de cafeína (10 animais/grupo tratado) e um grupo controle (oito animais). Os grupos tratados receberam diariamente, por sonda oro-gástrica, cafeína<sup>10</sup> diluída em 7 mL de água destilada, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg que foram administradas uma vez ao dia, no mesmo horário, por todo o período experimental. Os animais do grupo controle receberam apenas

7 mL de água destilada como placebo também administrada por sonda oral.

Todas as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal (Marcondes et al., 2002) para determinar a fase do ciclo estral. As que se apresentavam em estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas em uma proporção de quatro fêmeas para um macho. Após as 12 horas, foram realizados esfregaços vaginais, diariamente. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. Os animais dos grupos tratados e controle continuaram recebendo cafeína e água destilada, respectivamente, por sonda oro-gástrica, durante todo o período experimental (gestação e lactação).

#### ***Dosagem plasmática de cortisol***

Após transcorrida a amamentação (21 dias), no período da manhã, as ratas foram anestesiadas com cloridrato de quetamina (40 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg), para colheita de sangue por punção intracardiaca. O sangue foi colhido em tubos para obtenção de plasma e armazenado a -20 °C para dosagem de cortisol. A dosagem de cortisol foi realizada pelo laboratório de análises Hermes Pardini, pela técnica de quimioluminescência (Access Immunoassay System, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Chaska, MN, USA) em sistema totalmente automático e de acordo com as recomendações do fabricante dos kits.

#### ***Necropsia e processamento histológico***

Três dias após o nascimento, três ratos de cada fêmea foram eutanasiados para colheita dos ossos de todo o membro pélvico direito e da coluna vertebral lombar para análise histopatológica. Ao desmame, três ratos de 21 dias de idade de cada fêmea foram eutanasiados para colheita do úmero, fêmur e tíbia do lado esquerdo, e vértebras

torácicas e lombares para análise histomorfométrica.

Os ossos foram fixados em formalina a 10% neutra e tamponada por 24 horas, descalcificados em ácido fórmico a 21% por um período de 20 dias (reposição do ácido a cada três dias), sendo posteriormente, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, submetidos à microtomia com cortes de 4µm e corados pelas técnicas da hematoxilina e eosina (HE) e Safranina O.

#### ***Análise histomorfométrica dos ossos***

A determinação da porcentagem de tecido ósseo trabecular foi realizada em seções histológicas de vértebras e ossos longos dos ratos com 3 e 21 dias de idade. Nesses ossos, foi determinada a porcentagem de tecido ósseo trabecular imediatamente abaixo da placa epifisária, ou seja no tecido ósseo esponjoso primário, de dois corpos vertebrais aleatórios da coluna lombar e em um campo aleatório da tíbia dos ratos de três dias. Nos ratos com 21 dias de idade, a porcentagem de tecido ósseo trabecular foi determinada em seis campos aleatórios, no tecido ósseo esponjoso primário de três corpos vertebrais na coluna torácica de 1 a 7, na coluna torácica de 8 a 13, na coluna lombar de 1 a 3, e na coluna lombar de 4 a 6, e no tecido ósseo esponjoso primário do fêmur, tíbia, úmero. Essa análise foi realizada com o auxílio de uma grátula de 121 pontos acoplada a ocular em um microscópio óptico com objetiva de 40x.

A espessura das placas epifisárias de dois corpos vertebrais dos ratos com três dias de idade e de três corpos vertebrais dos ratos com 21 dias de idade foi determinada em três pontos equidistantes com o auxílio de uma ocular micrométrica em objetiva de 40x e 10x, respectivamente. Nas cartilagens articulares e nas placas epifisárias dos

fêmures, tíbias e úmeros dos ratos com 21 dias de idade, foram obtidas as médias das espessuras tomadas em 15 pontos distribuídos em toda a sua extensão, com o auxílio de uma ocular micrométrica e em objetiva de 10x.

O comprimento dos corpos vertebrais foi medido em duas vértebras/animal nos ratos com três dias de idade e em três vértebras/animal nos ratos com 21 dias de idade, com objetiva de 10x e de 4x, respectivamente. Os valores foram obtidos mediante o uso de uma ocular micrométrica e foram posteriormente transformados para milímetros com auxílio de uma lâmina micrométrica.

Nos ratos com três dias de idade, foi determinada a porcentagem de núcleo e de lacunas de condroblastos, bem como a porcentagem de matriz do tecido cartilaginoso na epífise cartilaginosa distal do fêmur e na epífise cartilaginosa proximal da tíbia, com o auxílio de uma graticula de 121 pontos acoplada a ocular em um microscópio óptico com objetiva de 40x.

### ***Análise Estatística***

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e Comparação das médias pelo teste de SNK. Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

### ***Experimento 2: Efeitos in vitro da cafeína no tecido cartilaginoso de ratos em crescimento***

#### ***Coleta e cultivo da cartilagem das epífises femorais***

Foram utilizadas as epífises cartilaginosas de 80 fêmures de ratos Wistar com dois dias de idade. Os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésicos (associação de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina) por via intraperitoneal. A pele dos membros pélvicos foi submetida à antissepsia com álcool 70% e com iodeto de potássio. Os fêmures esquerdo e direito de cada rato foram removidos dos tecidos moles adjacentes com instrumental estéril e dentro de fluxo laminar. Após a remoção, os ossos contendo as epífises cartilaginosas foram inicialmente lavados em tampão fosfato salino (PBS) 0,15M estéril.

Foram formados dois grupos, tratado com cafeína e controle sendo estes constituídos de quatro subgrupos (0, 7, 14 e 21 dias de cultivo). Em cada subgrupo utilizou-se dez ossos, sendo quatro submetidos ao exame histológico, imunoistoquímico e à técnica de túnel, e seis ossos submetidos aos ensaios de RT-PCR em tempo real.

Os ossos do dia zero foram removidos das ratas e imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% para análise histológica, imunoistoquímica e técnica de túnel ou foram imediatamente colocados em criotubos com trizol, sem serem cultivados em meio de cultura, para os ensaios de RT-PCR tempo real.

No fluxo laminar, os fêmures foram colocados em placas de 6 wells com meio de diferenciação osteogênico enriquecido com ácido ascórbico (50µg/mL), β-glicerofosfato (10mM) e dexametasona (0,1µM), acrescido de 10% de soro fetal bovino, de acordo com Wakita et al., 1998. O meio de cultivo do grupo tratado foi acrescido de cafeína<sup>1</sup> 2mMol. Os ossos foram mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas. Aos 7, 14 e 21 dias, quatro ossos de cada grupo (controle e tratado com cafeína) foram removidos da

---

<sup>1</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

cultura e fixados em paraformaldeído a 4% para análise histológica e imunoistoquímica e seis ossos foram colocados em criotubos com trizol, para os ensaios de RT-PCR tempo real.

### ***Análise histomorfométrica dos fêmures***

Os ossos para a análise histológica foram fixados em paraformaldeído a 4% pelo período de 24 horas e posteriormente descalcificados em solução de ácido fórmico a 10% pelo período de cinco dias com troca da solução ácida a cada 48 horas. Em seguida, os ossos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções de 4µm foram coradas pela hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica. Foi determinada a porcentagem de núcleo e lacunas de condroblastos, bem como a porcentagem de matriz do tecido cartilaginoso, com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 40x contendo uma gráticula de 121 pontos.

### ***Imunoistoquímica***

Para a realização da imunoistoquímica e da técnica de túnel foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura dos fêmures em lâminas silanizadas. Secções histológicas dos ossos foram submetidas à análise imunoistoquímica utilizando o anticorpo anti-CDC47 (47DC141, Neomarkers, Fremont, CA, USA) para estimativa da proliferação celular nas epífises cartilaginosas dos fêmures.

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C. As lâminas foram incubadas em câmara úmida overnight com o anticorpo primário e por 30

minutos nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e estreptavidina peroxidase. O anticorpo primário anti-CDC47 teve como diluição 1:100. A incubação com anticorpo secundário (Biotin Goat, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) foi realizada por 45 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) por 30 minutos. As secções foram contra-coradas com verde metila. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG.

Nas epífises dos fêmures foi determinada a porcentagem de condroblastos com expressão de CDC-47 pela contagem de células marcadas e não marcadas em quatro campos aleatórios com objetiva de 40x.

### ***Avaliação da técnica de túnel***

Células apoptóticas foram marcadas pela técnica de túnel utilizando o TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit<sup>1</sup>. A recuperação antigênica foi realizada de forma enzimática com proteinase K por 20 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C com o TdT por 1 hora e 30 minutos e por 30 minutos à temperatura ambiente nas etapas de bloqueio da peroxidase endógena e estreptavidina. O cromógeno utilizado foi o DAB e o tempo de incubação foi de 15 minutos. As secções foram contra-coradas com verde metila. O controle negativo foi obtido pela substituição do TdT por TBS.

Nas epífises dos fêmures, a quantificação do número de condroblastos apoptóticos foi realizada com objetiva de 40X em microscópio óptico Olympus BX-40 em três campos.



### ***Avaliação da expressão de caspase-3, Runx-2 e Sox-9 pela técnica RT-PCR em tempo real***

As epífises cartilaginosas de todos os ossos foram colocadas em criotubos com trizol que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e posteriormente estocados a -80°C para avaliação dos transcriptos gênicos para caspase-3, Runx-2 e Sox-9 pela RT-PCR em tempo real.

Para a técnica de RT-PCR em tempo real a extração do RNA total das cartilagens epifisárias foi realizada pelo uso do Trizol. O método consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização do tecido por 5 minutos à temperatura ambiente. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL, onde foram adicionados 0,2mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de homogeneização, 2 a 3 minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4°C, para separação em três fases onde a fase incolor

superficial continha o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5mL de álcool isopropílico e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi lavado com 1mL de etanol a 75%, homogenizado e centrifugado a 7.500g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água livre de RNase e imediatamente estocado a -80°C. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se kit comercial (Taqman reverse transcription reagent; Applied Biosystems). Foram realizadas as reações de PCR utilizando-se 2µg de cDNA, 600nM de cada iniciador e 17µL do reagente syber Green (Applied Biosystems) em um volume final de 25 µL de reação, no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de genes e iniciadores para RT-PCR em tempo real

Gene	Iniciadores	Nº acesso
Caspase-3	Forward primer TGGAGGAGGCTGACCGCAA Reverse primer CTCTGTACCTCGGAGGCCTGAAT	NW_012922
Runx-2	Forward primer GCGTCAACACCATCATTCTG Reverse primer CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348
Sox-9	Forward primer CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC Reverse primer GTTCTTCACCGACTTCTCCG	NW_0473432

### ***Análise estatística***

O delineamento foi fatorial (2X4), ou seja, dois grupos e quatro períodos. Para cada variável foi determinado a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e Comparação das médias foi feita pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

### ***Resultados***

#### ***Experimento 1***

##### ***Dosagem plasmática de cortisol***

As concentrações plasmáticas de cortisol das mães no grupo tratado com cafeína na dose de 100mg/Kg foram significativamente maiores do que as do grupo controle. No

entanto, os grupos tratados com doses menores de cafeína (25 e 50 mg/Kg) apresentaram níveis plasmáticos de cortisol

semelhantes ao do grupo controle ( $p \geq 0,05$ ), (Tab. 2).

Tabela 2. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da dosagem plasmática de cortisol (mcg/dL) de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle aos 21 dias de lactação.

Variável	Controle	Cafeína 25 mg/Kg	Cafeína 50 mg/Kg	Cafeína 100 mg/Kg
Concentração plasmática de cortisol	0,4857 ± 0,089 B	0,4625 ± 0,0744 B	0,555 ± 0,1740 B	0,7625 ± 0,1847 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

### ***Características, peso e tamanho dos filhotes***

Somente os filhotes das ratas tratadas com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg apresentaram malformações esqueléticas, sendo que nas ratas tratadas com 50 mg/Kg de cafeína, dos 122 filhotes totais, 10 apresentaram sindactilia, ou seja, fusão dos espaços interdigitais, em pelo menos três espaços interdigitais dos membros torácicos ou pélvicos ou em ambos. Já no grupo de ratas tratadas com 100mg/Kg de cafeína, dos 111 filhotes totais, 30 apresentaram sindactilia em pelo menos três espaços interdigitais nos membros torácicos, pélvicos ou em ambos. Todos os animais

que apresentaram sindactilia ao nascimento, não apresentavam mais essa alteração ao desmame, ou seja, aos 21 dias de idade. Ainda no grupo tratado com a dose mais alta de cafeína, quatro filhotes apresentaram braquidactilia nos membros pélvicos, caracterizada pelo encurtamento dos dígitos e um animal apresentou malformação do crânio caracterizada por abaulamento da cabeça, na região fronto-nasal (Tab. 3 e Fig. 1). Como os ossos chatos do crânio apresentam formação e crescimento ósseo intramembranoso, essa alteração não será discutida posteriormente, por não se tratar do escopo deste estudo.

Tabela 3. Número de malformações, ao nascimento, nos filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Grupos	Total de mães	Total de filhotes	Sindactilia	Braquidactilia	Malformação do crânio
Controle	8	88	0	0	0
Cafeína 25mg/Kg	10	108	0	0	0
Cafeína 50mg/Kg	10	122	10	0	0
Cafeína 100 mg/Kg	10	111	30	4	1

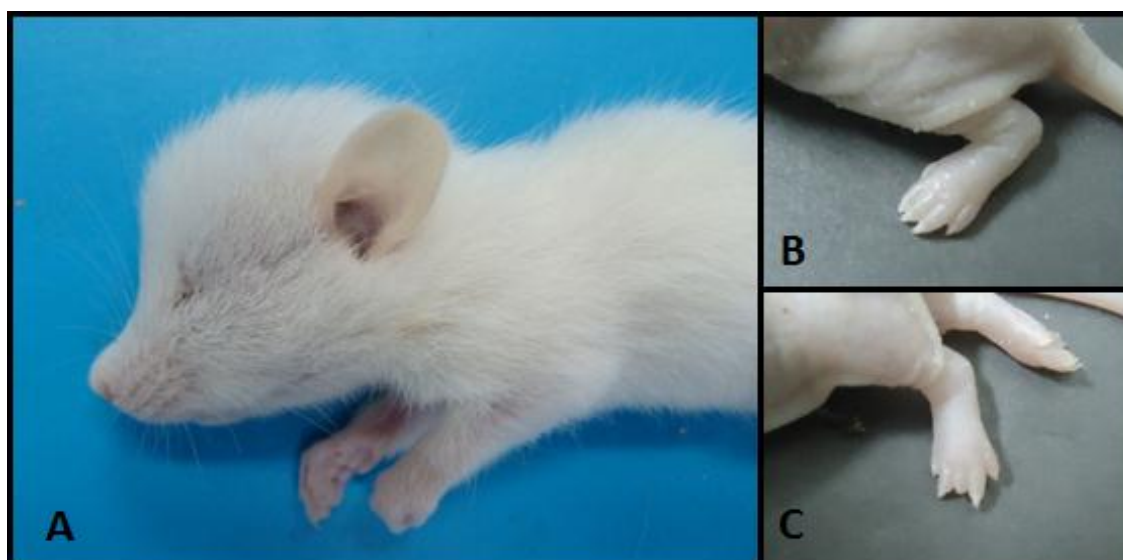


Figura 1. Malformações nos filhotes de ratas tratadas com cafeína na dose de 100 mg. A) Rato de 21 dias de idade com abaulamento da região fronto-nasal do crânio. B) Rato de três dias de idade com sindactilia no membro pélvico esquerdo, caracterizada pela união dos espaços interdigitais. C) Rato de três dias de idade com braquidactilia no terceiro dedo do membro pélvico esquerdo, caracterizada pelo encurtamento do dígito.

Os filhotes das ratas tratadas com cafeína, independentemente da dose, não apresentaram diferença significativa do número total de fetos nascidos e nem da taxa de natimortalidade em comparação ao controle (Tab. 4). Mas uma e duas mães tratadas com 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente, apresentaram 100% de mortalidade até o final do desmame. Essa mortalidade estava associada ao

hipodesenvolvimento da glândula mamária (dados não demonstrados). Já o peso dos filhotes das ratas tratadas com 50 e 100 mg/Kg de cafeína foi significativamente menor em comparação ao grupo controle do dia do nascimento até o desmame. No entanto, os filhotes das ratas tratadas com 25mg/Kg de cafeína não apresentaram peso diferente dos filhotes das ratas controle (Tab. 5 e Fig. 2 e 3).

Tabela 4. Mediana (variação) e resultado da análise estatística do número de filhotes nascidos e da porcentagem de filhotes mortos nos grupos de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle

Grupos	Nº de filhotes nascidos	% de filhotes mortos
Controle	11,50 (7,00- 14,00) A	3,86 (0- 42,86) A
Cafeína 25mg/Kg	11,50 (7,00-14,00) A	0 (0-0) A
Cafeína 50mg/Kg	13,00 (8,00-15,00) A	3,34 (0-66,67) A
Cafeína 100mg/Kg	11,00 (8,00-14,00) A	0 (0-100) A

\*Medianas com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Mann Whitney ( $P \geq 0,05$ ).

Tabela 5. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do peso dos filhotes (g) de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle do nascimento até o desmame

Dias	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
DIA 1	7,23 ± 0,62 A	7,38 ± 0,66 AB	6,53 ± 0,65 B	5,87 ± 0,96 B
DIA 3	9,55 ± 0,77 A	9,19 ± 1,11 A	8,17 ± 1,75 A	6,84 ± 1,13 B
DIA 5	12,65 ± 1,48 A	11,67 ± 1,46 A	9,85 ± 1,30 B	9,12 ± 1,07 B
DIA 7	16,50 ± 2,05 A	14,63 ± 2,37 A	12,19 ± 2,04 B	11,06 ± 1,59 B
DIA 9	18,89 ± 2,71 A	17,72 ± 2,87 A	14,58 ± 3,27 B	13,43 ± 1,35 B
DIA 11	23,59 ± 3,08 A	21,50 ± 3,67 A	18,44 ± 1,83 B	16,26 ± 1,59 B
DIA 13	26,46 ± 3,67 A	25,19 ± 4,91 A	21,61 ± 2,09 B	19,42 ± 2,46 B
DIA 15	29,38 ± 4,80 A	28,01 ± 5,25 A	24,86 ± 2,44 AB	22,79 ± 2,68 B
DIA 17	33,47 ± 5,64 A	31,08 ± 5,64 AB	27,55 ± 2,91 B	25,21 ± 2,70 B
DIA 19	39,30 ± 7,00 A	36,16 ± 6,06 AB	31,91 ± 3,58 B	28,58 ± 2,93 B
DIA 21	44,66 ± 9,30 A	44,32 ± 6,26 A	38,82 ± 4,70 AB	34,96 ± 3,82 B

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ). Dia 1 = 24 horas após o parto



Figura 2. Ratos com três dias de idade, filhotes de ratas do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg com menor tamanho em comparação ao grupo controle.

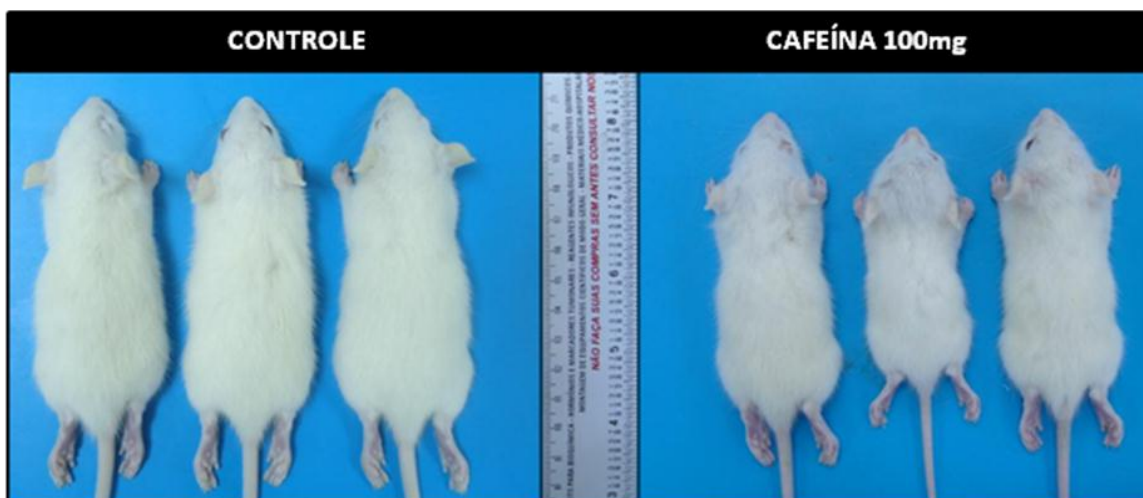


Figura 3. Ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg com tamanho inferior ao do grupo controle.

Semelhante ao resultado do peso dos filhotes, a distância tomada da nuca até a base da cauda e o comprimento dos membros pélvicos dos ratos de três dias de idade das ratas tratadas com 50 e 100 mg de cafeína foi significativamente menor em comparação ao grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa dessas variáveis entre o grupo tratado com 25mg/Kg de cafeína e o grupo controle (Tab. 6 e 7). Mas, interessante é que o comprimento dos membros torácicos dos ratos de 3 dias de idade foi significativamente menor em todos os

grupos tratados com cafeína em comparação ao grupo controle, mesmo na dose menor de 25mg/Kg (Tab. 7).

O comprimento vertebral dos ratos com três dias de idade, filhotes das ratas tratadas com cafeína na dose de 100 mg/Kg foi significativamente menor em comparação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com cafeína (25 e 50 mg/Kg). No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com 25 e 50 mg/Kg de cafeína em comparação ao controle (Tab.8, Fig.8).

Tabela 6. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento corporal medido da nuca até a base da cauda de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle

Variável	Controle	Cafeína 25 mg/Kg	Cafeína 50 mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Comprimento (mm)	38,2 ± 3,084 A	38,125 ± 1,246 A	33,33 ± 2,550 B	31,9375 ± 2,367 B

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

Tabela 7. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento (mm) dos membros de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle

Membros	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Pélvicos	3,16 ± 0,1506 A	2,675 ± 0,08864 A	2,06 ± 0,08433 B	1,98 ± 0,06325 B
Torácicos	3,27 ± 0,2312 A	3,0875 ± 0,06409 B	2,55 ± 0,1434 C	2,23 ± 0,2003 C

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

Tabela 8. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento (mm) do corpo vertebral de ratos de três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Variável	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Comprimento do corpo vertebral	1,505 ± 0,1267 A	1,49 ± 0,1363 A	1,3 ± 0,1075 A	1,125 ± 0,1436 B

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

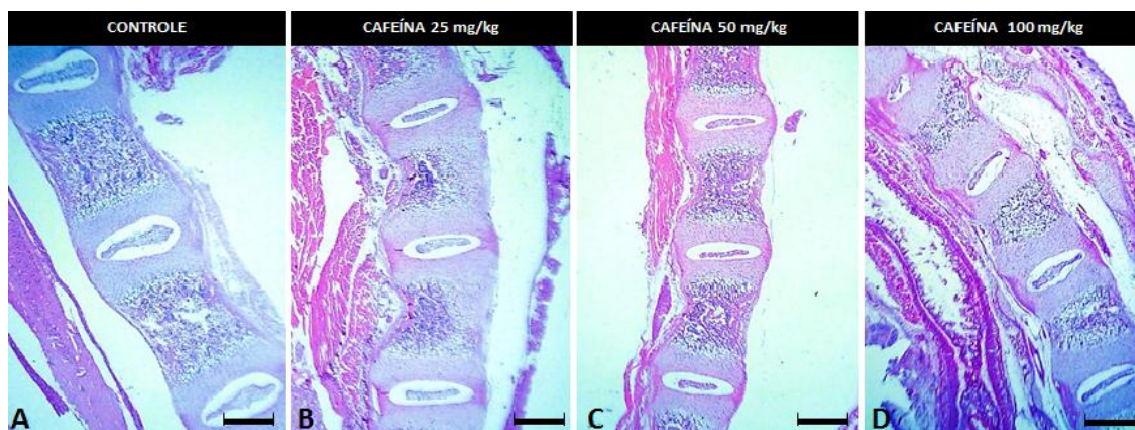


Figura 4. Comprimento vertebral de ratos com três dias de idade. HE, Bar = 236,51  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. O comprimento vertebral do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg é menor em comparação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg.

O comprimento dos ossos longos (fêmur, tíbia e úmero) dos ratos com 21 dias de idade, filhotes das ratas tratadas com todas as doses de cafeína foi significativamente menor em comparação ao grupo controle. Com relação a largura dos ossos longos, somente o fêmur e a tíbia dos filhotes de ratas tratadas com 50 e 100 mg/Kg de cafeína foi significativamente menor em

comparação ao grupo controle. A largura do úmero não diferiu significativamente entre todos os grupos tratados com cafeína e o grupo controle (Tab. 9). O comprimento dos corpos vertebrais de toda a coluna foi significativamente menor nos ratos com 21 dias de idade, filhotes das ratas tratadas com 100mg/Kg de cafeína em comparação ao controle. Nas doses de 50 mg/Kg de cafeína,

o comprimento dos corpos vertebrais foi significativamente menor, em comparação ao grupo controle, somente no segmento da quarta a sexta vértebras lombares. Já o comprimento vertebral do grupo tratado com

25 mg/Kg de cafeína não diferiu significativamente em relação ao controle (Tab. 10 e Fig. 5).

Tabela 9. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento e largura (cm) do fêmur (F), tíbia (T) e úmero (U) dos ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Variável	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Comp. F	1,8048 ± 0,0468 A	1,7305 ± 0,0684 B	1,653 ± 0,0576 C	1,586 ± 0,0599 D
Comp. T	2,344 ± 0,08110 A	2,1560 ± 0,0884 B	2,127 ± 0,0617 B	1,977 ± 0,0796 C
Comp. U	1,5698 ± 0,0372 A	1,5143 ± 0,0457 B	1,454 ± 0,0473 C	1,399 ± 0,0497 D
Larg. F	0,2077 ± 0,0115 A	0,2010 ± 0,003 AB	0,1962 ± 0,007 B	0,195 ± 0,0141 B
Larg. T	0,1537 ± 0,0051 A	0,1501 ± 0,0003 A	0,138 ± 0,0105 B	0,114 ± 0,0132 C
Larg. U	0,169 ± 0,01544 A	0,1618 ± 0,0180 A	0,171 ± 0,0165 A	0,2578 ± 0,232 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

Tabela 10. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do comprimento vertebral (mm) de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas dos grupos controle e tratadas com diferentes doses de cafeína.

Segmento vertebral	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
VL 1-3	2,962 ± 0,269 A	2,687 ± 0,470 A	2,533 ± 0,265 AB	2,256 ± 0,380 B
VL 4-6	3,102 ± 0,174 A	2,946 ± 0,400 AB	2,699 ± 0,210 B	2,513 ± 0,311 B
VT1-7	1,907 ± 0,139 A	1,789 ± 0,210 A	1,758 ± 0,204 A	1,519 ± 0,208 B
VT 8-13	2,148 ± 0,459 A	1,944 ± 0,295 AB	1,915 ± 0,205 AB	1,669 ± 0,152 B

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

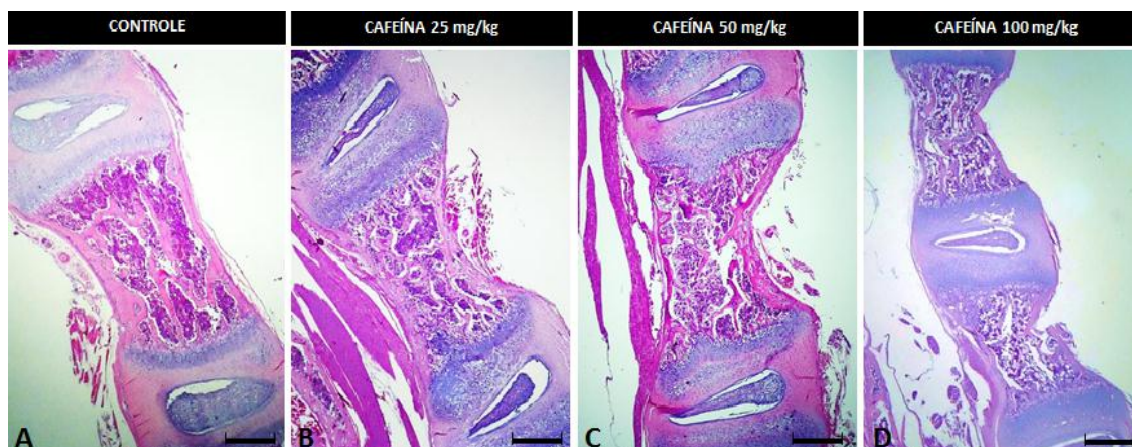


Figura 5. Vértex lombares de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 236,51  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. O comprimento vertebral do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg é menor em comparação ao grupo controle e aos demais grupos tratados com cafeína 25 e 50 mg/Kg.

#### *Análise histomorfométrica dos ossos dos ratos de três dias de idade*

##### *Placa epifisária e tecido ósseo esponjoso primário da tíbia e vértebras*

Independentemente do grupo, a placa epifisária dos ossos longos apresentava-se indistinta da epífise que ainda era constituída somente por cartilagem e sem a presença dos centros de ossificação. A placa epifisária dos ossos longos e vértebras dos ratos de 3 dias de idade, filhotes das ratas tratadas com cafeína, independente da dose, apresentava-se pouco diferenciada e sem distinção entre as diferentes zonas, ao contrário do grupo controle, onde era

possível visualizar uma zona colunar e hipertrófica bem diferenciada. Nos filhotes das ratas tratadas com 25 e 50 mg/Kg de cafeína, a placa epifisária apresentava aparente redução da espessura da zona colunar. Mas, nos filhotes do grupo tratado com 100 mg/Kg de cafeína, as células da placa epifisária apresentam-se totalmente indiferenciadas e desorganizadas, com total indiferenciação das zonas (Fig. 6). A espessura da placa epifisária das vértebras lombares dos ratos de 3 dias de idade, somente do grupo tratado com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg apresentava-se significativamente menor em comparação ao grupo controle e com algumas lacunas vazias de condroblastos (Tab. 11, Fig. 6).

Tabela 11. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura da placa epifisária vertebral (mm) dos ratos de três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Variável	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Largura da placa epifisária	0,3988 $\pm$ 0,0156 A	0,3757 $\pm$ 0,043 AB	0,3229 $\pm$ 0,0556 BC	0,3059 $\pm$ 0,0378 C

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).



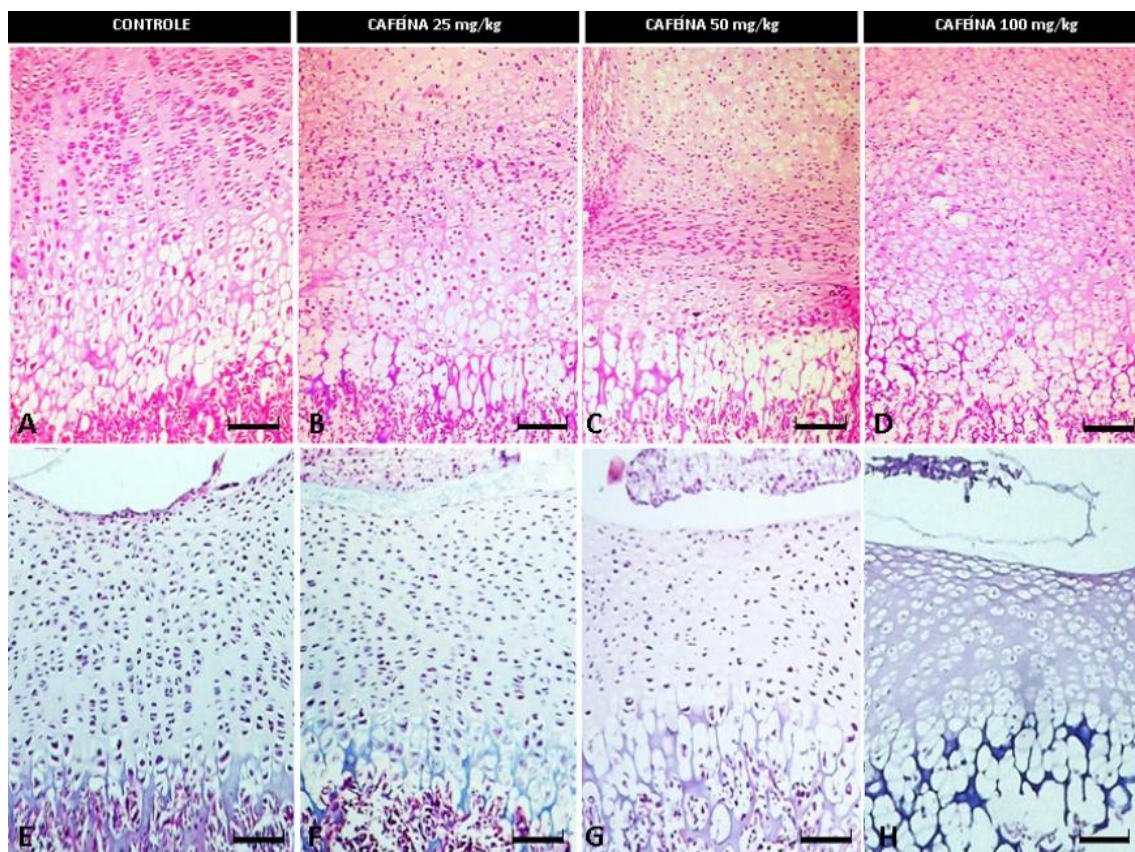


Figura 6. Ratos com três dias de idade. HE, Bar = 47,29  $\mu$ m. A, B, C e D) Placa epifisária da tíbia dos grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. A) Placa epifisária do grupo controle com as zonas (proliferação, diferenciação e hipertrofia) bem distintas. B, C) Zona de diferenciação estreita e pouco organizada em colunas. D) Indiferenciação das zonas de proliferação, diferenciação e hipertrofia. E, F, G e H) Placa epifisária vertebral dos grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. A espessura da placa epifisária vertebral do grupo tratado com cafeína nas doses de 50 e 100 mg é menor em comparação ao grupo controle.

Pela coloração de safranina O, todos os animais do grupo controle apresentaram a matriz cartilaginosa das placas epifisárias vertebrais e de ossos longos de coloração vermelha intensa, característica aparente da presença de glicosaminoglicanos. Três, quatro e quatro dos cinco animais dos grupos tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente apresentaram a

matriz cartilaginosa de coloração verde característica aparente da deficiência de glicosaminoglicanos. Os animais dos grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína que apresentaram a matriz cartilaginosa corada de vermelho, a intensidade foi menor em relação ao grupo controle, sugerindo aparente redução da quantidade de glicosaminoglicanos (Fig.7).

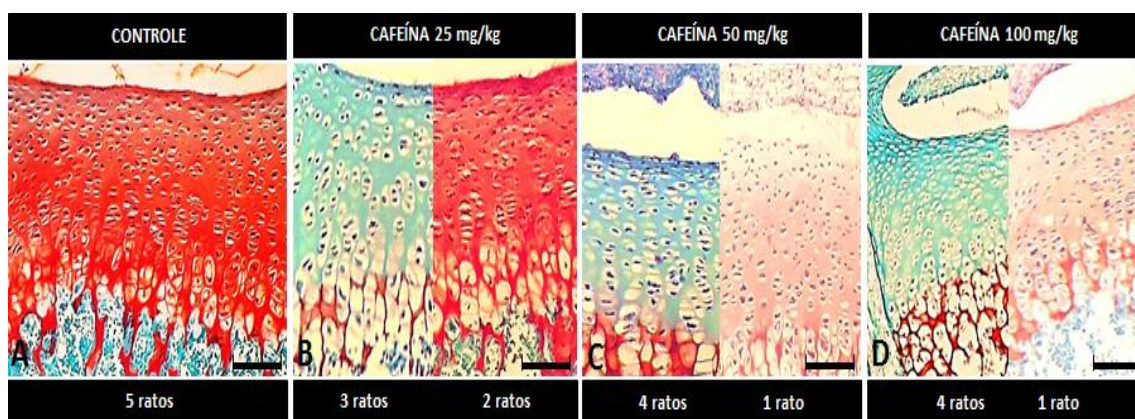


Figura 7. Placa epifisária vertebral de ratos com três dias de idade. Safranina O, Bar = 47,29  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína, respectivamente. Grupo controle com matriz cartilaginosa avermelhada como característica aparente da grande quantidade de glicosaminoglicanos. Nos grupos tratados com cafeína, três ou quatro dos cinco animais apresentam matriz cartilaginosa de coloração esverdeada, como característica aparente da deficiência no conteúdo de glicosaminoglicanos. Nos grupos tratados com 50 e 100mg/Kg de cafeína, as cartilagens que se coraram de vermelho apresentam coloração de menor intensidade em comparação ao grupo controle.

O tecido ósseo esponjoso primário da tíbia dos ratos de três dias de idade, filhotes das ratas tratadas com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg apresentava trabéculas ósseas delgadas e em número aparentemente reduzido, com pequena quantidade de coração condróide. A redução significativa da porcentagem de tecido ósseo trabecular foi confirmada pela análise morfométrica que foi significativamente menor nestes grupos em comparação ao controle. O grupo tratado com 25mg/Kg de cafeína apresentava o tecido ósseo esponjoso primário da tíbia com características semelhantes ao do grupo controle, o que foi

comprovado pela porcentagem de tecido ósseo trabecular que foi semelhante a do grupo controle (Tab. 12 e Fig. 8). Já com relação as vértebras lombares, a porcentagem de tecido ósseo trabecular no tecido ósseo esponjoso primário das vértebras lombares de todos os grupos tratados com cafeína foi significativamente menor em comparação ao grupo controle (Tab. 12, Fig. 8). Interessante, é que, independente do osso, todos os grupos tratados com cafeína apresentavam trabéculas revestidas por osteoblastos cuboidais, semelhantes ao grupo controle (Fig. 8).

Tabela 12. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de tecido ósseo trabecular no tecido ósseo esponjoso primário da tíbia proximal e nas vértebras lombares de ratos de três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Sítio ósseo	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Tíbia	39,812 $\pm$ 8,965 A	39,498 $\pm$ 14,138 A	22,968 $\pm$ 9,644 B	19,502 $\pm$ 1,902 B
Vert. lombar	43,796 $\pm$ 14,08 A	28,342 $\pm$ 7,773 B	31,566 $\pm$ 8,067 B	21,402 $\pm$ 2,436 B

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

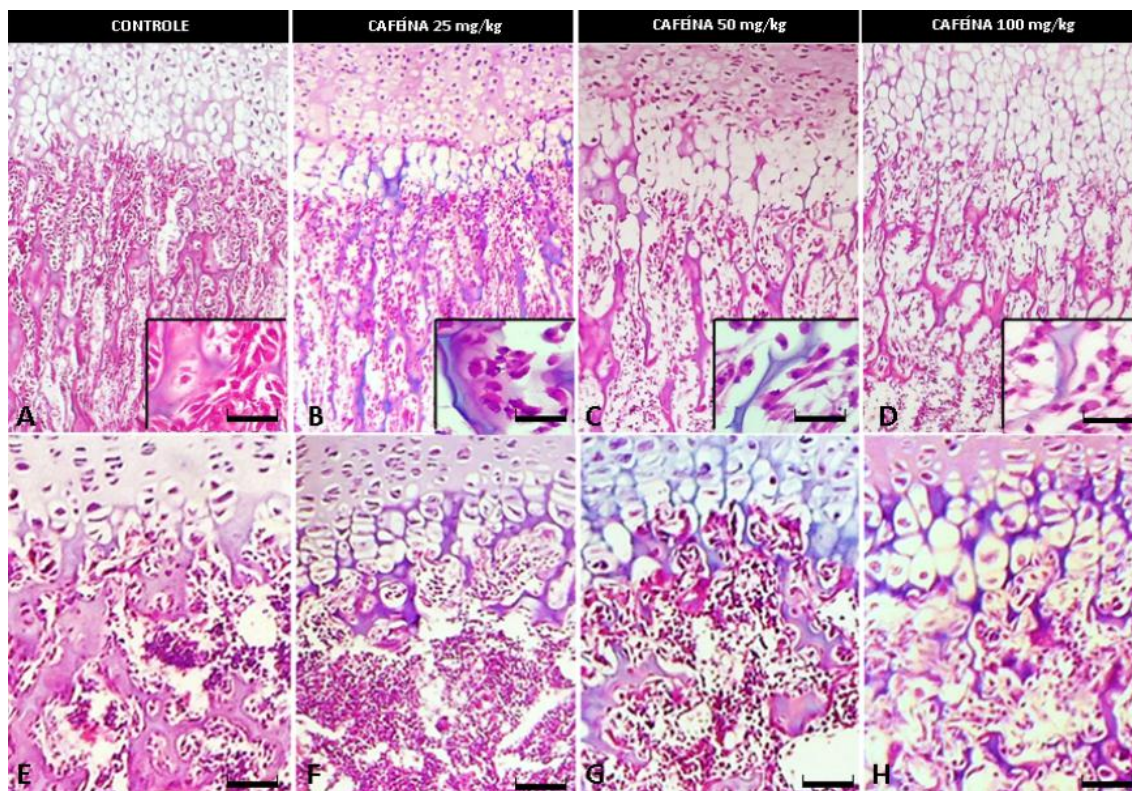


Figura 8. Rato com três dias de idade. HE, Barra = 94,59  $\mu$ m. A, B, C e D) Tecido ósseo esponjoso primário da tíbia dos ratos dos grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A quantidade de tecido ósseo trabecular nos grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg (C, D) é menor em Comparação ao grupo controle (A) e ao grupo tratado com cafeína 25 mg (B). E, F, G e H) Tecido ósseo esponjoso primário da vértebra dos ratos dos grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A quantidade de tecido ósseo trabecular nos grupos tratados com cafeína nas doses de 25 mg/Kg (B), 50 mg/Kg (C) e 100 mg/Kg (D) é menor em comparação ao grupo controle (A).

### ***Epífise cartilaginosa do fêmur e tíbia***

A proporção de lacunas de condroblastos em relação a matriz cartilaginosa foi semelhante entre os grupos, como pode ser comprovado pela porcentagem de lacunas de condroblastos e de matriz nas epífises cartilaginosas do fêmur e da tíbia dos ratos com três dias de idade, filhotes das ratas tratadas, que não diferiu significativamente entre os grupos (Tab. 13). No entanto, em todos os grupos de mães tratadas com cafeína, independentemente da dose, os filhotes apresentaram condroblastos

picnóticos e grande número de lacunas vazias de condroblastos como característica de degeneração e necrose. Nesses animais, a porcentagem de lacunas vazias de condroblastos nas epífises cartilaginosas do fêmur e da tíbia foi significativamente maior em todos os grupos tratados com cafeína, em comparação ao grupo controle. Mas, nos grupos tratados com 50 e 100mg/Kg de cafeína, que essas alterações foram ainda mais intensas e significativas, tanto nas epífises cartilaginosas do fêmur quanto da tíbia (Tab. 14 e Fig. 9 e 10).

Tabela 13. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas de condroblastos e de matriz nas epífises cartilaginosas da tíbia e do fêmur de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Variável	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Lacunas de condroblastos/fêmur	48,592 ± 15,195 A	56,395 ± 7,058 A	44,62 ± 14,643 A	49,0826 ± 20,182 A
Lacunas de condroblastos/ tíbia	46,27 ± 12,713 A	50,074 ± 8,913 A	50,892 ± 13,310 A	49,684 ± 6,854 A
Matriz/Fêmur	49,912 ± 16,802 A	50,574 ± 8,496 A	55,036 ± 14,53 A	50,904 ± 20,181 A
Matriz/Tíbia	53,88 ± 12,428 A	49,58 ± 9,405 A	49,086 ± 13,30 A	48,178 ± 7,119 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

Tabela 14. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas vazias em 100 células nas epífises cartilaginosas do fêmur e da tíbia de ratos com três dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Sítio ósseo	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Fêmur	7,00 ± 2,236 C	19,00 ± 11,113 B	29,6 ± 11,524 BC	55,00 ± 20,00 A
Tíbia	4,4 ± 2,408 C	21,8 ± 8,468 B	32,00 ± 7,036 B	58,25 ± 19,380 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

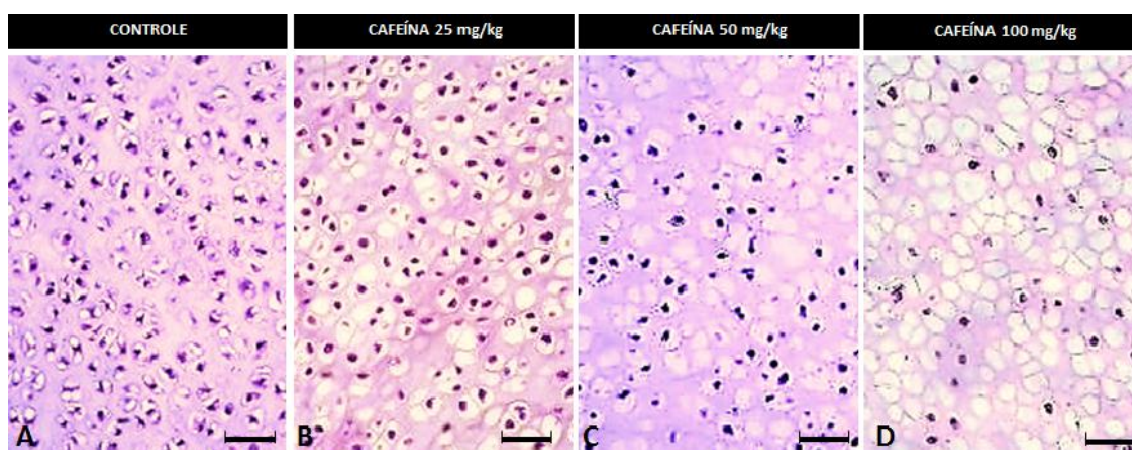


Figura 9. Epífises cartilaginosas do fêmur de ratos com três dias de idade. HE, Bar = 23,64  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Lacunas vazias de condroblastos presentes em todos os grupos tratados com cafeína, sendo os grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína aqueles que apresentam a maior quantidade de núcleos picnóticos e de lacunas vazias de condroblastos em comparação ao grupo controle.

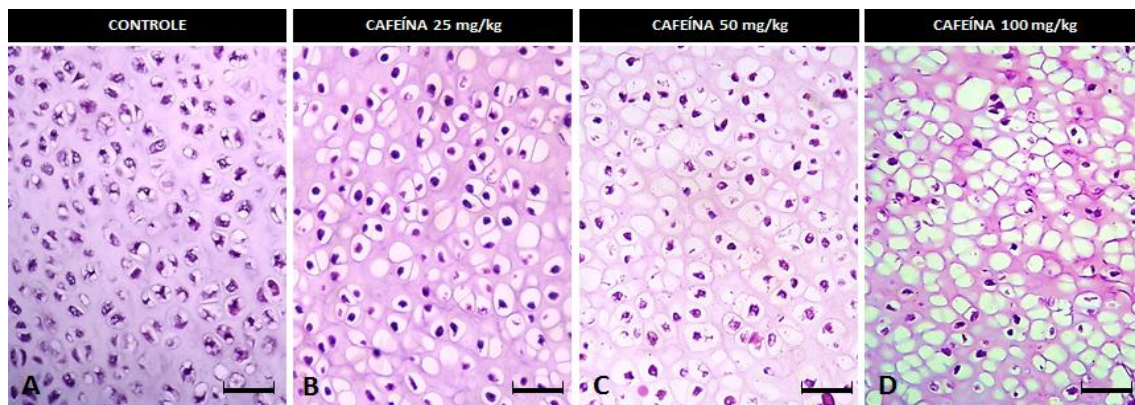


Figura 10. Epífises cartilaginosa da tíbia de ratos com três dias de idade. HE, Bar = 23,64  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Lacunas vazias de condroblastos presentes em todos os grupos tratados com cafeína, sendo os grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína aqueles que apresentam a maior quantidade de núcleos picnóticos e de lacunas vazias de condroblastos em comparação ao grupo controle.

As epífises cartilaginosa do fêmur e da tíbia de todos os ratos com três dias de idade do grupo controle apresentaram intensa coloração avermelhada, como característica aparente da grande quantidade de glicosaminoglicanos. Nos grupos tratados com cafeína, quatro dos cinco animais apresentaram matriz cartilaginosa de coloração esverdeada, o que caracteriza a

aparente deficiência no conteúdo de glicosaminoglicanos. Somente em um animal de cada um dos grupos tratados com cafeína, a matriz apresentou-se de coloração avermelhada, sendo que nos grupos tratados com 50 e 100mg/Kg de cafeína, a coloração vermelha foi de menor intensidade em comparação ao grupo controle (Fig. 11).

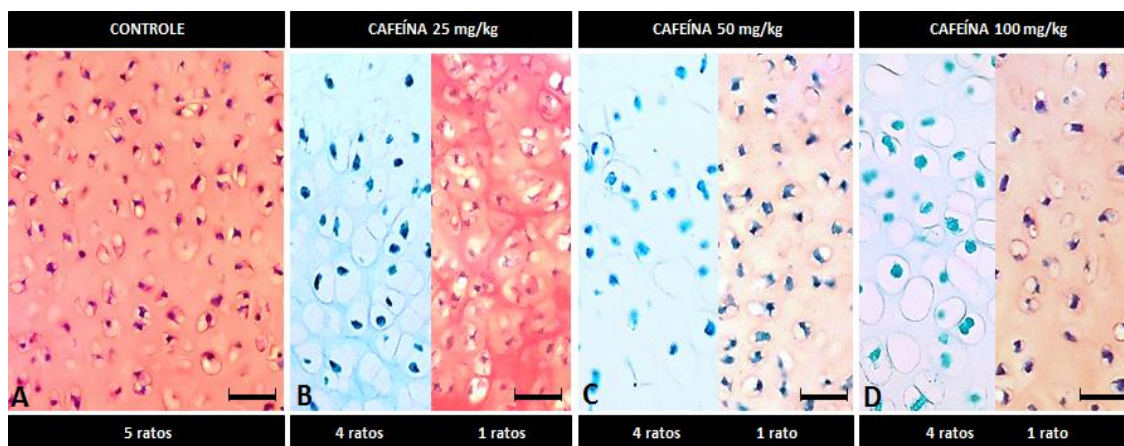


Figura 11. Epífises cartilaginosa do fêmur de ratos com três dias de idade. Safranina O, Bar = 23,64  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Grupo controle com matriz cartilaginosa avermelhada como característica aparente da grande quantidade de glicosaminoglicanos. Nos grupos tratados com cafeína, quatro dos cinco animais apresentaram matriz cartilaginosa de coloração esverdeada, como característica aparente da deficiência no conteúdo de glicosaminoglicanos. Um animal de cada um dos grupos tratados com cafeína com matriz de coloração avermelhada, sendo que nos grupos tratados com 50 e 100mg/Kg de cafeína, a coloração vermelha e de menor intensidade em comparação ao grupo controle.

### *Análise histomorfométrica dos ossos dos ratos com 21 dias de idade*

Tanto o fêmur, quanto o úmero e a tíbia apresentaram características de degeneração e de necrose, dependendo da dose de cafeína, localizadas principalmente na camada média da cartilagem articular. No grupo controle, a cartilagem articular dos ossos longos apresentou condroblastos bem diferenciados e com morfologia distinta em cada uma das camadas. Os condroblastos da zona superficial apresentavam volume nuclear e lacuna menor em comparação com as camadas média e profunda, onde os condrócitos apresentavam núcleo volumoso com cromatina frouxa e estavam alojados

dentro de lacunas amplas. Nos grupos tratados, mesmo com a menor dose de cafeína, os condrócitos apresentavam picnose nuclear que foi mais intensa e difusa nos grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína. Além disso, na dose de 100 mg/Kg, os filhotes apresentavam ainda grande quantidade de lacunas vazias de condrócitos (Fig. 12). A espessura da cartilagem articular somente foi significativamente maior no úmero de filhotes de ratas tratadas com 100mg/Kg de cafeína (Fig. 13 e Tab. 15). No entanto, o conteúdo de glicosaminoglicanos, observado pela coloração de safranina O, não diferiu entre os grupos (Fig. 14).

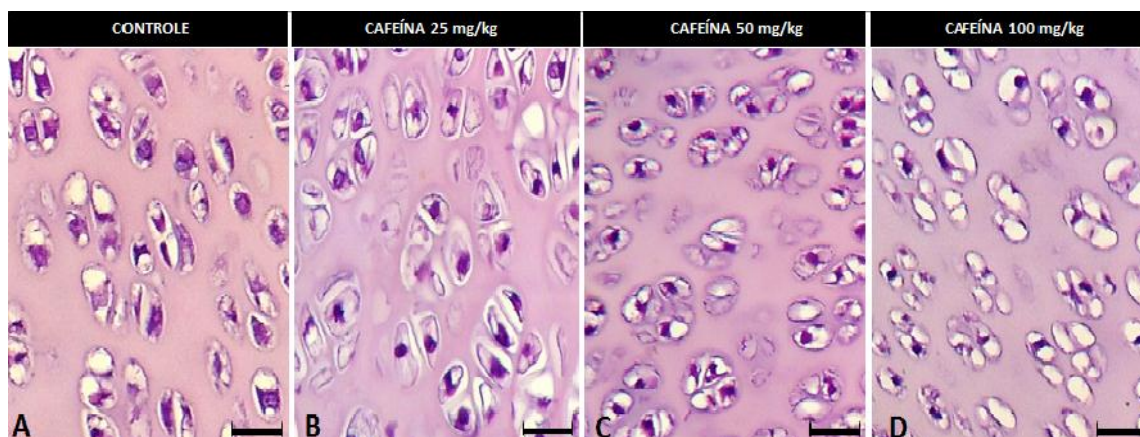


Figura 12. Zona média da cartilagem articular do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A) Números condrócitos com núcleos volumosos e com cromatina frouxa. B) Condrócitos com núcleos volumosos de permeio a núcleos picnoticos. C) Condrócitos com picnose nuclear. D) Condrócitos com picnose nuclear associados a lacunas desprovidas de núcleo.

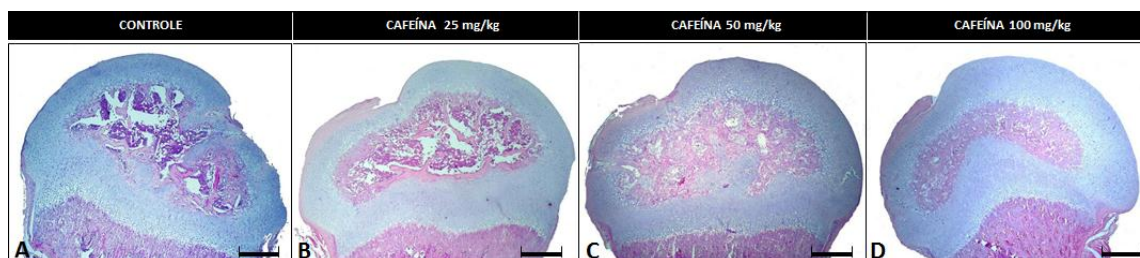


Figura 13. Cartilagem articular do úmero de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 236,51  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A espessura da cartilagem articular do grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg é maior em Comparação ao grupo controle e demais grupos.

Tabela 15. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura (mm) da cartilagem articular dos ossos longos (fêmur, tíbia, úmero) de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Sítio ósseo	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Fêmur	0,493 ± 0,074 A	0,523 ± 0,045 A	0,530 ± 0,089 A	0,565 ± 0,045 A
Úmero	0,379 ± 0,040 B	0,408 ± 0,037 B	0,385 ± 0,053 B	0,488 ± 0,094 A
Tíbia	0,474 ± 0,053 A	0,445 ± 0,800 A	0,472 ± 0,058 A	0,497 ± 0,075 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

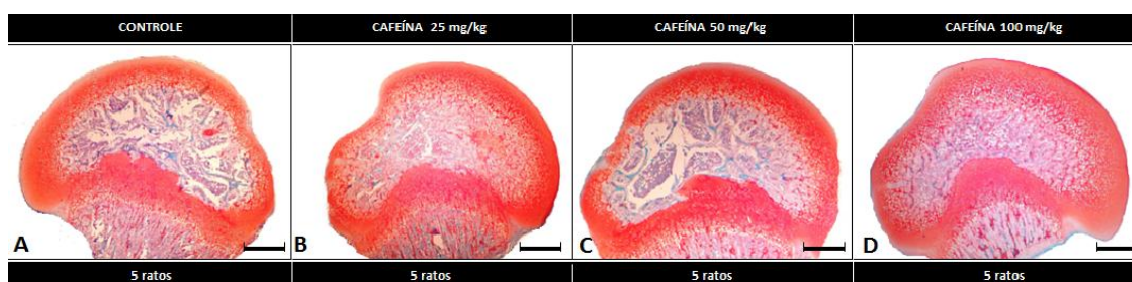


Figura 14. Cartilagem articular do úmero de ratos com 21 dias de idade. Safranina O, Bar = 236,51  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Todos os grupos tratados apresentam matriz cartilaginosa avermelhada como característica aparente da presença de glicosaminoglicanos, semelhante ao grupo controle.

A espessura da placa epifisária dos ossos longos e das vértebras dos ratos com 21 dias de idade, filhotes das ratas tratadas com cafeína nas diferentes doses não diferiu significativamente em comparação ao grupo

controle (Tab.16). Mas, a despeito disso, várias alterações foram observadas na morfologia da placa epifisária desses ossos, principalmente nas zonas de proliferação e na zona colunar ou de diferenciação.

Tabela 16. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da espessura (mm) da placa epifisária dos ossos longos (fêmur, tíbia, úmero) de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Sítio ósseo	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Fêmur (PE)	0,911 ± 0,191 A	0,905 ± 0,105 A	0,802 ± 0,137 A	0,857 ± 0,135 A
Tíbia (PE)	0,808 ± 0,106 A	0,758 ± 0,096 A	0,722 ± 0,049 A	0,768 ± 0,065 A
Úmero (PE)	0,539 ± 0,042 A	0,556 ± 0,064 A	0,509 ± 0,065 A	0,564 ± 0,117 A
VL1-3 (PE)	0,440 ± 0,068 A	0,444 ± 0,089 A	0,393 ± 0,060 A	0,436 ± 0,095 A
VL4-6 (PE)	0,485 ± 0,104 A	0,467 ± 0,079 A	0,436 ± 0,062 A	0,428 ± 0,062 A
VT1-7 (PE)	0,348 ± 0,055 A	0,336 ± 0,079 A	0,326 ± 0,066 A	0,290 ± 0,060 A
VT8-13(PE)	0,389 ± 0,065 A	0,326 ± 0,090 A	0,338 ± 0,070 A	0,331 ± 0,088 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

No grupo controle, a placa epifisária de todos os ossos, apresentava-se bem diferenciada e com distinta diferença na morfologia celular de cada uma das zonas. Na zona de proliferação, os condroblastos apresentavam-se com núcleos e lacunas volumosas, as vezes com nucléolo proeminente. No grupo tratado com 25 mg/Kg de cafeína, alguns condroblastos desta zona apresentavam picnose nuclear. Mas foram nos grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína, que as alterações foram mais pronunciadas. Os condroblastos apresentavam intensa picnose nuclear (Fig. 15) que se apresentava com distribuição multifocal ou difusa. Havia também focos de lacunas vazias de condroblastos como característica de necrose celular. Na zona de diferenciação da placa epifisária dos ossos longos e vértebras do grupo controle, os condrócitos apresentavam núcleos volumosos e dispostos em padrão de organização colunar. No entanto, nos grupos tratados com cafeína, os condrócitos apresentavam-se menos volumosos e com

picnose nuclear multifocal ou difusamente distribuída por toda essa zona. A zona de diferenciação dos grupos tratados também apresentava-se menos organizada, sem um padrão colunar tão bem definido quanto o do grupo controle e mais estreita. Todas essas características foram mais pronunciadas nos grupos tratados com 50 e 100 mg/Kg de cafeína (Fig. 16). A zona hipertrófica da placa epifisária apresentou morfologia semelhante entre os grupos com relação ao controle. Os condrócitos apresentavam lacunas amplas e núcleos ora volumosos, ora picnóticos com invasão vascular e pequena quantidade de matriz extracelular. Em nenhum dos animais dos grupos tratados foi observada a formação de placa óssea terminal distal como sinal de interrupção ou parada do crescimento endocondral (Fig. 17). Assim como na cartilagem articular, na placa epifisária, o conteúdo de glicosaminoglicanos, observado pela coloração de safranina O, não diferiu aparentemente entre grupos (Fig. 18).

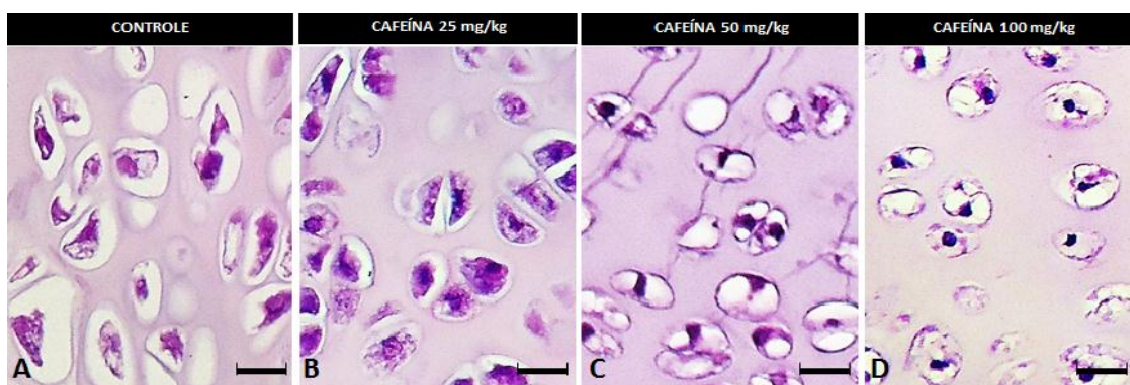


Figura 15. Zona de proliferação da placa epifisária do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente A) Números condrócitos com núcleos volumosos e de cromatina frouxa. B) Números condrócitos com núcleos volumosos com cromatina discretamente condensada. C) Condrócitos com núcleos picnóticos e com algumas lacunas vazias. D) Condrócitos com núcleos intensamente picnóticos e com algumas lacunas vazias.



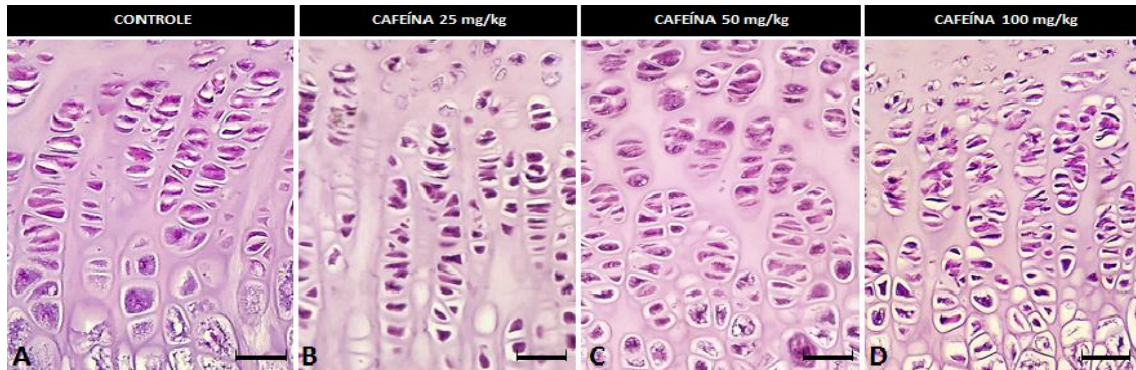


Figura 16. Zona colunar da placa epifisária do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. A) Condrócitos dispostos em colunas com núcleos volumosos e de cromatina frouxa. B) Condrócitos dispostos em colunas com núcleos menores em relação ao controle e com cromatina ligeiramente condensada. C) Condrócitos pobremente organizados em colunas e com núcleos pequenos e com cromatina discretamente condensada. D) Condrócitos com grande quantidade de núcleos picnóticos e achatamento da zona colunar.

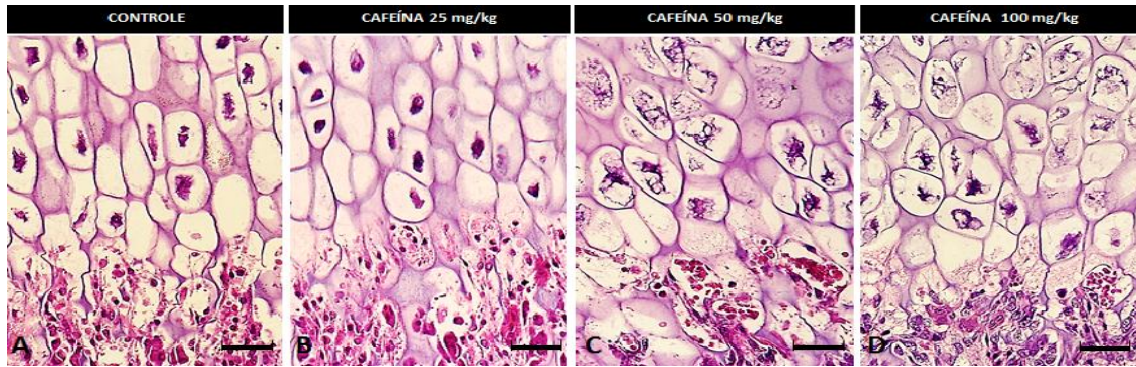


Figura 17. Zona hipertrófica da placa epifisária do fêmur de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 9,45  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente. Em todos os grupos, observa-se semelhança das características morfológicas, onde os condrócitos apresentam lacunas amplas, pouca matriz e invasão vascular regular.

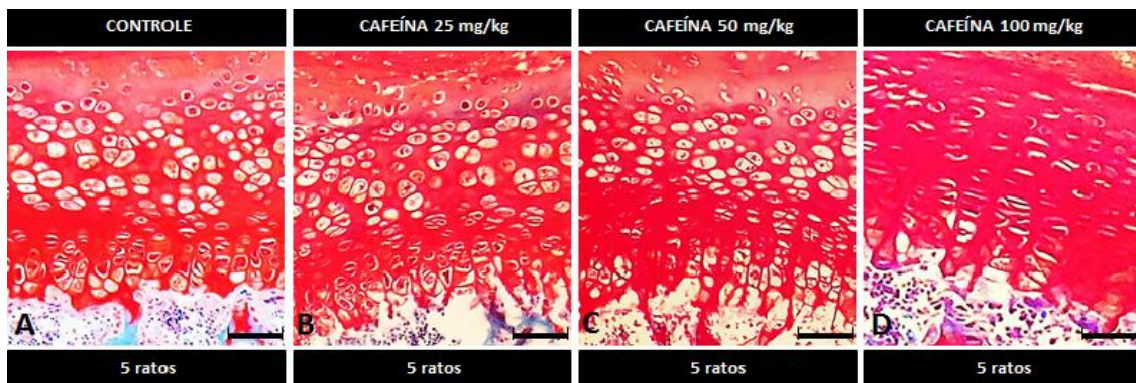


Figura 18. Placa epifisária das vértebras torácicas de ratos com 21 dias de idade. Safranina O, Bar = 47,29  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25,50 e 100 mg, respectivamente. Placa epifisária de todos os animais e de todos os grupos com a matriz cartilaginosa de coloração vermelha intensa, característica aparente da presença de glicosaminoglicanos.

A porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífise e no tecido ósseo esponjoso primário do fêmur, tíbia, úmero e das vértebras torácicas (8 a 13) e lombares (1 a 6) dos ratos com 21 dias de idade, filhotes das ratas tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg não diferiu significativamente em comparação ao grupo controle (Tab.17). Já a porcentagem de tecido ósseo trabecular nas vértebras torácicas no segmento de 1 a 7 dos filhotes das ratas tratadas com 50 e 100 mg/Kg de cafeína foi significativamente menor em comparação ao grupo controle

(Tab.17, Fig.19). Nesses grupos, as trabéculas estavam presentes em menor número e menos conectadas entre si. A morfologia dos osteoblastos e dos osteócitos não diferiu entre grupos. Os osteócitos apresentavam-se ora volumosos e alojados em lacunas alargadas, ora com núcleos pequenos dentro de lacunas estreitas. No entanto, os osteoblastos eram sempre volumosos dispostos em uma ou mais camadas revestindo toda a superfície trabecular (Fig. 20).

Tabela 17. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífises e esponjosa primaria dos ossos longos e das vértebras de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Sítio ósseo	Controle	Cafeína 25mg/Kg	Cafeína 50mg/Kg	Cafeína 100mg/Kg
Fêmur-Epífise	23,51 ± 7,50 A	27,65 ± 6,74 A	25,13 ± 0,47 A	23,34 ± 0,003 A
Fêmur-Metáfise	35,42 ± 9,49 A	30,65 ± 6,03 A	30,79 ± 4,04 A	30,77 ± 5,820 A
Tíbia-Epífise	27,94 ± 9,34 A	24,08 ± 5,22 A	24,42 ± 6,65 A	21,82 ± 9,840 A
Tíbia-Metáfise	34,55 ± 3,77 A	38,81 ± 14,75 A	35,59 ± 5,94 A	35,80 ± 5,980 A
Úmero-Epífise	30,98 ± 14,52 A	23,99 ± 10,19 A	24,96 ± 5,47 A	25,99 ± 4,320 A
Úmero-Metáfise	34,14 ± 3,23 A	34,25 ± 5,39 A	33,24 ± 10,16 A	35,80 ± 8,380 A
VL1-3	24,14 ± 2,61 A	28,93 ± 18,06 A	22,89 ± 9,04 A	19,65 ± 8,73 A
VL4-6	26,53 ± 7,83 A	19,50 ± 7,03 A	20,12 ± 5,92 A	20,40 ± 7,93 A
VT1-7	31,62 ± 9,17 A	28,44 ± 8,76 AB	22,13 ± 5,88 B	18,31 ± 4,22 B
VT8-13	24,61 ± 5,68 A	18,21 ± 5,63 A	21,26 ± 4,68 A	22,44 ± 3,57 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

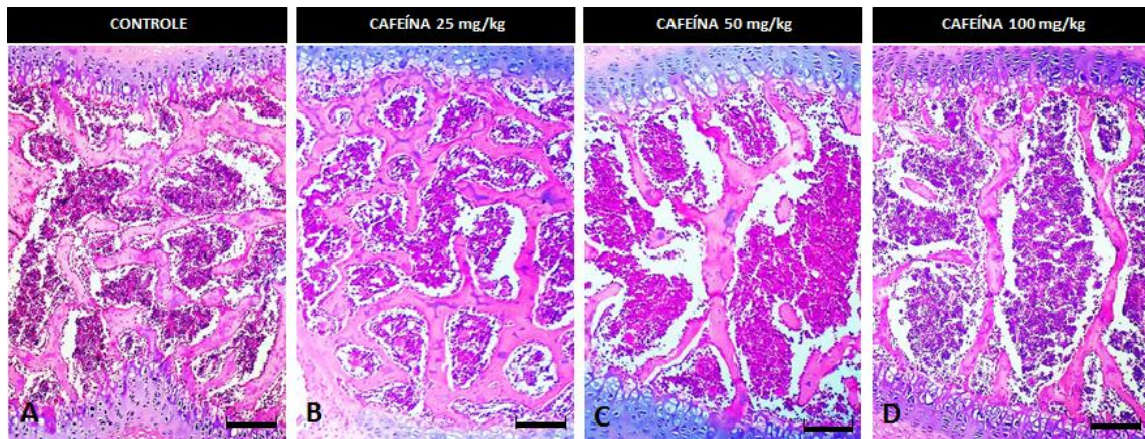


Figura 19. Tecido ósseo esponjoso primário da vértebra torácica 1-7 de ratos com 21 dias de idade. HE, Bar = 94,59  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25, 50 e 100 mg, respectivamente. A porcentagem de tecido ósseo trabecular nos grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg é menor em comparação ao grupo controle.

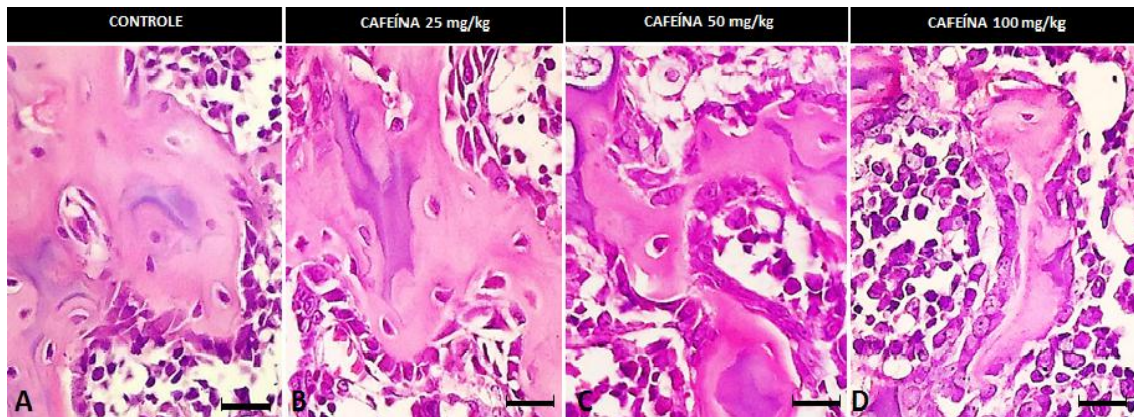


Figura 20. Trabécula óssea da vértebra torácica 1-7 de ratos com 21 dias de idade. HE. A, B, C e D) Grupos controle e tratados com cafeína 25,50 e 100 mg, respectivamente. Em todos os grupos, o revestimento osteoblástico é uniforme e formado por osteoblastos voluminosos dispostos em uma ou mais camadas. Barra = 9,45  $\mu$ m.

## Experimento 2

### Análise histomorfométrica dos fêmures

Tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com cafeína, a morfologia dos condroblastos foi semelhante durante a maior parte do período de cultivo. A porcentagem de lacunas vazias de condroblastos nas epífises cartilaginosas do fêmur foi aumentando significativamente ao longo do tempo de cultivo. Já a

porcentagem de lacunas de condroblastos com núcleos picnóticos aumentou no dia sete de cultivo, mantendo-se assim até os 21 dias de cultura em comparação ao dia zero. No entanto, aos 21 dias de cultivo o grupo tratado com cafeína apresentou número de lacunas vazias de condroblastos significativamente menor em comparação ao grupo controle (Tab. 18 e 19 e Fig. 21).

Tabela 18. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas vazias de condroblastos nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	6,26 ± 6,61C a	13,37± 11,0C a	36,8± 11,7 B a	50,7±15,56 A a
Cafeína	6,26 ± 6,61C a	28,5±9,57 B b	45,4± 8,81A a	24,2 ± 7,56B b

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

Tabela 19. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de lacunas de condroblastos com núcleo picnótico nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	9,40 ±4,036 B a	23,37±10,18 A a	19,25±5,47 A a	30,57±12,16 A a
Cafeína	9,40 ±4,036B a	17,4 ± 10,32A a	24,71±7,95A a	28,7± 13,12A a

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

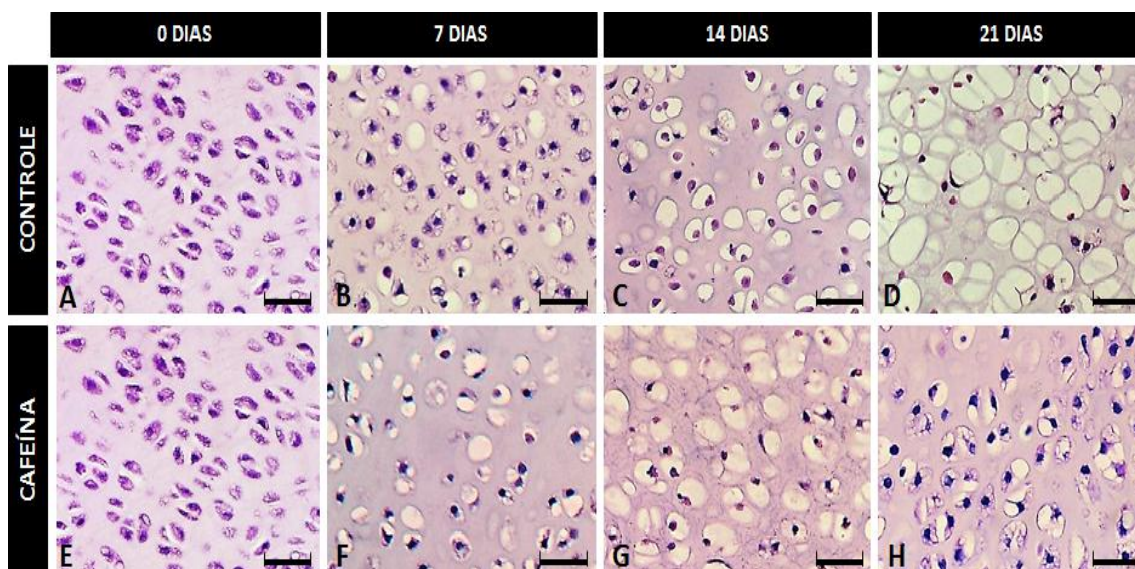


Figura 21. Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). HE, Bar =23, 64 µm. A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. Grupos controle e tratado com cafeína com aumento gradativo do número de lacunas vazias de condroblastos ao longo de todo o período de cultivo em Comparação ao dia 0. Aos 21 dias de cultivo, grupo tratado com cafeína apresentando menor número de lacunas vazias de condroblastos em Comparação ao controle no mesmo período.

Pela coloração de safranina O, no dia zero, as epífises apresentavam matriz fortemente corada de vermelho. Mas, todas as epífises do grupo controle apresentaram redução da intensidade da coloração aos 21 dias de cultivo em comparação ao dia zero.

Redução semelhante também foi observada no grupo tratado com cafeína, exceto em uma epífise que apresentou coloração vermelha de intensidade semelhante a do dia zero (Fig.21).

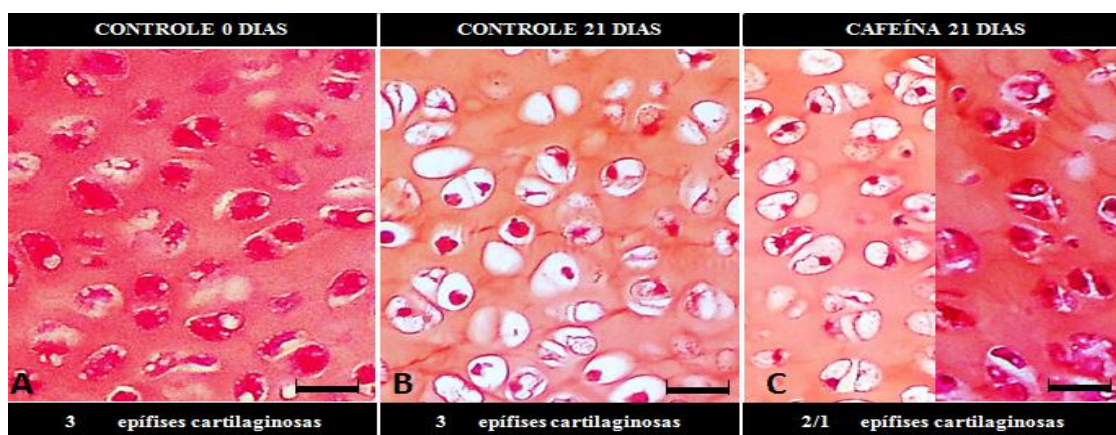


Figura 22. Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). Safranina O, Bar = 9,45  $\mu$ m. A, B, C) Grupo controle no tempo zero de cultivo, grupo controle com 21 dias de cultivo e grupo tratado com cafeína com 21 dias de cultivo, respectivamente. Matriz cartilaginosa intensamente avermelhada com redução da intensidade de coloração aos 21 dias de cultivo em ambos os grupos, com exceção de uma epífise que apresentou coloração vermelha de intensidade semelhante a do dia zero.

### Atividade proliferativa

No grupo controle, a taxa de proliferação celular, caracterizada pela expressão de CDC-47, reduziu significativamente ao longo de todo o período de cultivo em comparação ao dia 0. No grupo tratado com

cafeína, a taxa de proliferação celular também reduziu significativamente aos 7 dias em comparação ao dia 0, mas manteve-se assim até os 21 dias de cultivo. Apesar de maior no grupo tratado com cafeína, não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos períodos (Tab.20, Fig.23).

Tabela 20. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da porcentagem de condroblastos com expressão de CDC-47 nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	384,62 $\pm$ 28,15 A a	245,4 $\pm$ 82,4B a	267,87 $\pm$ 46,7 B a	162 $\pm$ 37,86 C a
Cafeína	384,62 $\pm$ 28,1A a	283,7 $\pm$ 98,8B a	248,5 $\pm$ 57,64B a	228,6 $\pm$ 65,16B a

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

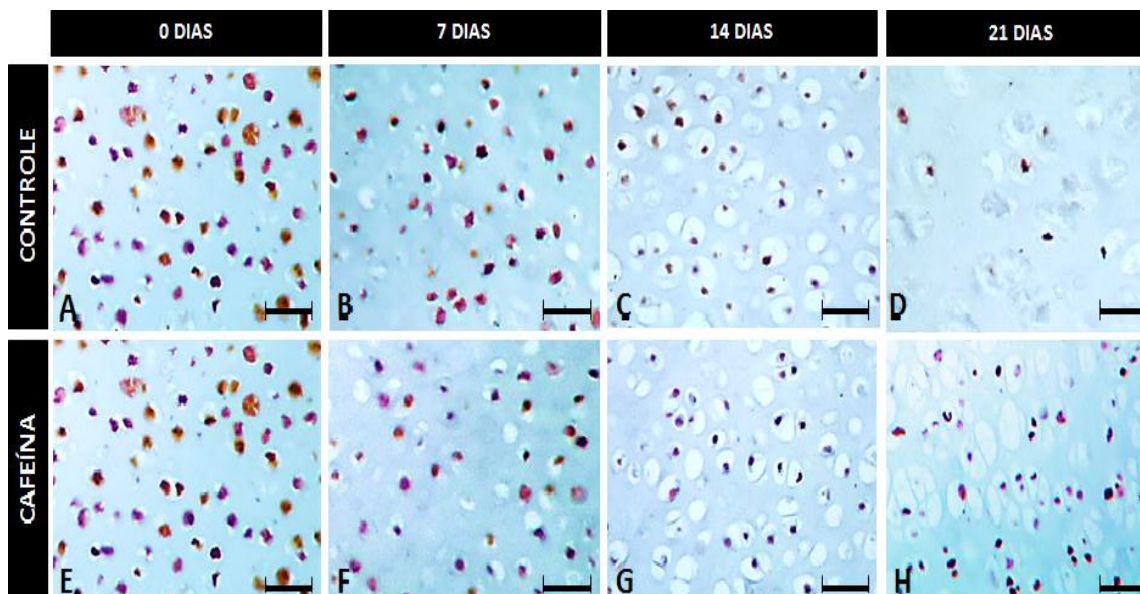


Figura 23. Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). Estreptavidina-biotina-peroxidase, contracoloração pelo *Metil green*. Bar = 23, 64  $\mu\text{m}$ . A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. Grupos controle e tratado com cafeína com redução de núcleos de condroblastos com expressão de CDC-47, em marron, ao longo de todo o período de cultivo em Comparação ao dia 0.

### ***Número de corpos apoptóticos pela técnica de Túnel***

Tanto no grupo controle, quanto no grupo tratado com cafeína, o número de corpos apoptóticos aumentou significativamente

durante todo o período de cultivo. No entanto, aos sete e 21 dias de cultivo a apoptose foi mais intensa nas epífises cartilaginosas cultivadas com cafeína (Tab.21, Fig.24).

Tabela 21. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística do número de condroblastos apoptóticos/campo marcado pela técnica de Túnel nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Grupo	Dia 0	7 dias	14 dias	21 dias
Controle	20,6 $\pm$ 8,12 D a	95,18 $\pm$ 21,32 C b	198,33 $\pm$ 61,34B a	262,95 $\pm$ 54,28 A b
Cafeína	20,6 $\pm$ 8,12 D a	171,71 $\pm$ 59,39 C a	224,51 $\pm$ 36,623 B a	360,55 $\pm$ 54,49A a

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

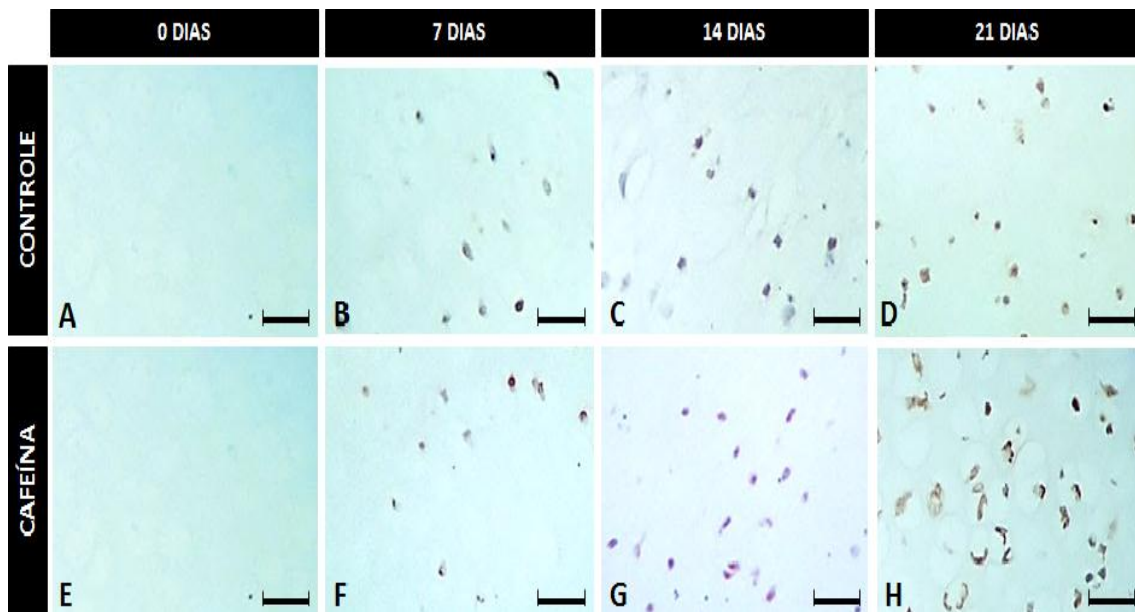


Figura 24. Epífise cartilaginosa de ratos neonatos cultivado em meio com ou sem cafeína (controle). Técnica de túnel, contra-coloração pelo *Metil green*. Bar = 23, 64  $\mu$ m. A, B, C e D) Grupo controle no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. E, F, G e H) Grupo tratado com cafeína no tempo 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo, respectivamente. Grupos controle e tratado com cafeína com aumento gradativo do número de condroblastos apoptóticos, em marron, ao longo de todo o período de cultivo em Comparação ao dia 0. Aos 21 dias de cultivo, grupo tratado com cafeína apresentando maior número de condroblastos apoptóticos em Comparação ao controle no mesmo período.

### ***Expressão de transcriptos gênicos para caspase-3, Runx-2 e Sox-9***

Semelhante ao número de corpos apoptóticos, a expressão de caspase-3 também aumentou significativamente em ambos os grupos aos 21 dias de cultivo em comparação ao dia 0. No entanto, aos 21 dias, a expressão do transcripto gênico para caspase-3 foi significativamente maior no grupo tratado com cafeína em comparação ao grupo controle neste mesmo período (Tab.22).

Somente no grupo tratado com cafeína, a expressão de Sox-9 aumentou significativamente aos 21 dias de cultivo em comparação ao dia 0, sendo também maior em comparação ao grupo controle aos 21 dias de cultivo (Tab.22).

A expressão de Runx-2 reduziu significativamente no grupo controle aos 21 dias de cultivo, em comparação ao dia 0. Mas, no grupo tratado com cafeína, a expressão de Runx-2, aos 21 dias, não diferiu em relação ao dia 0, mas foi significativamente superior a do grupo controle (Tab.22).

Tabela 22. Média, desvio-padrão e resultado da análise estatística da expressão de transcriptos gênicos para caspase-3, Runx-2 e Sox-9 pela técnica de RT-PCR tempo real nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle) no dia 0 e aos 21 dias de cultivo.

Transcriptos Gênicos	Controle Dia 0	Controle 21 dias	Cafeína 21 dias
Caspase	0,804±0,09 B	2,04±1,34 B	4,22±2,09 A
Sox-9	1,45 ± 1,58 B	2,72±1,22 B	8,35±3,36 A
Runx-2	0,87 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,35± 0,11B	0,73±0,22 A

\*Médias com letras maiúsculas iguais na linha ou letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste Student Newman Keuls (SNK) ( $P \geq 0,05$ ).

### Discussão

As concentrações plasmáticas de cortisol das mães aos 21 dias de lactação foram maiores apenas no grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg em comparação ao grupo controle. A elevação do cortisol pode ser explicada uma vez que a cafeína, por ser um agente farmacológico psicoativo, atua no sistema nervoso (Fisone et al., 2004), liberando dopamina e elevando consequentemente os níveis de glicocorticóides (Lovallo et al., 2005). A cafeína também pode aumentar a secreção de cortisol, por agir diretamente no hipotálamo ou por estimular indiretamente a liberação de epinefrina pela adrenal. A existência destes mecanismos de ação tem implicações importantes para a capacidade da cafeína de interagir com o estresse comportamental (Lovallo, et al., 1989). Elevados níveis de cortisol nas mães podem ainda passar para os filhotes através da placenta e do leite (Swolin-Eide et al., 2002; Glynn et al., 2007). Assim, não se pode afastar a possibilidade do cortisol ser um fator contribuinte para as alterações encontradas em filhotes durante o crescimento cujas mães receberam cafeína na dose de 100 mg/Kg durante a gestação e lactação. Mas, é importante salientar que este não seria o principal mecanismo pelo

qual a cafeína compromete o crescimento endocondral, uma vez que as doses de 25 e 50 mg/Kg também foram capazes de alterar o crescimento ósseo apesar dos níveis de cortisol das mães serem estatisticamente semelhantes aos do grupo controle.

As malformações apresentadas pelos filhotes das ratas tratadas com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg como sindactilia, braquidactilia e malformação do crânio também já foram descritas previamente como consequência do consumo de cafeína. Assim como as alterações observadas nos filhotes deste estudo, a fenda palatina, ausente em todos os animais, tem sido apontada como frequente por outros pesquisadores (Palm et al., 1978; Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991).

A cafeína tem sido apontada como um agente teratogênico em ratos e camundongos, porém em doses bem superiores aquelas utilizadas no presente estudo (250 mg/Kg) e por administração parenteral (Elmazar et al., 1981 apud Sivak, 1994; Collins et al., 1984). Há estudos que relatam que a administração de cafeína por via oral durante a gestação não causa alterações teratogênicas (Palm et al., 1978; Elmazar et al., 1982 apud Sivak, 1994; Collins et al., 1983). O presente estudo



discorda dessa assertiva, comprovando a existência de alterações teratogênicas com o uso de doses menores de cafeína administradas por via oral. Em gestantes, a cafeína atravessa facilmente a barreira placentária e é veiculada ainda pelo leite materno, podendo ser encontrada no líquido amniótico, no sangue do cordão umbilical e no plasma e urina dos neonatos. A meia vida da cafeína aumenta durante a gestação, e esse aumento é coincidente com o período de maior desenvolvimento fetal. Por isso, o acúmulo dessa substância na mãe representa um risco potencial para a saúde do feto (Brooke et al., 1989; Fenster et al., 1991) podendo também ser responsável pela ocorrência de malformações.

Os potenciais genotóxico e mutagênico da cafeína têm sido relatados e estudados ao longo dos tempos (Haynes e Collins, 1984; Choudhury e Palo, 2004). A possível incorporação da cafeína ao material genético pode alterar os mecanismos de replicação celular, diminuindo a fase G2 da mitose e, conseqüentemente, reduzindo o tempo destinado ao reparo de danos no cromossomo (Mulvihill, 1973; Selby e Sancar, 1990), aumentando assim a probabilidade de ocorrência de anomalias. Embora a cafeína seja mutagênica em organismos inferiores e sistemas celulares simples, seu efeito mutagênico em humanos é ainda incerto (Dambrosio, 1994).

Outro possível mecanismo de ação pelo qual a cafeína pode causar efeitos teratogênicos é sobre a regulação da via apoptótica, por inibição ou indução inapropriada desta via, o que pode, durante a esqueletogênese, resultar em malformações craniais e de membros como a sindactilia, a polidactilia e a presença de membros fendidos (Bursch et al., 1992, Kimura et al., 1996). Uma hipótese para explicar a sindactilia, apresentada pelos ratos de 3 dias de idade deste estudo, seria um atraso da via apoptótica, uma vez que aos 21 dias de idade os animais não apresentavam mais

sindactilia, com abertura completa das pregas interdigitais. Ao contrário do encurtamento dos dígitos, que pode ser explicado pela inibição do crescimento, a sindactilia não parece ter relação com as alterações ósseas.

Dentre os fatores externos que afetam a via apoptótica, as drogas psicoativas têm grande importância, pois em células cancerígenas, neuronais e epidérmicas, essas drogas apresentam efeitos diretos sobre o ciclo celular, agindo sobre a proteína p53 ou ativando a protease pró-apoptótica caspase-3 de forma a induzir morte celular programada (Moallem e Hales, 1998; Kang et al., 2002, Lu et al., 2004). No osso, o mecanismo pelo qual a cafeína causa alterações teratogênicas e sua correlação com a via apoptótica ainda não está claro. Porém para a morfogênese do crânio e dos membros, é necessária a ocorrência de proliferação e apoptose que devem ser coordenadas pela atuação de reguladores chaves como as BMPs, FGFs, ácido retinóico e MSX2 (Hock et al, 2001; Guha et al., 2002; Marazzi et al., 2002; Zuzarte-Luís e Hurlé, 2002). Assim, cabe esclarecer se algum descontrole da síntese ou liberação desses fatores poderia participar da gênese das alterações teratogênicas causadas pela cafeína.

Na análise comparativa do número de filhotes nascidos e da percentagem de filhotes mortos ao final do experimento, observa-se que não houve diferença significativa entre os grupos. No terço inicial da lactação houve nítido aumento de mortes de filhotes nos grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg, sendo que três mães apresentaram 100% de mortalidade da ninhada, o que demonstra variação individual aos efeitos da cafeína sobre este parâmetro. Nesses animais, a mortalidade ocorreu porque as glândulas mamárias das mães não se desenvolveram e os filhotes provavelmente morreram de inanição por agalaxia (dados não demonstrados). Alterações nas células

mioepiteliais da glândula mamária ou elevados níveis de cortisol (Gudjonsson et al., 2005) poderiam também levar a inanição da ninhada em decorrência de retenção de leite por falha na ejeção (Stelwagen et al., 1998; Shamay et al., 2000). Mas, neste caso a glândula mamária apresentaria lúmens repletos de secreção com gotas citoplasmáticas de lipídeos (Plante et al., 2010), ao contrário do que foi observado, no qual a glândula mamária apresentou-se hipodesenvolvida e com morfologia incompatível com o período lactacional, onde espera-se a presença de lúmens repletos de secreção e epitélio cuboidal, o contrário do que foi observado (dados não demonstrados).

Estudos relatam que a ingestão crônica de altas doses de cafeína diminui o período gestacional, aumenta o número de reabsorção fetal afetando o tamanho da ninhada e induz mortalidade em filhotes durante os primeiros estágios da lactação. Postula-se que tais alterações ocorram possivelmente, pelos efeitos tóxicos da cafeína adquiridos pelo leite materno ou pela alta sensibilidade a quaisquer agentes nesse estágio (Nagasawa e Sakurai, 1986). No entanto, o presente estudo demonstra que não houve diferença significativa entre grupos no que concerne a taxa de natalidade e que a cafeína alterou somente o peso dos filhotes.

O consumo crônico de altas doses de cafeína (50 e 100 mg/Kg) pela rata durante o período de gestação e lactação afetou o peso dos seus filhotes. Pesquisas demonstraram que, tanto baixas doses (4 mg/dia) de cafeína em ratos, quanto doses superiores a 300 mg/dia em humanos também podem reduzir o peso corporal da prole (Gilbert et al., 1973; Vlajinac et al., 1997). É provável que, a cafeína interfira com o equilíbrio entre os fatores intrínsecos feto-materno-placentários comprometendo a formação e o crescimento fetal e consequentemente o peso ao nascimento (Neelam, 2009). Postula-se que

o efeito vasoconstritor da cafeína, via aumento das catecolaminas, pode influenciar o desenvolvimento placentário, diminuindo o suprimento fetal de oxigênio (Kirkinen et al., 1983; Nehlig e Debry, 1994). É provável que a cafeína ainda cause outras alterações placentárias importantes que necessitam ser esclarecidas e que justifiquem o baixo peso ao nascimento. O período gestacional nas ratas tratadas com 50 e 100mg/Kg de cafeína foi de um dia a menos em comparação ao grupo controle (dados não demonstrados). Essa também pode ser uma das razões para explicar o menor peso ao nascimento dos filhotes destes grupos.

Outra hipótese que não explica o baixo peso ao nascimento, mas que pode explicar o menor peso dos filhotes dos grupos tratados ao desmame é a redução da qualidade nutritiva do leite, uma vez que a cafeína pode reduzir o conteúdo de cobre, zinco e ferro do leite (Rossowska et al., 1997) e consequentemente o desenvolvimento do filhote. Outra hipótese seria uma alteração da palatabilidade do leite materno, já que a palatabilidade da ração de animais de produção pode ser afetada pela adição de cafeína, diminuindo sua ingestão, e consequentemente o peso dos animais (Li et al., 1995).

Os níveis elevados de cortisol sanguíneo nas mães tratadas com a dose mais elevada (100 mg/Kg) de cafeína podem ter contribuído para o baixo peso dos filhotes, uma vez que altos níveis desse hormônio afetam o comportamento dos animais (Glynn et al., 2007), elevam o nível de estresse, tanto materno quanto fetal (Chen et al., 1998; Glynn et al., 2007), diminuindo a receptividade entre a mãe e o filhote. O cortisol por passar tanto pela placenta quanto pelo leite, também pode afetar a formação e o crescimento endocondral dos filhotes, uma vez que exerce efeito negativo sobre a esqueletogênese (Swolin-Eide et al., 2002; Glynn et al., 2007). Mas, como as concentrações plasmáticas de cortisol das

mães após o desmame foram maiores apenas no grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg em comparação com os demais grupos tratados e controle, postula-se que esse possa ser um mecanismo a mais para explicar o baixo peso somente neste grupo.

No grupo tratado com 100 mg/Kg de cafeína, além do efeito direto da cafeína, o cortisol elevado no plasma também pode passar para o feto intensificando os efeitos da cafeína. O cortisol elevado pode afetar o feto por meio de pelo menos duas possíveis vias. Na primeira via, o cortisol materno atravessa diretamente a placenta e no feto, age sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário (Diego et al., 2006). A exposição fetal ao cortisol elevado, oriunda diretamente da mãe e indiretamente da hiperativação do eixo hipotalâmico-hipofisário fetal, pode, então, afetar o crescimento fetal, aumentando o gasto calórico fetal através da atividade neuromuscular aumentada e da glicogenólise (Orner, 1986; Seckl e Meaney, 2004). Na segunda via, o cortisol materno atravessa a placenta e afeta a regulação do hormônio relacionado a corticotropina placentária, levando a hiperperusão da placenta e resultando em redução do fluxo sanguíneo para o feto (Jones et al., 1989; Donoghue et al., 2000).

Os resultados demonstram que a cafeína, principalmente nas doses de 50 e 100 mg/Kg comprometeu significativamente o crescimento endocondral, resultando na dose de 25 mg/Kg em alterações de menor intensidade. Como os ratos de 3 dias de idade também apresentaram alterações decorrentes da cafeína, postula-se que a formação óssea endocondral também pode ter se alterado. Pode-se afirmar que tenha ocorrido retardo no crescimento sem no entanto ocorrer parada total do mesmo já que não houve a formação da placa óssea terminal distal abaixo da placa epifisária. Também não houve momentos de interrupção e retomada do crescimento, uma vez que não foram observadas trabéculas

ósseas transversas na metáfise. Interessante é que o crescimento foi alterado provavelmente por redução na sua velocidade. A indiferenciação celular e as alterações degenerativas e até a morte celular observadas nas cartilagens articulares são as prováveis causas da redução do crescimento. Esta redução do crescimento já havia sido constatada por outros pesquisadores que relataram que a cafeína interfere com o crescimento ósseo já que os filhotes de ratas tratadas com cafeína são menores (Huang et al., 2002) e pelo implante de fragmentos de osso desmineralizado no tecido subcutâneo de ratos, onde houve inibição da condrogênese pela redução da expressão de colágeno II, histona e TGF beta (Barone et al., 1993). Mas, esse parece ser o primeiro estudo que relata com detalhes as alterações morfológicas do tecido cartilaginoso em crescimento causadas pela cafeína.

Suspeita-se que a cafeína possa inibir a formação óssea endocondral nas fases iniciais da proliferação das células mesenquimais indiferenciadas em células cartilaginosas (Tassinari et al., 1991; Barone et al., 1993). Como os ratos de três dias de idade, filhos de ratas tratadas com cafeína apresentaram membros mais curtos, postula-se que a cafeína possa interferir na formação do modelo de condensação condrogênica intra-uterino. Nesse modelo de condensação condrogênica, o tamanho e o formato do botão do membro em crescimento são definidos através de um balanço entre a ativação local (agregação autocatalítica de condrocitos) e o mecanismo de inibição lateral que limita a agregação durante o período de formação do esqueleto no útero. Quando o mecanismo de inibição lateral se sobrepõe a ativação local ocorre uma limitação da agregação das células culminando em um modelo menor (Oster et al., 1988). Mais estudos são necessários para comprovar se a cafeína de fato interfere nessa etapa da formação óssea. Sabe-se que fatores como as BMPs, Sox-9 e outros

fatores de crescimento como FGFs têm sido localizados nas áreas de início das condensações mesenquimais, regulando sua forma e tamanho (Duprez et al., 1996; Urist, 1997; Vortkamp, 1997; Bi et al., 1999; Huang et al., 2001; Wang et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Chen e Deng, 2005; Tsumaki, et al., 2005; Yu e Ornitz, 2007) e que merecem ser pesquisados em animais vítimas dos efeitos negativos da cafeína.

A expressão dos fatores descritos anteriormente também pode desempenhar papel importante na diferenciação, maturação e/ou apoptose de condrócitos (Anderson et al., 2000; Tsumaki, et al., 2005). Alguns pesquisadores postulam que o retardo no crescimento ósseo de ratos expostos a cafeína possa estar relacionado à redução de alguns constituintes ósseos como cálcio, cobre, fósforo e zinco (Sasahara et al., 1994; Wink et al., 1996). Acredita-se também que a interação da cafeína com os receptores da vitamina D em osteoblastos possa ser um possível mecanismo pelo qual ela afeta o tecido ósseo, em virtude desta vitamina possuir um importante papel no controle do metabolismo de cálcio (Rapuri et al., 2007). Mas, os mecanismos moleculares pelo qual a cafeína altera as cartilagens de crescimento necessitam ser elucidados.

Nos ratos de 3 dias de idade, a cafeína reduziu a espessura da placa epifisária vertebral, diminuiu a quantidade de glicosaminoglicanos da matriz cartilaginosa das vértebras e dos ossos longos, além de causar degeneração e necrose de condroblastos nas doses de 50 e 100 mg/Kg. A matriz extracelular, por meio dos proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteases e das glicosidades, desempenha papel importante no controle do crescimento e da diferenciação celular (Roughley, 2006; Souza e Pinhal, 2011). Os condrócitos são as células responsáveis pela regulação dinâmica dos componentes da matriz extracelular, uma vez que são responsáveis

pela síntese e degradação dos mesmos (Plaas et al., 1983; Knudson e Knudson, 2001). Os proteoglicanos apresentam grande afinidade com uma variedade de ligantes incluindo fatores de crescimento, moléculas de adesão, componentes da matriz, enzimas e inibidores de enzimas. A especificidade da ligação depende das cadeias laterais de glicosaminoglicanos. Na célula, o esqueleto protéico dos proteoglicanos é sintetizado nos ribossomos e transferido para o retículo endoplasmático rugoso. Já a ligação com as cadeias de glicosaminoglicanos é efetuada no complexo de golgi em etapas que envolvem a atividade de várias enzimas (Souza e Pinhal, 2011). Após a sua liberação na matriz é necessário que ocorra a dessulfatação dos glicosaminoglicanos para que ocorra a degradação dos mesmos, sendo a dessulfatação um regulador crítico da condrogênese (Settembre et al., 2008; Cortes et al., 2009; Mertz et al., 2012). Portanto, a deficiência de glicosaminoglicanos na matriz acarreta em diminuição da diferenciação celular e conseqüentemente do crescimento. Uma hipótese é que a cafeína possa agir no complexo de golgi de condrócitos onde ocorre a ligação dos glicosaminoglicanos aos proteoglicanos, ou no mecanismo de dessulfatação, afetando sua interação com as moléculas responsáveis pelo crescimento das células, comprometendo sua nutrição e suporte adequado, culminando em degeneração e necrose de condrócitos.

O grupo tratado com 100 mg/Kg foi mais afetado em comparação aos demais e esse fato, assim como o peso corporal, também pode estar relacionado com os elevados níveis de cortisol maternos. Os glicocorticóides apresentam efeitos inibitórios sobre a síntese de proteoglicanos da matriz cartilaginosa, efeito depressivo transitório sobre a degradação de proteoglicanos (Weiss et al., 1986), e inibem a incorporação de sulfato na cartilagem de ratos *in vivo* e *in vitro* (Tessler e Salmon,

1975), interferindo com o crescimento e desenvolvimento normais da cartilagem.

Já nos ratos de 21 dias de idade a espessura da cartilagem articular do úmero desses filhotes das ratas tratadas com cafeína na dose de 100 mg/Kg foi significativamente maior em comparação aos demais grupos tratados e controle. Esse aumento da espessura da cartilagem articular pode ter sido decorrente de uma redução na velocidade da invasão vascular e celular da zona hipertrófica essencial no crescimento ou de um atraso na formação e expansão do centro de ossificação que ocorre após o nascimento nas epífises do úmero.

Intrigante é que ao contrário dos ratos de 3 dias de idade, os ratos com 21 dias de idade de todos os grupos apresentaram a matriz da placa epifisária e da cartilagem articular fortemente corada pela safranina O, o que sugere aparentemente não haver diferença no conteúdo de glicosaminoglicanos. Mas, esse resultado merece ser comprovado por meio de técnicas de biologia molecular em uma análise quantitativa das proteínas da matriz cartilaginosa. Mas, a semelhança entre grupos no que se refere ao teor de glicosaminoglicanos de matriz sugere que os efeitos da cafeína possam ser mais nocivos aos ratos de 3 dias de idade. Uma das razões pela qual isso pode ocorrer pode ser pelo fato dos fetos serem mais expostos a cafeína ingerida pela mãe via placenta do que via leite. Além disso, estes animais também apresentam deficiência das enzimas hepáticas do sistema P-450, sendo a meia-vida da cafeína bem maior nos neonatos, com um tempo de 80 a 100 horas, uma vez que a cafeína é metabolizada pelos sistemas enzimáticos microsossomais do fígado, por desmetilação, envolvendo o citocromo P450 (Neal e Benowitz, 1990).

Na análise morfológica da cartilagem articular e da placa epifisária, nota-se que as células da zona média da cartilagem articular e da zona de proliferação

apresentam-se picnóticas, com cromatina condensada e até com lacunas vazias, enquanto que a zona colunar apresenta-se achatada com as células desorganizadas. Apesar do teor de glicosaminoglicanos, não ter sido alterado, pode ser que a cafeína interfira na ação dos hormônios tireoidianos e de crescimento e de fatores de crescimento como o IGF-1 que atuam particularmente nessas zonas da placa epifisária, levando a proliferação e diferenciação celular (Pines e Hurwitz, 1991; Nilsson et al, 2005).

Pela análise da porcentagem de tecido ósseo trabecular, mais uma vez os efeitos da cafeína foram mais significativos nos ossos dos ratos de 3 dias de idade do que nos ratos com 21 dias de idade. A porcentagem de tecido ósseo trabecular nos ratos de 3 dias de idade foi menor na tibia e nas vértebras lombares, mesmo com a administração da dose menor de cafeína. Já nos ratos com 21 dias de idade, a porcentagem de tecido ósseo trabecular somente foi menor no segmento de 1 a 7 das vértebras torácicas e nas doses de 50 e 100 mg/Kg. Essa redução do tecido ósseo trabecular, abaixo das cartilagens de crescimento é provavelmente decorrente da redução do crescimento ósseo. Não há nenhum indício de osteoporose em nenhum dos animais, uma vez que independente da quantidade de tecido ósseo, as trabéculas apresentaram cobertura osteoblástica regular, caracterizada por osteoblastos volumosos sem diferença em comparação ao grupo controle. A cafeína é considerada um fator de risco para a osteoporose e para a doença periodontal em indivíduos adultos (Kamagata-Kiyoura et al., 1999). *In vitro*, a ela atua negativamente sobre o osteoblasto, reduzindo a viabilidade celular e aumentando a apoptose dessa célula (Tassinari et al.,1991; Tsuang et al.,2006; Lu et al.,2008; Zhou et al., 2010). Além disso, a adição de cafeína em culturas de osteoblastos diminui a síntese protéica e a expressão de genes como colágeno, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina, histona e Cbfa1/Runx-2

(Tassinari et al., 1991; Zhou et al., 2010). Mas, no presente estudo apesar de haver redução da porcentagem de tecido ósseo trabecular, o que caracteriza uma osteopenia, não houve hipotrofia e hipoplasia osteoblástica que são características morfológicas da osteoporose.

O experimento realizado *in vitro* foi uma tentativa de verificar mais profundamente os mecanismos de ação da cafeína sobre o tecido cartilaginoso. Mas, os resultados demonstraram em parte um efeito diferente ao observado *in vivo*, uma vez que as epífises cartilaginosas tratadas com cafeína apresentaram maior viabilidade celular e maior expressão de fatores da diferenciação condrogênica. Mas, por outro lado, a cafeína também resultou em aumento da apoptose com maior número de condroblastos apoptóticos e maior expressão do transcripto gênico para caspase-3. Pode ser, esse efeito apoptótico da cafeína sobre as células cartilaginosas *in vitro*, a razão pela qual foi observado morte celular nas cartilagens de crescimento tanto dos ratos de 3 dias de idade quanto dos ratos de 21 dias de idade.

Porém *in vitro*, foi observado um efeito antagônico, onde a cafeína aumentou o número de células apoptóticas e a expressão do transcripto para caspase-3, mas também manteve as células em proliferação e viáveis por mais tempo com aumento dos transcriptos gênicos da diferenciação celular, representados pelo Sox-9 e pelo Runx-2. Esses resultados mostram que os efeitos da cafeína *in vitro* podem ser diferentes dos efeitos *in vivo*. Mas, os efeitos antagônicos da cafeína parecem também ocorrer em folículos pilosos. Enquanto que a cafeína *in vitro* estimula o crescimento de folículos pilosos humanos (Fischer et al., 2007) e tem sido adicionada ao tratamento local da calvície (Lademanna, et al., 2010), filhotes de ratas tratadas com cafeína apresentam alopecia decorrente da menor atividade proliferativa das células do folículo piloso (dados não demonstrados). Essa diferença

nos resultados pode ser explicada, uma vez que *in vitro* o modelo experimental é simplificado, e não é possível reproduzir um ambiente com todos os fatores e moléculas de sinalização que agem *in vivo*. Embora, existam vários estudos que analisaram os efeitos *in vitro* da cafeína sobre as células ósseas (Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2010), o efeito da cafeína no modelo aqui utilizado parece ter sido a primeira tentativa de se estudar os efeitos *in vitro* desse alcalóide nas células cartilaginosas de indivíduos em crescimento.

### **Conclusões**

A cafeína não interrompe, mas inibe o crescimento ósseo endocondral de filhotes de ratas tratadas com diferentes doses durante a gestação e lactação.

Os efeitos da cafeína são mais danosos nas cartilagens de crescimento dos ratos de 3 dias de idade do que dos ratos com 21 dias de idade, causando lesões caracterizadas por degeneração e morte celular em baixas doses (25 mg/Kg) e afetando mais sítios do esqueleto.

Altas doses de cafeína (100 mg/Kg) aumentam os níveis plasmáticos de cortisol das ratas mães, o que está relacionado às alterações mais intensas do tecido cartilaginoso da prole.

A cafeína *in vitro* apresenta efeitos antagônicos sobre o tecido cartilaginoso, aumentando a apoptose, mas ao mesmo tempo, aumentando a viabilidade celular, impedindo a queda do índice proliferativo e aumentando a expressão de transcriptos gênicos da diferenciação celular representados pelo Sox-9 e pelo Runx-2.

### **Referências bibliográficas**

ABARCA-BUIS, R.F.; CÁZARES, D.G.; MONROY, J.C. Mecanismos moleculares

- que controlan el desarrollo de la extremidad de los vertebrados. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.*, v.9, p.78-89, 2006.
- ADAMS C.S.; SHAPIRO, I.M. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, v.13, p.465-473, 2002.
- AKIYAMA, H.; CHABOISSIER, M.C.; MARTIN, J.F. et al. The transcription factor Sox-9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox-5 and Sox-6. *Genes deve.*, v.16, p.2813-2828, 2002.
- ALDRIDGE, A.; PARSONS, W.D.; NEIMS, A.H. Stimulation of caffeine metabolism in rat by 3-methylcholanthrene. *Life Sci.*, v.21, p.967-974, 1977.
- AL-QATTAN, M.M.; YANG, Y.; KOZIN, S.H. Embryology of the Upper Limb. *J. Hand. Surg.*, v.34a, p.1340-1350, 2009.
- ALVAREZ, J.; SOHN, P.; ZENG, X. et al. TGFb2 mediates the effects of Hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development.*, v.129, p.1913-1924, 2002.
- AMLING, M.; NEFF, L.; TANAKA, S. et al. Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal Development. *J. Cell Biol.*, v.136, p.205-213, 1997.
- ANDERSON, H.C.; HODGES, P.T.; AGUILERA, X.M. et al. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J. Histochem. Cytochem.*, v.48, p.1493-1502, 2000.
- ARNAUD, M.J. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb. Exp. Pharmacol.*, v.200, p.33-91, 2011.
- BALLOCK, R.T.; O'KEEFE, R.J. The biology of the growth plate. *J. Bone Joint. Surg.*, v.85a, p.715-726, 2004.
- BANDYOPADHYAY, A.; TSUJI, K.; COX, K. et al. Genetic analysis of the roles of BMP-2, BMP-4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *Plos Genet.*, v.2, p.e216, 2006.
- BANERJEE, C.; JAVED, A.; CHOI, J. et al. Differential regulation of the two principal Runx-2/cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology.*, v.142, p.4026-4039, 2001.
- BARGER-LUX, M.J.; HEANEY, R.P.; STEGMAN, M.R. Effects of moderate caffeine intake on the calcium economy of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.52, p.722-725, 1990.
- BARGER-LUX, M.; HEANEY, R.P. Caffeine and the calcium economy revisited. *Osteoporos. Int.*, v.5, p.97-102, 1995.
- BARONE, L.M.; TASSINARI, M.S.; BORTELL, R. et al. Inhibition of induced endochondral bone development in caffeine treated rats. *J. Cell. Biochem.*, v.52, p.171-182, 1993.
- BARONE, J.J.; ROBERTS, H.R. Caffeine consumption. *Food Chem. Toxicol.*, v.34, p.119-129, 1996.
- Bell, D.M.; Leung, K.K.; Wheatley, S.C. et al. Sox-9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.*, v.16, p.174-178, 1997.
- BELLUOCIO, D.; BERNARDO, B.C.; ROWLEY, L. et al. A microarray approach

- for Comparative expression profiling of the discrete maturation zones of mouse growth plate cartilage. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1779, p.330-340, 2008.
- BERGMAN, E.A.; MASSEY, L.K.; WISE, K.J. et al. Effects of dietary caffeine on renal handling of minerals in adult women. *Life Sci.*, v.47, p.557-564, 1990.
- BEZERRA, J.P. Influência da ingestão crônica de altas doses de cafeína na periodontite induzida por ligadura e na densidade e reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico. 2008. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Escola de Odontologia, Universidade de Guarulhos. SP. Brasil.
- BI, W.; HUANG, W.; WHITWORTH, D.J. et al. Haploinsufficiency of Sox-9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *PNAS.*, v.98, p.6698-6703, 2001.
- BLAGOSKLONNY, M.V. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia.*, v.14, p.1502-1508, 2000.
- BRIDGEWATER, L.C.; LEFEBVRE, V.; CROMBRUGGHE, B. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J. Biol Chem.*, v.273, p.14998-15006, 1998.
- BROOKE, O. G.; ANDERSON, H.R.; BLAND, J. M. et al. Effects on birth weight of smoking, alcohol, caffeine, socioeconomic factors, and psychosocial stress. *BMJ.*, v.298, p.795-801, 1989.
- BURSCH, W.; OBERHAMMER, F.; SCHULTE-HERMANN, R. Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, v.13, p.245-251, 1992.
- CABEZAS, M.T.; FLORES, A.; EGANA, J.I. Use of coffee pulp in ruminant feeding. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. (Ed.) *Coffee pulp: Composition, technology, and utilization*. Guatemala City: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987, p.25-38.
- CANALIS, E.; ECONOMIDES, A.N.; GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr. Rev.*, v.24, p.218-235, 2003.
- CAPDEVILA, J.; JOHNSON, R.L. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev. Biol.*, v.197, p.205-217, 1998.
- CHEN, L.; DENG, C. Roles of fgf signaling in skeletal development and human genetic diseases. *Front. Biosci.*, v.10, p.1961-1976, 2005.
- CHOUHDURY, R.C.; PALO, A.K. Modulatory effects of caffeine on methotrexate-induced cytogenotoxicity in mouse bone marrow. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.15, p.79-85, 2004.
- CHUNG, U.; LANSKE, B.; LEE, K. et al. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Dev. Biol.*, v.95, p.13030-13035, 1998.
- CHURCH, V.; FRANCIS-WEST, P. Wnt signaling during limb development. *Int. J. Dev. Biol.*, v.46, p.927-936, 2002.
- COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, v.326, p.1-16, 1997.
- COLVIN, J.S.; FELDMAN, B.; NADEAU, J.H., et al. Genomic Organization and



- Embryonic Expression of the Mouse Fibroblast Growth Factor 9 Gene. *Dev. Dyn.*, v.216, p.72-88, 1999.
- CORTES, M.; BARIA, A.T.; SCHWARTZ, N.B. Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate. *Development.*, v.136, p.1697-1706, 2009.
- CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanism in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v.13, p.721-727, 2001.
- DAMBROSIO, S.M. Evaluation of the genotoxicity data on caffeine. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v.19, p.243-281, 1994.
- DAVIS, R.L.; TURNER, D.L. Molecular targets of vertebrate segmentation: two mechanisms control segmental expression of xenopus hairy2 during somite formation. *Dev. Cell.*, v.1, p.553-565, 2001.
- DEWS, P. B. Caffeine. *Ann. Rev. Nutr.*, v.2, p.323-341, 1982.
- DIEGO, M.A.; JONES, N.A.; FIELD, T. et al. Maternal psychological distress, prenatal cortisol, and fetal weight. *Psych. Med.*, v.68, p.747-753, 2006.
- DONOGHUE, J.F.; LEITCH, I.M.; BOURA, A.L.A. et al. Fetal placental vascular responses to corticotropin-releasing hormone *in vitro*. effects of variation in oxygen tension. *Placenta.*, v.21, p.711-717, 2000.
- DUARTE, P.M.; MARQUES, M.R.; BEZERRA, J.P. et al. The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density. A histometric study in rats. *Arch. Oral Biol.*, v.54, p.717-722, 2009.
- DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V. et al. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, v.89, p.747-754, 1997.
- DUCY, P.; STARBUCK, M.; PRIEMEL, M. et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway embryonic development. *Genes Dev.*, v.13, p.1025-1036, 1999.
- DUPREZ, P.; BELL, J.H.; RICHARDSON, M.K. et al. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech. Dev.*, v.57, p.145-157, 1996.
- EASTMAN, A. Assays for DNA fragmentation, endonucleases, and intracellular pH and Ca<sup>2+</sup> associated with apoptosis. *Meth. Cell Biol.*, v.46, p.41-55, 1995.
- EDWARDS, C.R.W.; BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.S. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet.*, v.341, p.355-357, 1993.
- EERDEN, B.C.J.V.; KARPERIEN, M.; WIT, J.M. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. rev.*, v.24, p.782-801, 2003.
- ENOMOTO, H.; ENOMOTO-IWAMOTO, M.; IWAMOTO, M. et al. Cbfa1 Is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.8695-8702, 2000.
- ENOMOTO-IWAMOTO, M.; IWAMOTO, M.; MUKUDAI, Y. et al. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J. Cell Biol.*, v.140, p.409-418, 1998.
- ESKES, R.; DESAGHER, S.; ANTONSSON, B. et al. Bid induces the

- oligomerization and insertion of bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.*, v.20, p.929-935, 2000.
- ETENG, M. U.; EYONG, E. U.; AKPANYUNG E.O. et al. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant. Foods Human Nutr.*, v.51, p.231-243, 1997.
- FAN, T.J.; HAN, L.H.; CONG, R.S. et al. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, v.37, p.719-727, 2005.
- FENSTER, L.; ESKENAZI, B.; WINDHAM, G.C. et al. Caffeine consumption during pregnancy and fetal growth. *Am. J. Public. Health.*, v.81, p.458-61, 1991.
- FESUS, L.; MADI, A.; BALAJTHY, Z. et al. Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia.*, v.52, p.942-949, 1996.
- FISCHER, T.W.; HIPLER, UC.; ELSNER, O. Effect of caffeine and testosterone on the proliferation of human hair follicles *in vitro*. *Int. J. Derm.*, v.46, p.27-35, 2007.
- FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.61, p.857-872, 2004.
- FRANCIS-WEST, P.H.; ABDELFATTAH, A.; CHEN, P. et al. Mechanism of GDF-5 action during skeletal development. *Development.*, v.126, p.1305-1315, 1999.
- FUNAHASHI H.; NAGAI, T. Regulation of *in vitro* penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol. Reprod. Dev.*, v.58, p.424-431, 2001.
- GAROFALO, S.; KLIGER-SPATZ, M.; COOKE, J. et al. Skeletal dysplasia and defective chondrocyte differentiation by targeted overexpression of fibroblast growth factor 9 in transgenic mice. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, p.1909-1915, 1999.
- GILBERT, E.F.; PISTEY, W.R. Effect on the offspring of repeated caffeine administration to pregnant rats. *J. Reprod. Fertil.*, v.34, p.495-499, 1973.
- GLYNN, L.M.; DAVIS, E.P.; SCHETTER, C.D. et al. Postnatal maternal cortisol levels predict temperament in healthy breastfed infants. *Early. Hum. Develop.*, v.83, p.675-81, 2007.
- GOLDRING, M.B.; TSUCHIMOCCHI, K.; IJIRI, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell Biochem.*, v.93, p.33-44, 2006.
- GOLTZMAN, D. Emerging roles for calcium-regulating hormones beyond osteolysis. *Trends Endocrinol. Metabol.*, v.21, p.512-518, 2010.
- GRADIL, C.M.; BALL, B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology.*, v.54, p.1041-1047, 2000.
- GUDJONSSON, T.; ADRIANCE, M.C.; STERNLICHT, M.D. et al. Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.*, v.10, p.261-272, 2005.
- GUHA, U.; GOMES, W.A.; KOBAYASHI, T. et al. In vivo evidence that BMP signaling is necessary for apoptosis in the mouse limb. *Dev. Biol.*, v.249, p.108-120, 2002.
- GUO, J.; CHUNG, U.; YANG, D. et al. PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx-2 dependent and independent pathways. *Dev. Biol.*, v.292, p.116-128, 2006.

- HALL, B. K.; MIYAKE, T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *BioEssays.*, v.22, p.138-147, 2000.
- HALLSTRÖM, H.; MELHUS, H.; GLYNN, A. et al. Coffee consumption and CYP1A2 genotype in relation to bone mineral density of the proximal femur in elderly men and women: a cohort study. *Hallström et al. Nutr. Metab.*, v.7, p.1-9, 2010.
- HAN, Y.; LEFEBVRE, V. L-Sox-5 and Sox-6 drive expression of the Aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox-9 to a far-upstream enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, v.28, p.4999-5013, 2008.
- HARADA, H.; TAGASHIRA, S.; FUJIWARA, M. et al. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.*, v.274, p. 6972-6978, 1999.
- HEANEY, R.P.; RECKER, R.R. Effects of nitrogen, phosphorus and caffeine on calcium balance in women. *J. Lab. Clin. Med.*, v.99, p.46-55, 1982.
- HEANEY, R.P. Effects of caffeine on bone and the calcium economy. *Food Chem. Toxicol.*, v.40, p.1263-1270, 2002.
- HECKMAN, M.A.; WEIL, J.; MEJIA, G.J. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *R: Con. Rev. Hyp. In Food Sci.*, v.75, p.77-87, 2010.
- HIDAKA, C.; GOLDRING, M.B. Regulatory mechanism of chondrogenesis and implications for understanding articular cartilage homeostasis. *Curr. Rheumatol. Rev.*, v.4, p.1-12, 2008.
- HOCK, J.M.; KRISHNAN, V.; ONYIA, J.E. et al. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J. Bone Miner. Resear.*, v. 16, p.975-984, 2001.
- HORTON JR, W.E.; FENG, L.; ADAMS, C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol.*, v.17, p.107-115, 1998.
- HORTON, W.A.; DEGNIN, C.R. FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinol. Metabol.*, v.20, p.341-348, 2009.
- HUANG, W.; CHUNG, U.; KRONENBERG, H.M. et al. The chondrogenic transcription factor Sox-9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *PNAS.*, v.98, p.160-165, 2001.
- HUANG, T.H.; YANG, R.S.; HSIEH, S.S. et al. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone.*, v.30, p.293-299, 2002.
- HUGHES, D.E.; BOYCE, B.F. Apoptosis in bone physiology and disease. *J.Clin. Pathol. In Mol. Pathol.*, v.50, p.132-137, 1997.
- HUNG, I.H.; KORY, K.Y.; LAVINE, J. et al. FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev. Biol.*, v.307, p.300-313, 2007.
- IKEDA, T.; KAMEKURA, S.; MABUCHI, A. et al. The Combination of Sox-5, Sox-6, and Sox-9 (the Sox Trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.*, v.50, p.3561-3573, 2004.
- IKEDA, T.; KAWAGUCHI, H.; KAMEKURA, S. et al. Distinct roles of Sox-5, Sox-6, and Sox-9 in different stages

- of chondrogenic differentiation. *J. Bone Miner. Metab.*, v.23, p.337-340, 2005.
- INADA, M.; YASUI, T.; NOMURA, S. et al. Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.*, v.214, p.279-290, 1999.
- JARQUÍN, R.; ROSALES, F.A.; GONZÁLEZ, J.M. et al. Pulpa y pergamino de café. IX. Uso de la pulpa de café en la alimentación de cerdos en la fase de crecimiento y acabado. *Turrialba.*, v.24, p.41-46, 1974.
- JAVED, A.; BARNES, G.L.; JASANYA, B.O. et al. Runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Mol. Cell. Biol.*, v.21, p.2891-2905, 2001.
- JAYAPRAKASH, D.; SANTOS, H.; KUMAR, K. et al. Pentoxifylline induces hyperactivation and acrosome reaction in spermatozoa of golden hamsters: changes in motility kinematics. *Hum. Reprod.*, v.12, p.2192-2199, 1997.
- JOHANSSON, C.; MELLSTRÖM, D.; LERNER, U. et al. Coffee drinking: a minor risk factor for bone loss and fractures. *Age aging.*, v.21, p.20-26, 1992.
- JOHNSON, D. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia.*, v.14, p.1340-1344, 2000.
- JOHNSON, R.L.; TABIN, C.J. Molecular models for vertebrate development. *Cell.*, v.90, p.979-990, 1997.
- JONES, S.A.; BROOKS, A.N.; CHALLIS, J.R.G. Steroids Modulate Corticotropin-Releasing Hormone Production in Human Fetal Membranes and Placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.68, p.825-830, 1989.
- KAMAGATA-KIYOURA, Y.; OHTA, M.; CHEUK, G. et al. Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells. *J. Periodontol.*, v.70, p.283-288, 1999.
- KAMATH, B.M.; STOLLE, C.; BASON, L. et al. Craniosynostosis in Alagille syndrome. *Am. J. Med. Gen.*, v.112, p.176-180, 2002 (a).
- KAMATH, B.M.; LOOMES, K.M.; OAKEY, R.J. et al. Supernumerary digital flexion creases: An additional clinical manifestation of Alagille syndrome. *Am. J. Med. Gen.*, v.112, p.171-175, 2002 (b).
- KANG, S. H.; LEE, Y.A.; WON, S. J. et al. Caffeine-induced neuronal death in neonatal rat brain and cortical cell cultures. *Cancer research.*, v.64, p.5020-5027, 2004.
- KARAPLIS, A.C.; LUZ, A.; GLOWACKI, J. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.*, v.8, p.277-289, 1994.
- KARAPLIS, A.C.; HE, B.; NGUYEN, M.T.A. et al. Inactivating mutation in the human parathyroid hormone receptor type 1 gene in Blomstrand Chondrodysplasia. *Endocrinology.*, v. 139, p.5255- 5258, 1998.
- KARP, S.J.; SCHIPANI, E.; ST-JACQUES, B. et al. Indian Hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and independent pathways. *Development.*, v.127, p.543-548, 2000.
- KARPERIEN, M.; DIJK, T.B.V.; HOEIJMAKERS, T. et al. Expression pattern of parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor mRNA in mouse postimplantation embryos indicates involvement in multiple developmental processes. *Mech. Dev.*, v.47, p.29-42, 1994.

- KAWAHARA, M.; KAGIYAMA, H.; KANAZAWA, Y. et al. Rapid determination method of caffeine and application to monitoring of caffeine-assisted chemotherapy. *Biopharm. Drug Dispos.*, v.25, p.61-67, 2004.
- KAWAKAMI, Y.; LEÓN, J.R.; BELMONTE, J.C.I. The role of TGFbs and Sox-9 during limb chondrogenesis. *Cur. Op. Cell. Biol.*, v.18, p.723-729, 2006.
- KERN, B.; SHEN, J.; STARBUCK, M., et al. Cbfa1 Contributes to the Osteoblast-specific Expression of type I collagen Genes. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.7101-7107, 2001.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, v. 26, p.239-257, 1972.
- KEYNES, R.J.; STERN, C.D. Mechanism of vertebrate segmentation. *Development.*, v.103, p.413-429, 1988.
- KIM, L.S.; OTTO, F.; ZABEL, B. et. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.*, v.80, p.159-170, 1999.
- KIMURA S.; SHIOTA K. Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis. *J. Morphol.*, v.229, p.337-46, 1996.
- KIMURA, H.; TSUCHIYA, H.; SHIRAI, T. et al. Caffeine potentiated chemotherapy for metastatic osteosarcoma. *J. Orthop. Sci.*, v.14, p.556-565, 2009.
- KIRKINEN, P.; JOUPPILA, P.; KOIVULA, A. et al. The effect of caffeine on placental and fetal blood flow in human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.147, p.939-942, 1983.
- KNUDSON, C.B.; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. *Cell. dev. biol.*, v.12, p.69-78, 2001.
- KOBAYASHI, T.; SOEGIARTO, D.W.; Yang, Y. et al. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J. Clin. Invest.*, v.115, p.1734-1742, 2005.
- KOEDAM, J.A.; SMINK, J.J.; BUUL-OFFERS, S.C.V. Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expression in growth plate chondrocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.197, p.35-44, 2002.
- KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S. et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a Complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.*, v.89, p.755-764, 1997.
- KRONENBERG, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature.*, v.423, p.332-336, 2003.
- KRONENBERG, H.M. PTHrP and skeletal development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1068, p.1-13, 2006.
- KUGIMIYA, F.; OHBA, S.; NAKAMURA, K. et al. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J. bone Miner. Metab.*, v.24, p.95-99, 2006.
- LADEMANN, J.; RICHTER, H.; SCHANZERA, S. et al. Analysis of the penetration of a caffeine containing shampoo into the hair follicles by *in vivo* laser scanning microscopy. *Laser Physics.*, v.20, p.551-556, 2010.
- LANSKE, B.; KARAPLIS, A.C.; LEE, K. et al. PTH/PTHrP Receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.*, v.273, p.663-666, 1996.

- LARROQUE, B.; KAMINSKI, M.; LELONG, N. et al. Effects on birth weight of alcohol and caffeine consumption during pregnancy. *Am. J. Epidemiol.*, v.137, p.941-950, 1993.
- LAZARUS, J.E.; HEGDE, A.; ANDRADE, A.C. et al. Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone.*, v.40, p.577-586, 2007.
- LEACH, R.M.; GAY, C.V. Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation. *J. Nutr.*, v.117, p.784-790, 1987.
- LEBOY, P.S. Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1068, p.14-18, 2006.
- LEE, K.; DEEDS, J.D.; SEGRE, G.V. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology.*, v.136, p.453-463, 1995.
- LEE, K.; LANSKE, B.; KARAPLIS, A.C. et al. Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology.*, v.137, p.5109-5118, 1996.
- LEFEBVRE, V.; LI, P.; CROMBRUGGHE, B. A new long form of Sox-5 (L-Sox-5), Sox-6 and Sox-9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *J. Embo.*, v.17, p.5718-5733, 1998.
- LEUNG, V.Y.J.; GAO, B.; LEUNG, K.K.H. et al. Sox-9 Governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *Plos One.*, v.7, n.11, p.e1002356, 2011.
- LI, S.; HACKER, R.R. The effects of caffeine on mammary gland development and milk yield in primiparous sows. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p.534-540, 1995.
- LIU, Z.; LAVINE, K.J.; HUNG, I.H. et al. FGF18 is required for early chondrocyte proliferation, hypertrophy and vascular invasion of the growth plate. *Dev. Biol.*, v.302, p.80-91, 2007.
- LIU, S.H.; CHEN, C.; YANG, R.S. et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J. Orth. Res.*, v.29, p.954-960, 2011.
- LONG, F.; ZHANG, X.M.; KARP, S. et al. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development.*, v.128, p.5099-5108, 2001.
- LORDA-DIEZ, C.I.; MONTERO, J.A.; MENDOZA, M.J.D. et al. Defining the earliest transcriptional steps of chondrogenic progenitor specification during the formation of the digits in the embryonic limbs. *Plos one.*, v.6, p.e24546, 2011.
- LOU, Y.; PENG, Q.; NOLAM, B. et al. Oral administration of caffeine during voluntary exercise markedly decrease tissue fat and stimulates apoptosis and cyclin B1 in UVB treated skin of hairless p53-knockout mice. *Carcinogenesis.*, v.31, p.671-678, 2010.
- LOVALLO, W.R.; PINCOMB, B.H.; SUNG, B.H. et al. Caffeine may potentiate adrenocortical stress responses in hypertension-prone men. *Hypertension.*, v.14, p.170-176, 1989.
- LOVALLO, W.R.; WHITSETT, T.L.; AL'ABSI, M. et al. Caffeine stimulation of cortisol secretion across the waking hours in relation to caffeine intake levels. *Psychosom. Med.*, v.65, p.734-739, 2005.

- LU, Y.P.; LOU, Y.R.; PENG, Q.Y. et al. Stimulatory effect of topical application of caffeine on uvb-induced apoptosis in the epidermis of p53 and bax knockout mice. *Cancer Res.*, v.64, p.5020-5027,2004.
- LU, P.Z.; LAI, C.Y.; CHAN, W.H. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.*, v.9, p.698-718, 2008.
- LYONS, K.M.; PELTON, R.W.; HOGAN, B.L.M. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for *Bone Morphogenetic Protein-2A (BMP-2A)*. *Development.*, v.109, p.833-844, 1990.
- MAGNE, D.; BLUTEAU, G.; FAUCHEUX, C. et al. Phosphate Is a Specific Signal for ATDC5 Chondrocyte Maturation and Apoptosis-Associated Mineralization: Possible Implication of Apoptosis in the Regulation of Endochondral Ossification. *J. Bone Min. Res.*, v.18, p.1430-1442, 2003.
- MAICKEL, R.P.; SNODGRASS, W.R. Physicochemical factors in maternal-fetal distribution of drugs. *Toxicol. App. Pharmacol.*, v.26, p.218-230, 1973.
- MAILBES, J.B.; YOUNG, D.; LONDON, S.N. Cytogenetic effects of caffeine during *in vivo* mouse oocyte maturation. *Mutagenesis.*, v.11, p.395-399, 1996.
- MALÉMUD, C. J. Matrix metalloproteinases: role in skeletal development and growth plate disorders. *Front. Biosci.*, v.11, p.1702-1715, 2006.
- MALLADI, S.; CHALLA-MALLADI, M.; FEARNHEAD, H.O. et al. The Apaf-1K procaspase-9 apoptosome Complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *J. Embo.*, v.28, p.1916-1925, 2009.
- MANDEL, H.G. Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food Chem. Toxicol.*, p.1231-1234, 2002.
- MANOLAGAS, S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, v.21, p.115-137, 2000.
- MARAZZI, G.; WANG, Y.; SASSOON, D. Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP-4 mediated programmed cell death pathway. *Dev. Biol.*, v.186, p.127-138, 1997.
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, v.62. p.609-614, 2002.
- MARTIN, G.R. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Gen. Dev.*, v.12, p.1571-1586, 1998.
- MASSEY, L.K.; WHITING, S.J. Caffeine, urinary Calcium, Calcium Metabolism and Bone. *J. Nutr.*, v.123, p.1611-1614, 1993.
- MATTOT, V.; RAES, M.B.; HENRIET, P. et al. Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J. Cell. Sci.*, v.108, p.529-535, 1995.
- MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by microorganisms and Potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Sci. Agricol.*, v.59, p.815-821, 2002.
- MELNIK, M.; KOHUTOVA, M. Complex view on biomedical activity of caffeine. *Act. Facul. Pharm. Univ. Comen. Tomus.*, v.56, p.5-9, 2009.
- MERINO, R.; MACIAS, D.; GAÑAN, Y. et al. Control of digit formation by activin signalling. *Development.*, v.126, p.2161-2170, 1999.

- MERTZ, E.L.; FACCHINI, M.; PHAM, A.T. et al. Matrix disruptions growth and degradation of cartilage with impaired sulfation. *J. Biol. Chem.*, v.287, p.22030-22042, 2012.
- MEYER, J.; SÜDBECK, P.; HELD, M. et al. Mutational analysis of the Sox-9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Hum. Mol. Gen.*, v.6, p.91-98, 1997.
- MIAO, D.; HE, B.; KARAPLIS, A.C. et al. Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *J. Clin. Invest.*, v.109, p.1173-1182, 2002.
- MIAO, D.; LIU, H.; PLUT, P. et al. Impaired endochondral bone development and osteopenia in Gli2-deficient mice. *Exp. Cell Res.*, v.294, p.210-222, 2004.
- MILANI, C.; FONTBONNE, A.; SELLEM, E. et al. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenol.*, v.74, p.153-164, 2010.
- MOALLEM, S.A.; HALES, B.F. The role of p53 and cell death by apoptosis and necrosis in 4- hydroperoxycyclophosphamide-induced limb malformations. *Development.*, v.125, p.3225-3234 1998.
- MONTERO, A.; OKADA, Y.; TOMITA, M. et al. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J. Clin. Invest.*, v.105, p.1085-1093, 2000.
- MONTERO, J.A.; GANAN, Y.; MACIAS, D. et al. Role of FGFs in the control of programmed cell death during limb development. *Development.*, v.128, p.2075-2084, 2001.
- MULDER, E.J.H.; MEDINAA, P.G.R.; HUIZINKB, A.C. et al. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early. Hum. Dev.*, n.1-2, p.3-14, 2002.
- MULVIHILL, J.J. Caffeine as teratogen and mutagen. *Teratology.*, v.8, p.69-72, 1973.
- MURTAUGH, L.C.; CHYUNG, J.H.; LASSAR, A.B. Sonic hedgehog promotes somatic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev.*, v.13, p.225-237, 1999.
- NAGASAWA, H.; SAKURAI, N. Effects of chronic ingestion of caffeine on mammary growth and reproduction in mice. *Life Sci.*, v.39, p.351-357, 1986.
- NAKAMOTO, T.; SHAYE, A. Protein-Energy Malnutrition in Rats during Pregnancy Modifies the Effects of Caffeine on Fetal Bones. *J. Nutr.*, v.116, p.633-640, 1986.
- NAKAMOTO, T.; GRANT, S.; YAZDANI, M. The effects of maternal caffeine intake during pregnancy on mineral contents of fetal rat bone. *Res. Exp. Med.*, v.189, p.275-280, 1989.
- NAROD, S.A.; SANTOSE, S.; VICTORA, C. Coffee during pregnancy: a reproductive hazard? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.164, p.1109-1114, 1991.
- NEAL, L.; BENOWITZ, M.D. Clinical pharmacology of caffeine. *Ann. Rev. Med.*, v.41, p.277-288, 1990.
- NEELAM, P. Maternal caffeine consumption and its relationship to adverse pregnancy. 2009. thesis (Doctor of medicine) - University of Leicester. UK.
- NEHLIG, A.; DEBRY, G. Potential teratogenic and neurodevelopmental consequences of coffee and caffeine exposure: A review on human and



- animal data. *Neurotoxicol. Teratol.*, v.16, p.531-543, 1994.
- NG, L.; WHEATLEY, S.; MUSCAT, G.E.O. et al. Sox-9 Binds DNA, Activates Transcription, and Coexpresses with Type II Collagen during Chondrogenesis in the Mouse. *Dev. Biol.*, v.183, p.108-121, 1997.
- NILSSON, O.; MARINO, R.; LUCA, F. et al. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm. Res.*, v.64, p.157-165, 2005.
- NOBLE, B. Bone microdamage and cell apoptosis. *Cell. Mat.*, v.6, p.46-56, 2003.
- NOVAKOFSKI, J. Adipogenesis: Usefulness of *in vitro* and *in vivo* experimental models. *J. Anim. Sci.*, v.82, p.905-915, 2004.
- OATES, A.C.; MORELLI, L.G.; ARES, S. Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development.*, v.139, p.625-639, 2012.
- OH, C.; MAITY, S.N.; LU, J.F. et al. Identification of Sox-9 interaction sites in the genome of chondrocytes. *Plos One.*, v.5, p.e10113, 2010.
- OHBAYASHI, N.; SHIBAYAMA, M.; KUROTAKI, Y. et al. FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.*, v.16, p.870-879, 2002.
- OKUBO, Y.; REDDI, A.H. Thyroxine downregulates Sox-9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.306, p.186-190, 2003.
- ORNITZ, D.M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: Complex interactions essential for development. *BioEssays*, v.22, p.108-112, 2000.
- ORNITZ, D.M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. *Gen. Biol.*, v.2, p.1-12, 2001.
- ORNITZ, D.M.; MARIE, P.J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.*, v.16, p.1446-1465, 2002.
- ORTH, M.W. The Regulation of Growth Plate Cartilage Turnover. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.183-189, 1999.
- OSTER, G.F.; SHUBIN, N.; MURRAY, J.D. et al. Evolution and morphogenetic rules: the shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny. *Evolution.*, v.42, p.862-884, 1988.
- OTTO, F.; THORNELL, A.P.; CROMPTON, T. et al. Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell.*, v.89, p.765-771, 1997.
- PALM, P.E.; ARNOLD, E.P.; RACHWALL, P.C. et al. Evaluation of the teratogenic potential of fresh-brewed coffee and caffeine in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.44, p.1-16, 1978.
- PARRA, A.R.P.; MOREIRA, I.; FURLAN, A.C. et al. Utilização da casca de café na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. *Rev. Bras. Zootec.*, v.37, p.433-442, 2008.
- PARSONS W.D.; PELLETIER J.G. Delayed elimination of caffeine by women in the last 2 weeks of pregnancy. *CMAJ.*, v.127, p.377-380, 1982.
- PER, H.; LOTTA, N.; JOHAN, A. Caffeine fatalities-four case reports. *Foren. Sci. Int.*, v.139, p.71-73, 2004.
- PERIS, J.L.; PRAT, J.; DEJOZ, R., et al. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): Efecto de la proteína osteogénica-1 (OP-1/BMP-7) en la condrogénesis y

- osteogenesis. *Rev. Esp. Cir. Osteoart.*, v.31, p.37-48, 1996.
- PETERS, K.G.; WERNER, S.; CHEN, G. et al. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development.*, v.114, p.233-243, 1992.
- PINES, M.; HURWITZ, S. The role of the growth plate in longitudinal bone growth. *Poult. Sci.*, v.70, p.1806-1814, 1991.
- PLAAS, A.H.K.; SANDY, J.D.; MUIR, H. Proteoglycan aggregate formation by articular chondrocytes. *Biochem. J.*, v.214, p.855-864, 1983.
- PLANTE, I.; WALLIS, A.; SHAO, Q. et al. Milk Secretion and Ejection Are Impaired in the Mammary Gland of Mice Harboring a Cx43 Mutant While Expression and Localization of Tight and Adherens Junction Proteins Remain Unchanged. *Biol. Reprod.*, v.82, p.837-847, 2010.
- PLOUMIS, A.; MANTHOU, M.E.; Emmanouil-Nikolousi, E.N., Sofia, A. et al. Animal model of chondrocyte apoptosis in the epiphyseal cartilage of the neonatal bone. *J. Orthop. Sci.*, v.9, p.495-502, 2004.
- POURMAND, E.P.; BINDERMAN, I.; DOTY, S.B. et al. Chondrocyte Apoptosis Is Not Essential for Cartilage Calcification: Evidence From an In Vitro Avian Model. *J. Cell. Biochem.*, v.100, p.43-57, 2007.
- POURQUIE, O. Vertebrate Segmentation: Lunatic transcription regulation. *Cur. Biol.*, v.12, p.699-701, 2002.
- PRIOR, H.M.; WALTER, M.A. Sox genes: Architects of development. *Mol. Med.*, v. 2, p.405-412, 1996.
- RAPURI, P.B.; GALLAGHER, J.C.; NAWAZ, Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.103, p.368-371, 2007.
- REISSIG, C.J.; STRAIN, E.G.; GRIFFITHS, R.R. Caffeinated energy drinks: a growing problem. *Drug Alcohol Depend.*, v.99, p.1-10, 2009.
- ROACH, H.I.; CLARKE, N.M.P. Physiological cell death of chondrocytes *in vivo* is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J. Bone Joint Surg.*, v. 82, p.601-613, 2000.
- ROBERTIS, E.M. The molecular ancestry of segmentation mechanism. *PNAS.*, v.105, p. 16411-16412, 2008.
- ROBSON, H.; SIEBLER, T.; SHALET, S.M. et al. Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. *Int. Ped. Res. Found.*, v.52, p.137-147, 2002.
- ROUGHLEY, P.J. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur. Cell. Mat.*, v.12, p.92-101, 2006.
- SALANT, W.; RIEGER, J.B. The elimination and toxicity of caffeine in nephrectomized rabbits. *Exp. Biol. Med.*, v.9, p.58-59, 1912.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998, 211p.
- SASAHARA, H.; YAMANO, H.; NAKAMOTO, T. Effects of maternal caffeine with zinc intake during gestation and lactation on bone development in newborn rats. *Arch. Oral Biol.*, v.35, p.425-430, 1990.

- SASAHARA, H.; CHEUK, S.L.; WINK, C.S. et al. Alteration of femoral structure in later life by chronically feeding caffeine during rapid growing period in newborn female rats. *Toxicol. Lett.*, v.73, p.55-64, 1994.
- SCHIPANI, E.S.; LANGMAN, C.B.; PARFITT, A.M. et al. constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *New Engl. J. Med.*, v.335, p.708-714, 1996.
- SCHIPANI, E.; LANSKE, B.; HUNZELMAN, J. et al. Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Dev. Biol.*, v.94, p.13689-13694, 1997.
- SCHIPANI, E.; PROVOT, S. PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP Receptor in Endochondral Bone Development. *Birth Def. Res.*, v.69, p.352-362, 2003.
- SCHNEIDER, P.E.; MILLER, H.I.; NAKAMOTO, T. Effects of caffeine intake during gestation and lactation on bones of young growing rats. *Res. Exp. Med.*, v.190, p.131-136, 1990.
- SCOTT Jr., W.J. Caffeine-induced limb malformations: description of malformations and quantitation of placental transfer. *Teratology*, v.28, p.427-435, 1983.
- SECKL, J.R.; MEANEY, M.J. Glucocorticoid programming. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1032, p.63-84, 2004.
- SELBY, C.P.; SANCAR, A. Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.87, p.3522-3525, 1990.
- SETTEMBRE, C.; ARTEAGA-SOLIS, E.; MCKEE, M.D. et al. Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes Dev.*, v.22, p.2645-2650, 2008.
- SHAMAY, A.; SHAPIRO, F.; BARASH, H. et al. Effect of dexamethasone on milk yield and Composition in dairy cows. *Ann. Zootech.*, v.49, p.343-352, 2000.
- SHAPIRO, F.; Forriol, F. El cartílago de crecimiento: biología y biomecánica del desarrollo. *Ver. Ortop. Traumatol.*, v.49, p.55-67, 2005.
- SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur. Cell. Mater.*, v.15, p.53-76, 2008.
- SHARMA, R.K.; TOLENTINO, M.V., AGARWAL, A. Sperm kinematics of cryopreserved normozoospermic specimens after artificial stimulation. *Urology.*, v.47, p.77-81, 1996.
- SHEFFIELD, L.G. Caffeine administered during pregnancy augments subsequent lactation in mice. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.1128-1132, 1991.
- SHEN, B.; BHARGAV, D.; WEI, A. et al. BMP-13 Emerges as a Potential Inhibitor of Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.*, v.5, p.192-200, 2009.
- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. Effect of methylxanthines on motility and fertility of frozen-thawed goat semen. *Theriogenol.*, v.44, p.907-914, 1995.
- SIVAK, A. Coteratogenic effects of caffeine. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v.19, p.1-13, 1994.

- SMITS, P.; LI, P.; MANDEL, J. et al. The Transcription Factors L-Sox-5 and Sox-6 Are Essential for Cartilage Formation. *Dev. Cell.*, v.1, p.277-290, 2001.
- SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. *Food chem. Toxicol.* v.40, p.1243-1255, 2002.
- SMITS, P.; DY, P.; MITRA, S., LEFEBVRE, V. Sox-5 And Sox-6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J. Cell Biol.*, v.164, p.747-758, 2004.
- SNOW, M.E. The effects of prenatal alcohol exposure on endochondral bone development in the fetal rat. 1999. Tesis (Doctor) - McMaster University. Canadá.
- SOARES, A.I.S.M.; FONSECA, B.M.R. Cafeína. Trabalho realizado no âmbito da disciplina Toxicologia e Análises toxicológicas I. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Portugal. 2004.
- SOUZA, R.A.G.; SICHIERI, R. Consumo de cafeína e prematuridade. *Rev. Nutr.*, v.18, p.643-650, 2005.
- SOUZA, R.S.; PINHAL, M.A.S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arq. Bras. Ciên. Saúde.*, v.36, p.48-54, 2011.
- ST-JACQUES, B.; HAMMERSCHMIDT, M.; MCMAHON, A.P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.*, v.13, p.2072-2086, 1999.
- STOCK, M.; SCHAFER, H.; FLIEGAUF, M. et al. Identification of novel target genes of the bone-specific transcription factor Runx-2. *J. Bone Miner. Res.*, v.19, p.959-972, 2004.
- SUUTRE S.; TOOM, A.; AREND, A. et al. Involvement of BMP-2, TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 Signaling in Initial and Early Stages of Heterotopic Ossification in a rat Experimental Model. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, v.37, p.31-40, 2010.
- SWOLIN-EIDE, D.; DAHLGREN, J.; NILSSON, C. et al. Affected skeletal growth but normal bone mineralization in rat offspring after prenatal dexametasone exposure. *J. Endocrinol.*, v.174, p.411-418, 2002.
- SYKARAS, N.; OPPERMAN, L.A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J. Oral Sci.*, v.45, p.57-73, 2003.
- TAKAGI, M.; KAMIYA, N.; TAKAHASHI, T. et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor  $\beta$ 1 on gene expression of transcription factors, AJ18 and Runx-2 in cultured osteoblastic cells. *J. Mol. Histol.*, v.35, p.81-90, 2004.
- TAKEDA, S.; BONNAMY, J.; OWEN, M.J. et al. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.*, v.15, p.467-481, 2001.
- TASSINARI, M.S.; GERSTENFELD, L.C.; STEIN, G.S. et al. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *Bone Miner. Res.*, v.6, p.1029-1036, 1991.
- TEIXEIRA, C.C.; MANSFIELD, K.; HERTKORN, C. et al. Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v.281, p.833-839, 2001.
- TESSLER, R.H.; SALMON JR, W.D. Glucocorticoid Inhibition of Sulfate

- Incorporation by Cartilage of Normal Rats. *Endocrinology*, v.96, p.898-902, 1975.
- TSUANG, Y.H.; SUN, J.S.; CHEN, L.T. et al. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J. Orth. Surg. Res.*, v.1, p.1-10, 2006.
- TSUCHIYA, H.; TOMITA, H.; MORI, Y. et al. Caffeine-Assisted chemotherapy and minimized tumor excision for nonmetastatic osteosarcoma. *Anticancer res.*, v.18, p.657-668, 1998.
- TSUCHIYA, H.; TOMITA, H.; MORI, Y. et al. Marginal excision for osteosarcoma with caffeine assisted chemotherapy. *Clin. Orth. Res.*, v.358, p.27-35, 1999.
- TSUMAKI, N.; YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.16, p.279-285, 2005.
- TUAN, R.S. Cellular and molecular regulation of embryonic skeletal development and morphogenesis. *Cell. Mater.*, v.8, p.3-18, 1998.
- TYRALA, E.E.; DODSON, W.T. Caffeine secretion into breast milk. *Arch. Dis. Child.*, v.54, p.787-780, 1979.
- UETA, C.; IWAMOTO, M.; KANATANI, N. et al. Skeletal Malformations Caused by Overexpression of Cbfa1 or Its Dominant Negative Form in Chondrocytes. *J. Cell. Biol.*, v.153, p.87-99, 2001.
- URIST, M.R. Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, p.343-346, 1997.
- VAES, B.L.T.; DUCY, P.; SIJBERS, A.M. et al. Microarray analysis on Runx-2 deficient mouse embryos reveals novel Runx-2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone.*, v.39, p.724-738, 2006.
- VALDES, M.; SHAYE, R.; JOSEPH, F. et al. The effects of caffeine on the maxillary Composition in the newborn rat. *Calcif. Tissue Int.*, v.50, p.165-168, 1992.
- VLAJINAC, H.D.; PETROVIĆ, R.R.; MARINKOVIC, J.M. et al. Effect of caffeine intake during pregnancy on birth weight. *Am. J. Epidemiol.*, v.145, p.335-338, 1997.
- VORTKAMP, A.; LEE, K.; LANSKE, B. et al. Regulation of rate of cartilage differentiation by indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.*, v.273, p.613-622, 1996.
- VORTKAMP, A. Skeleton morphogenesis: defining the skeletal elements. *Curr. Biol.*, v.7, p.104-107, 1997.
- VORTKAMP, A.; PATHI, S.; PERETTI, G.M. et al. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech. Dev.*, v.71, p.65-76, 1998.
- WAKITA, R.; IZUMI, T.; ITOMAN, M. Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture. *Cell. Tissue Res.*, v.293, p.357-364, 1998.
- WANG, Q.; GREEN, R.P.; ZHAO, G. et al. Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development.*, v.128, p.3867-3876, 2001.
- WEIR, E.C.; PHILBRICK, W.M.; AMLINGT, M. et al. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral

- bone formation. *Dev. Biol.*, v.93, p.10240-10245, 1996.
- WEISER, M.; DE-LEVI, S.; BARNES, K.M. et al. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *PNAS.*, v.98, p.6871-6876, 2001.
- WEISS, A.; RAZ, E.; SILBERMANN, M. Effects of systemic glucocorticoids on the degradation of glycosaminoglycans in the mandibular condylar cartilage of newborn mice. *Bone Miner*, v.1, p.335-346, 1986.
- WHITING S.J.; WHITNEY H. Effect of dietary caffeine and theophylline on urinary calcium excretion in the adult rat. *J. Nutr.*, v.117, p.1224-1228, 1987.
- WINK, C.S.; ROSSOWSKA, M.J.; NAKAMOTO, T. Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. *Anat. Rec.*, v.246, p.30-38, 1996.
- WOZNEY, J.M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.*, v.32, p.160-167, 1992.
- YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.*, v.21, p.393-411, 2000.
- YANG, Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.*, v.19, p.197-218, 2009.
- YEH, J.K.; ALOIA, J.A.; SEMLA, H.S. et al. Influence of injected caffeine on the metabolism of calcium and the retention and excretion of sodium, potassium, phosphorus, magnesium, zinc and copper in rats. *J. Nutr.*, v.116, p.273-280, 1986.
- YOON, B. S.; OVCHINNIKOV, D.A.; YOSHII, I. et al. BMP1a and BPr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *PNAS.*, v.102, p.5062-5067, 2005.
- YOSHIDA, C.A.; YAMAMOTO, H.; FUJITA, T. et al. Runx-2 and Runx-3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx-2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.*, v.18, p.952-963, 2004.
- YU, K.; ORNITZ, D.M. The FGF ligand-receptor signaling system in chondrogenesis, osteogenesis and vascularization of the endochondral skeleton. *Int. Congr. Ser.*, v.1302, p.67-78, 2007.
- YUWONO, B. The effect of caffeine on osteoblast proliferation after tooth extraction in Wistar rats. *Maj. Ked. Gigi.*, v. 39, p.32-34, 2006.
- ZELZER, E.; OLSEN, B.R. The genetics basis for skeletal diseases. *Nature.*, v.423, p.343-348, 2003.
- ZHAO, Q.; EBERSPAECHER, H.; LEFEBVRE, V. et al. Parallel Expression of Sox-9 and Col2a1 in Cells Undergoing Chondrogenesis. *Dev. Dyn.*, v.209, p.377-386 1997.
- ZHAO, M.; HARRIS, S.E.; HORN, D., et al. Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J. Cell. Biol.*, v.157, p.1049-1060, 2002.
- ZHONG, M.; CARNEY, D.H.; BOYAN, B.D. et al. 17 Beta-estradiol regulates rat growth plate chondrocyte apoptosis through a mitochondrial pathway not involving nitric oxide or MAPKs. *Endocrinology.*, v.152, p.82-92, 2011.
- ZHOU, Y.; ZHU, Z.L.; GUAN, X.X. et al. Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: the possible mechanism for caffeine induced

osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. *Med. Hypotheses.*, v.73, p.83-85, 2009.

ZHOU, Y.; GUAN, X.X.; ZHU, Z.L. et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone

marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J. Pharmacol.*, v.161, p.1542-1552, 2010.

ZUZARTE-LUÍS,V.; HURLÉ, J.M. Programmed cell death in the developing limb. *Int. J. Dev. Biol.*, v.46, p. 871-876, 2002.

### ***ANEXO 1- Tabelas das análises de variâncias dos resultados dos experimentos 1 e 2.***

Anexo 1.1. Análise de variância da dosagem plasmática de cortisol (mcg/dL) de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle aos 21 dias de lactação.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	31	-	-	-
Grupo	3	0,1468	7,234	0,001
Erro	28	0,5683	-	-

Anexo 1.2. Análise de variância do número de malformações, ao nascimento, nos filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	37	-	-	-
Grupo	3	10,479	1,379	0,2657
Erro	34	7,596	-	-

Anexo 1.3. Análise de variância do número de filhotes nascidos e da porcentagem de filhotes mortos nos grupos de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	37	-	-	-
Grupo	3	0,06165	1,257	0,3045
Erro	34	0,04904	-	-

Anexo 1.4. Análise de variância do peso dos filhotes (g) de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle do nascimento até o desmame.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	37	-	-	-
Grupo	3	4,662	8,529	0,0002
Erro	34	0,5466	-	-

Anexo 1.5. Análise de variância do Comprimento corporal medido da nuca até a base da cauda de ratos com 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	90,602	14,964	0,0001
Erro	31	6,055	-	-

Anexo 1.6. Análise de variância do Comprimento (mm) dos membros torácicos de ratos com 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	37	-	-	-
Grupo	3	2,235	71,992	0,0001
Erro	34	0,03105	-	-

Anexo 1.7. Análise de variância do Comprimento (mm) dos membros torácicos de ratos com 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	37	-	-	-
Grupo	3	3,058	289,6	0,0001
Erro	34	0,01056	-	-



Anexo 1.8. Análise de variância do Comprimento do fêmur de ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,07077	19,163	0,0001
Erro	31	0,003693	-	

Anexo 1.9. Análise de variância da largura do fêmur dos ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,0002670	3,266	0,0344
Erro	31	8,177	-	

Anexo 1.10. Análise de variância do Comprimento da tibia dos ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,1898	32,331	0,0001
Erro	31	0,005869	-	

Anexo 1.11. Análise de variância da largura da tibia dos ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,002628	31,981	0,0001
Erro	31	8,216	-	

Anexo 1.12. Análise de variância do Comprimento do úmero dos ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,04610	17,594	0,0001
Erro	31	0,002620	-	

Anexo 1.13. Análise de variância da largura do úmero dos ratos de 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,0004482	1,661	0,1958
Erro	31	0,0002699	-	

Anexo 1.14. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular no tecido ósseo esponjoso primário da tíbia proximal de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	19	-	-	-
Grupo	3	575,59	6,109	0,0057
Erro	16	94,217	-	

Anexo 1.15. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular no tecido ósseo esponjoso primário das vértebras lombares de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	19	-	-	-
Grupo	3	1314,7	5,317	0,0098
Erro	16	1318,6	-	

Anexo 1.16. Análise de variância da espessura da placa epifisária vertebral (mm) dos ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	19	-	-	-
Grupo	3	0,01014	5,771	0,072
Erro	16	0,001757	-	

Anexo 1.17. Análise de variância do Comprimento (mm) do corpo vertebral de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	18	-	-	-
Grupo	3	0,1547	9,330	0,001
Erro	15	0,01658	-	

Anexo 1.18. Análise de variância da porcentagem de matriz na epífise cartilaginosa da tíbia de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	19	-	-	-
Grupo	3	44,409	0,4469	0,7229
Erro	16	99,379	-	

Anexo 1.19. Análise de variância da porcentagem de matriz na epífise cartilaginosa do fêmur de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	19	-	-	-
Grupo	3	26,987	0,1109	0,9525
Erro	16	243,26	-	

Anexo 1.20. Análise de variância da porcentagem de lacunas de condroblastos na epífise cartilaginosa do fêmur de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	18	-	-	-
Grupo	3	104,53	0,4405	0,7274
Erro	15	237,33	-	-

Anexo 1.21. Análise de variância da porcentagem de lacunas de condroblastos na epífise cartilaginosa da tibia de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	19	-	-	-
Grupo	3	24,103	0,2096	0,882
Erro	16	114,98	-	-

Anexo 1.22. Análise de variância da porcentagem de lacunas vazias em 100 células nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	18	-	-	-
Grupo	3	1826	12,199	0,0003
Erro	15	149,68	-	-

Anexo 1.24. Análise de variância da porcentagem de lacunas vazias em 100 células nas epífises cartilaginosas da tibia de ratos de 3 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	18	-	-	-
Grupo	3	2238	20,535	0,0001
Erro	15	108,98	-	-

Anexo 1.26. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífise do fêmur de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	36,627	0,7889	0,5093
Erro	31	46,427	-	

Anexo 1.27. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular na metáfise do fêmur de filhotes de 21 dias de idade de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	32	-	-	-
Grupo	3	40,565	0,9781	0,4166
Erro	29	41,473	-	

Anexo 1.28. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífise da tíbia de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	51,198	0,8398	0,4825
Erro	31	60,966	-	

Anexo 1.29. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular na metáfise da tíbia de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	31,270	0,3740	0,7723
Erro	31	83,605	-	

Anexo 1.30. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífise do úmero de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	31	-	-	-
Grupo	3	77,326	0,8509	0,4779
Erro	28	90,871	-	-

Anexo 1.31. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular na metafise de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	31	-	-	-
Grupo	3	9,066	0,1702	0,9156
Erro	28	53,279	-	-

Anexo 1.32. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular das vértebras torácicas de 1-7 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	33	-	-	-
Grupo	3	282,77	5,045	0,0060
Erro	30	56,047	-	-

Anexo 1.33. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular das vértebras torácicas de 8-13 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratados com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	33	-	-	-
Grupo	3	72,953	2,898	0,0513
Erro	30	25,171	-	-

Anexo 1.34. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular das vértebras lombares de 1-3 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	32	-	-	-
Grupo	3	120,62	0,9278	0,4398
Erro	29	130,01	-	-

Anexo 1.35. Análise de variância da porcentagem de tecido ósseo trabecular das vértebras lombares de 4-6 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	32	-	-	-
Grupo	3	87,313	1,478	0,2412
Erro	29	59,090	-	-

Anexo 1.36. Análise de variância da espessura (mm) da cartilagem articular do fêmur de ratas com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,00695	1,594	0,2107
Erro	31	0,004359	-	-

Anexo 1.37. Análise de variância da espessura (mm) da placa epifisária do fêmur de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,02308	1,127	0,3534
Erro	31	0,02049	-	-

Anexo 1.38. Análise de variância da espessura (mm) da cartilagem articular da tíbia de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,004115	0,8912	0,4615
Erro	31	0,00467	-	

Anexo 1.39. Análise de variância da espessura (mm) da placa epifisária da tíbia de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,01059	1,545	0,2226
Erro	31	0,006856	-	

Anexo 1.40. Análise de variância da espessura da cartilagem articular do úmero de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	31	-	-	-
Grupo	3	0,02014	5,446	0,0045
Erro	28	0,003699	-	

Anexo 1.41. Análise de variância da espessura da placa epifisária do úmero de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	31	-	-	-
Grupo	3	0,00465	0,775	0,5178
Erro	28	0,006	-	



Anexo 1.42. Análise de variância da espessura (mm) da placa epifisária das vértebras lombares de 1 a 3 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,005117	0,7982	0,5043
Erro	31	0,006411	-	

Anexo 1.43. Análise de variância da espessura (mm) da placa epifisária das vértebras lombares de 4-6 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,005959	0,9616	0,4232
Erro	31	0,006197	-	

Anexo 1.44. Análise de variância da espessura (mm) da placa epifisária das vértebras torácicas de 1-7 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	35	-	-	-
Grupo	3	0,005048	1,120	0,3555
Erro	32	0,004507	-	

Anexo 1.45. Análise de variância da espessura (mm) da placa epifisária das vértebras torácicas de 8-13 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,007138	1,115	0,3581
Erro	31	0,006403	-	

Anexo 1.46. Análise de variância do Comprimento vertebral (mm) da região torácica VT1-7 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,2140	5,654	0,0033
Erro	31	0.03785	-	-

Anexo 1.47. Análise de variância do Comprimento vertebral (mm) da região torácica VT8-13 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	33	-	-	-
Grupo	3	0,3091	3,466	0,0284
Erro	30	0.8918	-	-

Anexo 1.48. Análise de variância do Comprimento vertebral da região lombar VL1-3 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,7018	5,333	0,0044
Erro	31	0,1316	-	-

Anexo 1.49. Análise de variância do Comprimento vertebral da região lombar VL4-6 de ratos com 21 dias de idade, filhotes de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína e de ratas controle.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	34	-	-	-
Grupo	3	0,5613	6,464	0,0016
Erro	31	0,08684	-	-

Anexo 1.50. Análise de variância da porcentagem de lacunas vazias de condroblastos nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	51	-	-	-
Grupo	6	1988,1	18,113	0,0001
Erro	45	109,76	-	-

Anexo 1.52. Análise de variância da porcentagem de lacuna de condroblasto nas epífises cartilaginosas de fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	51	-	-	-
Grupo	6	3524	32,789	0,0001
Erro	45	107,48	-	-

Anexo 1.53. Análise de variância da porcentagem de condroblastos com expressão de CDC-47 nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	52	-	-	-
Grupo	6	32576	7,779	0,0001
Erro	46	4187,5	-	-

Anexo 1.54. Análise de variância do número de condroblastos apoptóticos/campo marcado pela técnica de Túnel nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	49	-	-	-
Grupo	6	84849	40,245	0,0001
Erro	43	2108,3	-	-

Anexo 1.55. Análise de variância da expressão de transcripto gênico para caspase-3 pela técnica de RT-PCR tempo real nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	17	-	-	-
Grupo	2	81,240	15,924	0,0002
Erro	15	5,102	-	-

Anexo 1.56. Análise de variância da expressão de transcripto gênico para Runx-2 pela técnica de RT-PCR tempo real nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	16	-	-	-
Grupo	2	0,4051	8,478	0,0039
Erro	14	0,04778	-	-

Anexo 1.57. Análise de variância da expressão de transcripto gênico para Sox-9 pela técnica de RT-PCR tempo real nas epífises cartilaginosas do fêmur de ratos neonatos cultivadas em meio com ou sem cafeína (controle).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	Significância
Total	15	-	-	-
Grupo	2	15,026	7,358	0,0073
Erro	13	2,042	-	-

## **ANEXO 2**

### **PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA**

#### **Kit: Estreptovidina-biotina-peroxidase**

- Xilol 1 (30 min)
- Xilol 2 (30 min)
- Álcool absoluto 1 (5 min)
- Álcool absoluto 2 (5 min)
- Álcool absoluto 3 (5 min)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5 min)
- Álcool 70% (5 min)
- Água corrente (5 min)
- Banho Maria a 98oC (Tampão Citrato pH 6,0) (20 min dentro e 20 min na temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)

- Bloqueio da peroxidase (30 min) (no escuro – 6 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Completar para 200 mL de metanol – **FAZER NA HORA**)

- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Soro bloqueio (30 min) – (câmara úmida a temperatura ambiente)
- Anticorpo 1o (overnight) – (câmara úmida na geladeira)

**Obs:** A diluição do arquivo está presente no material e métodos.

- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Anticorpo 2o (45 min) – (câmara úmida a temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- Estreptovidina-peroxidase (30 min)- (câmara úmida a temperatura ambiente)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- PBS (5 min)
- DAB (1 gota em 1 mL de diluente)]

**Obs.:** O tempo do DAB variou de acordo com o anticorpo primário e está presente no material e métodos.

- Água corrente (10 min)
- Hematoxilina (60 seg)
- Água corrente (10 min)
- Álcool 70% (3 min)
- Álcool 80% (3 min)
- Álcool 90% (3 min)
- Álcool absoluto 3 (10 min)
- Álcool absoluto 2 (10 min)
- Álcool absoluto 1 (10 min)
- Xilol 2 (10 min)
- Xilol 1 (10 min)
- Montagem da lâmina

**Preparo dos reagentes:**

**TAMPÃO CITRATO:** 1,05g de ácido cítrico + 500mL de dH<sub>2</sub>O (ajustar o pH para 6,0)

**PBS:** 7,2g de NaCl + 0,43g de fosfato de sódio monobásico +1,48g de fosfato de sódio dibásico + 1 L de dH<sub>2</sub>O

## **ANEXO 3**

### **PROTOCOLO DO TÚNEL**

#### **Kit: FragEL DNA Fragmentation Detection Kit – TdT Enzyme (Bateria para 10 laminas e 100 µl/corte)**

- Xilol (10 min).
- Xilol (10 min)
- Álcool absoluto (5 min)
- Álcool absoluto (5 min)
- Álcool 90% (5 min)
- Álcool 80% (5 min)
- Álcool 70% (5 min)
- TBS (5 min)
- Triton-X (10 min)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Proteinase K (20 min) – temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Bloqueio de peroxidase (30 min) – temperatura ambiente no escuro.
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- TdT Equilibration Buffer (20 min) – temp. ambiente (**Preparar o TdT Labeling Reaction Mixture**)
- TdT Labeling Reaction Mixture (1.5 hs) – **estufa a 37oC**

- TBS (5 min)
- Stop Solution a 37oC (5 min) – temperatura ambiente
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- Blocking Buffer (10 min) – temp. ambiente (**Preparar o 1X Conjugate**)
- 1X Conjugate (30 min) – câmara úmida a temperatura ambiente (**Faltando 5 min - preparar o DAB**)
- TBS (5 min)
- TBS (5 min)
- DAB (15 min).
- Água destilada (10 min)
- Methyl Green (5 - 15 min)
- Mergulhe 2 a 4 X em álcool absoluto
- Mergulhe 2 a 4 X em álcool absoluto novo
- Xilol (15 min) e monte a lamina.

**Preparo dos reagentes:**

**Proteinase K:** 10 µl de 2mg/mL de Proteinase K + 990 µl 10 mM Tris

**Bloqueio de peroxidase:** 200 mL de metanol + 6 mL de peróxido de hidrogênio

**TdT Equilibration Buffer:** 200 µl de 5X Buffer + 800 µl de dH2O

**TdT Labeling Reaction Mixture:** 30 µl TdT Enzyme + 570 µl TdT Labeling Reaction Mix

**1X Conjugate:** 20 µl 50X Conjugate + 980 µl Blocking Buffer

**DAB:** 1 tablete de DAB + 1 tablete de H2O2/Uréia + 1 mL de água de torneira

**TBS:** 24,55g de NaCl + 7,27g de Trisma Base + 3 litros de dH2O (ajustar pH para 7,6)

**TRIS:** 0,61g de Trisma Base + 500mL de dH2O (ajustar pH para 8,0)

## **ANEXO 4**

### **PROTOCOLO DO ÁCIDO FÓRMICO**

#### **Preparo da solução de ácido fórmico a 10%**

- - Solução 1: dissolver 450g de citrato de sódio em 1L de água destilada.
- - Diluir 200mL de ácido fórmico em 800mL de água destilada e colocar na solução 1.
- - Acrescentar 1L de ácido fórmico e 2L de água destilada na solução 1

#### **Metodologia para descalcificação de ossos longos e vértebras em solução de ácido fórmico a 10%, processamento pela técnica de inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.**

- - Fixar os ossos em formalina a 10%, neutra e tamponada.
- - Retirar os tecidos musculares e conectivos adjacentes.
- - Envolver os ossos em gaze e descalcificá-los em ácido fórmico a 10%, fazendo a troca de ácido fórmico a cada 2 dias.
- - Após Completa descalcificação controlada por raios-X, lavar os ossos em água corrente por 24 horas
- - Seccionar os ossos em duas metades, pelo seu eixo longitudinal.
- - Processar os ossos pela técnica de inclusão em parafina que consiste na passagem dos ossos nas seguintes etapas:
  - álcool 70% ..... 2 horas
  - álcool 80% ..... 2 horas
  - álcool 90% ..... 2 horas
  - álcool absoluto usado ..... 2 horas

- álcool absoluto novo ..... 2 horas
  - xilol ..... 40 minutos
  - embebição pela parafina ..... 40 minutos
  - inclusão em parafina (emblocar)
- Corar as secções histológicas de 4µm pela técnica de hematoxilina-eosina que consiste nas seguintes etapas:
- estufa 60°C ..... 15 minutos
  - xilol I ..... 10 minutos
  - xilol II ..... 10 minutos
  - álcool absoluto I ..... 5 minutos
  - álcool absoluto II ..... 5 minutos
  - álcool absoluto III ..... 5 minutos
  - álcool 90% ..... 5 minutos
  - álcool 80% ..... 5 minutos
  - água destilada ..... 3 minutos
  - hematoxilina ..... 1 minuto
  - água corrente ..... 15 minutos
  - eosina ..... 2 minutos
  - álcool 95% ..... 20 segundos
  - álcool 95% ..... 30 segundos
  - álcool absoluto I ..... 2 minutos
  - álcool absoluto II ..... 15 minutos
  - álcool absoluto III ..... 15 minutos
  - xilol I..... 2 minutos
  - xilol II..... 2 minutos
  - montagem da lâmina com bálsamo

## ***ANEXO 5***

### ***PROTOCOLO DA COLORAÇÃO DE SAFRANINA O***

#### **Preparo da solução de Safranina O 0,1%**

- - 0,1g de Safranina O em 100 mL água destilada.

#### **Preparo da solução de Fast Green 0,1%**

- - 1g Fast Green em 1000 mL água destilada.

#### Preparo da solução de *Ácido Acético 1%*

- - 1mL *Ácido Acético* em 99 mL *água destilada*

#### Protocolo *Safranina O*

Corar as secções histológicas de 4µm pela técnica de safranina que consiste nas seguintes etapas:

- |                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| ▪ estufa 60°C .....              | 15 minutos  |
| ▪ xilol I .....                  | 15 minutos  |
| ▪ xilol II .....                 | 15 minutos  |
| ▪ álcool absoluto I .....        | 5 minutos   |
| ▪ álcool absoluto II .....       | 5 minutos   |
| ▪ álcool absoluto III .....      | 5 minutos   |
| ▪ álcool 90% .....               | 5 minutos   |
| ▪ álcool 80% .....               | 5 minutos   |
| ▪ água destilada .....           | 3 minutos   |
| ▪ Fast Green.....                | 5 minutos   |
| ▪ <i>Ácido Acético</i> .....     | 2 minutos   |
| ▪ Safranina .....                | Só mergulha |
| ▪ álcool absoluto I .....        | Só mergulha |
| ▪ álcool absoluto II .....       | 15 minutos  |
| ▪ xilol I.....                   | 2 minutos   |
| ▪ xilol II.....                  | 2 minutos   |
| ▪ montagem da lâmina com bálsamo |             |

#### *ANEXO 6*

#### *PROTOCOLO DA TÉCNICA DE PCR*

#### **Extração de RNA total**

- Homoginizar o tecido com pistilo.
- colocar 500 microlitros de trizol por eppendorf e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- transferir o conteúdo (tecido + trizol) para eppendorfes de 1,5mL.
- adicionar 0,2mL de clorofórmio/eppendorfe, agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos em temperatura ambiente.
- centrifugar por 15 minutos a 12000g (4°C).



- transferir a fase aquosa para outro eppendorfe.
- adicionar 500µl de isopropanol e incubar por 30 minutos no freezer à -80°C.
- centrifugar por 10 minutos a 12000g (4°C).
- retirar o sobrenadante.
- lavar o pellet com 1 mL de etanol 75%.
- centrifugar por cinco minutos a 10500g (4°C).
- secar o pellet por cinco minutos.
- dissolver o pellet em água DEPC (20µl por eppendorfe).
- incubar por 10 minutos a 55°C.
- dosar o RNA em espectrofotômetro. Antes de dosar fazer uma diluição de 1:50.
- estocar o RNA a -80°C.

## Síntese de cDNA

- Kit utilizado: Kit Super Script III platinum two step qRT-PCR with SYBR Green (cat. n. 11735-032).

Obs. 1: Antes de sintetizar o cDNA, fazer a dosagem do RNA em espectrofotômetro e calcular a quantidade de RNA que será necessária para fazer o MIX.

Obs. 2: Concentração de RNA - 1µg de RNA total.

Ex.: a dosagem de um determinado RNA foi: 500µg/1000µl

$$400 \mu\text{g} \text{ ----- } 1000 \mu\text{l}$$

$$1 \mu\text{g} \text{ ----- } x$$

$$x = 2,5 \mu\text{l de RNA}$$

Assim colocar 2,5 µl de RNA + 5,5 µl de água DEPC, pois o volume total (RNA + água) é de 8 µl.

- Preparar o Master MIX (RT-PCR):

Master MIX	1x	Ex.: 5x
2x RT reaction MIX	10 µl	50 µl
RT enzyme MIX	2 µl	10 µl
RNA (1µg)	2 µl	-----
Água DEPC qsp 20 µl	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 na máquina de PCR programada da seguinte forma:

- *programação A:*

25°C por 10 minutos

42°C por 50 minutos

85°C por cinco minutos

- colocar no gelo e adicionar 1 µl de RNase H por tubo

- *programação B:*

37°C por 20 minutos

- Estocar o cDNA a -20°C.

## Protocolo para diluição de primers

- Para as reações de qPCR, o recomendado pelo kit (Kit Super Script III platinum two step qRT-PCR with SYBR Green [cat. n. 11735-032]) é o uso de 1 µl de primer a 10 µM, ou seja, 10 pmol por reação de 50 µl. No entanto, como faremos apenas 25 µl de reação, utilizaremos 1 µl de primer a 5 pmol.

Ex.: Osteopontina Forward (F) - 5' ATC TCA CCA TTC CGA TGA ATC T3'

OD260 = 6,1 = 29,70 nmoles = 0,20 mg

Estoque: 100 pmol / µl

100 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ 1 µl

29,70 x 10<sup>-9</sup> mol \_\_\_\_\_ x

x = 297 µl de água DEPC

Uso: 5 pmol / µl

100 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ 1 µl (estoque)

5 pmol \_\_\_\_\_ 1 µl

250 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ x

x \_\_\_\_\_ 50 µl

x = 2,5 µl da solução estoque + 47,5 µl de água DEPC

x = 250 pmol

Ex.: Osteopontina Reverse (R) - 5'TCA GTC CAT AAG CCA AGC TAT CA3'

OD260 = 6,6 = 28,90 nmoles = 0,20 mg

Estoque: 100 pmol / µl

100 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ 1 µl

28,90 x 10<sup>-9</sup> mol \_\_\_\_\_ x

x = 298 µl de água DEPC



**ANEXO 7- Certificado de aprovação pelo Comitê de ética em experimentação animal**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 177/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Participação das células tronco e dos osteoblastos na gênese das alterações ósseas induzidas pelo consumo de cafeína em ratas e sua prole durante a gestação e amamentação**", que tem como responsável(is) **Rogéria Serakides**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **22/ 09/ 2010**.

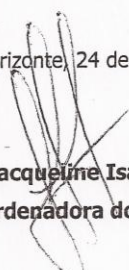
Este certificado expira-se em **22/ 09/ 2015**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 177/2010**, related to the project entitled "**Participation of stem cells and osteoblasts on the pathogenesis of bone changes induced by caffeine in rats and its offspring during pregnancy and breastfeeding**", under the supervisors of **Rogéria Serakides**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 22, 2010**.

This certificate expires in **September 22, 2015**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2010.

  
**Prof.ª Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
**Coordenadora do CETEA/UFMG**

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