

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos cursos de Pós-Graduação**

**EFEITO DO EXCESSO DE TIROXINA MATERNA E PÓS-NATAL SOBRE O PERFIL
PROLIFERATIVO, ANGIOGÊNICO E DE SÍNTESE DAS CARTILAGENS DE
CRESCIMENTO DE RATOS**

Lorena Gabriela Rocha Ribeiro

**Belo Horizonte
2016**

Lorena Gabriela Rocha Ribeiro

Efeito do excesso de tiroxina materna e pós-natal sobre o perfil proliferativo, angiogênico e de síntese das cartilagens de crescimento de ratos

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

Área: Patologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Coorientadoras: Profa. Dra. Natália Melo Ocarino e

Profa. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2016

R484e

Ribeiro, Lorena Gabriela Rocha, 1985-

Efeito do excesso de tiroxina materna e pós-natal sobre o perfil proliferativo, angiogênico e de síntese das cartilagens de crescimento de ratos / Lorena Gabriela Rocha Ribeiro. -2016.

157 p. : il

Orientadora: Rogéria Serakides

Coorientadoras: Natália Melo Ocarino, Eliane Gonçalves de Melo

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Tiroxina – Teses. 3. Neovascularização- Teses. 4. Ossos- crescimento – Teses. 5. Cartilagem – Teses. I. Serakides, Rogéria. II. Ocarino, Natália de melo. III. Melo, Eliane Goncalves de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de veterinária. V. Título.

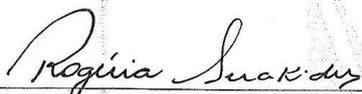
CDD – 636.0885

FOLHA DE APROVAÇÃO

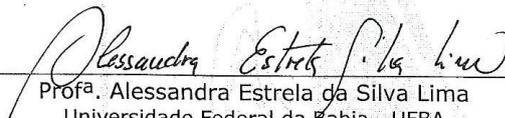
LORENA GABRIELA ROCHA RIBEIRO

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

Aprovada em 15 de Abril de 2016, pela banca constituída pelos membros:



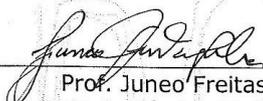
Prof^ª. Rogéria Serakides
Presidente - Orientador



Prof^ª. Alessandra Estrela da Silva Lima
Universidade Federal da Bahia - UFBA



Dr^ª. Carla Maria Osório Silva
Doutorado - UFMG



Prof. Juneo Freitas Silva
Instituto de Ciências Biológicas - ICB



Prof^ª. Milene Alvarenga Rachid
Instituto de Ciências Biológicas - ICB-UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Caixa Postal 567 - CEP 30123-970
Belo Horizonte - Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)
www.vet.ufmg.br
E-mail: cap@vet.ufmg.br



AGRADECIMENTOS

À Deus, que em toda sua sabedoria, nos guia nos diversos caminhos da vida; nos impõe às dificuldades que necessitamos para evoluir e sermos melhores, sempre indulgente com nossa incapacidade. Conforta-nos e dá força; desperta e amplia a mente de quem tem a sensibilidade das percepções; envia-nos anjos de guarda e as boas pessoas do nosso convívio, deixando cada dia mais leve e alegre, simplesmente emanando a paz dentro de cada um de nós.

Aos meus pais, Rita e Ronaldo, por todos os sacrifícios que fizeram por nossa educação, em especial por nos ensinar na prática a base sólida de uma família e sua fundamental importância na construção de valores morais e sociais. Sou muito grata por quem sou hoje, por ter aprendido com vocês.

Ao meu padrinho Átila, meu segundo pai, que me ensinou valores que transcendem essa pequena fase de toda uma imensidão ainda por seguir. Obrigada por me fazer entender cada momento, por me ensinar a crescer, ouvir, falar e calar.

Aos meus irmãos, Taís e Fábio e meus sobrinhos, Gui e Humberto, por me encherem a paciência... E o coração de tanto carinho e amor!

À minha enorme família, minha fortaleza, meus mais fortes laços de união. Vocês me fazem sentir abençoada e infinitamente feliz! Em especial, Vó Regina e Vovó Zica, pelos cuidados e carinhos. Meus tios e tias, Leninha, Sueli, Lenira, Marcos, Gabi e Gabrielle. E primas, Rose, Ritinha, Lari e Dani, que nestes quatro anos me alegraram e me apoiaram.

Às amigas que se solidificaram com o passar dos anos, Edi, Tana, Mila (e Tia Ângela, meu abraço de luz), Carol, Lu, Pri, Paloma e Everaldo, riquezas de minha vida.

À Gabi, por ser meu equilíbrio há 20 anos! Obrigada por me visitar em cada um destes anos em BH. Momentos trouxeram afago, boas lembranças, paz e muita alegria.

Aos amigos e professores do LPV-UFBA, em especial a Profa. Alessandra, nossa querida Estrela, que me ensinou a base da patologia e me ajudou a concretizar os mais grandiosos sonhos!

A minha família da República, Kari, Naty e Kelly, pelo convívio, amizade, apoio e preocupação. Agradeço a Deus por ter nos colocados juntas neste lar e por mostrar que as diferenças são insignificantes quando se tem amor.

A Kari, minha irmã, meu orgulho, meu apoio! Certamente, Deus nos uniu pelo bem que poderíamos fazer uma pela outra! Obrigada por fazer a diferença em meus caminhos.

A Diego, amigo, anjo de guarda, que iluminou meus dias, me fortaleceu e revelou tanto sobre mim e a vida. Caminhou e cresceu comigo, esteve ao meu lado quando mais precisei. Sem dúvidas, “o essencial é invisível aos olhos”!

A Eneida, minha mentora, que me viu pequena e me viu crescer. E como me fez crescer! Sábias palavras que permearam minha mente e se concretizaram em ações. Confiar, relativizar, suavizar, agradecer, equilibrar, respeitar, ser paciente, ter humildade e a semear paz. Meus

agradecimentos a você são diariamente ouvidos por Deus, sob as mais sinceras orações. “Em tudo, dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco”. Tessalonicenses 5.18

À Profa Rogéria Serakides, pela oportunidade, orientação, ensinamentos referentes à patologia e pesquisa científica, os quais, sem dúvidas, me auxiliarão por toda a minha vida profissional. Sou infinitamente grata por me ajudar a tornar um sonho possível, em realidade, com tamanha dedicação e compaixão. Deus sempre é muito justo nos nossos caminhos e é na fé, que ele faz desaparecer nossos medos e preocupações, pois Ele recompensa nossas boas ações com muito mais bontade, luz e bênçãos em nossa vida.

À Profa Natália Ocarino, pela orientação, paciência, tantos ensinamentos e direcionamentos. Obrigada pela preparação durante as aulas de necropsias, que foram essenciais em minha formação e por toda a ajuda nesta reta final.

À Profa Eliane Gonçalves de Melo pela coorientação e imenso auxílio na correção deste trabalho. Muito obrigada pela compreensão e pronta disposição em ajudar.

Aos professores da Patologia, Profa Rogéria Serakides, Profa Natália de Melo Ocarino, Prof. Ernane Fagundes, Prof. Felipe Pierezan, Prof. Roberto Guedes, Prof. Renato Lima e Profa Roselene Ecco, por todo o ensinamento transmitido durante nestes anos com dedicação, precisão e estimulando sempre a busca pelo conhecimento.

Aos amigos do dia a dia, Juneo, meu irmão querido, Amanda Maria e Cíntia Maria (e Tutu), que me ajudaram imensamente nos experimentos, compartilharam ensinamentos, carinho e risadas, descontraindo as tensões diárias.

À família patológica UFMG, como foi bom conviver e aprender patologia com cada um de vocês! O *coffee*, pós-almoço será um marco em nossas vidas! Ju Maria e Rodrigo, meus gêmeos, obrigada pela sincera amizade, confiança e pelo quanto me fazem sorrir! Laís, minha doce irmã escolhida. Talita, minha amada amiga e anjo de guarda. Carlos, querido Passarinho, amigo, conselheiro, incentivador e tira-dúvidas. Tati Aparecida, sempre presente com muito amor e disposição! Lu, minha “Broda”, por ser sempre tão carinhosa e bondosa com todos ao seu redor. Bruno, meu eterno R1. AP e Auri, pela amizade e carinho. Amandita, pelo carinho, cuidados e preocupações. Sato, que fez desses anos um novo episódio de Harry Potter! Mimis, minha encenqueira que tanto amo! Matheus, “zoin” ectópico no nosso coração! Karina, pelo carinho e por ser tão prestativa. Ingrid, Camilita, Claudinha, Luisa e Teane, as mais doces e carinhosas patológicas. Tati Carvalho, pelas boas risadas. Javier, que me divertiu e enlouqueceu com esse “Portunhol”. Núbia, pelo melhor *coffee*! Rachel, por seus abraços verdes. Sílvia, por tanta risada e ensinamentos. Victor, Isabela, Andreia e Thaise pelas companhias e discussões de casos.

As “Resis”, que fizeram dos meus dias uma loucura! Tenho imenso carinho por cada uma de vocês, Pâmela, minha R3 atrapalhada e muito querida; Thai, meu bebê com o maior coração do mundo; Dyeime (e Mamá), minhas guerreiras e Maria, carma que tanto amo! Obrigada pela ajuda e ensinamentos compartilhados nestes meses!

Às técnicas do Laboratório de Patologia, Leimar e Natalia, e Luiz, técnico de necropsia, obrigada por toda a ajuda, pelos momentos do *coffee*, boas conversas e pelas boas risadas.

Aos amigos da veterinária, Ermilton, Conrado, Saira, João, Cairo, Karen pela companhia, conselhos, diversões e imensa amizade! E que dure além das barreiras físicas!

Endrigo, pelo treinamento em cultivo celular e Silvinha, por todas as vezes que me ajudou no experimento, com muita dedicação e carinho.

A Graciela, pela imensa ajuda, sempre com muita competência e paciência, com as reações de PCR.

Às secretárias Flávia e Luzete, pela ajuda e convivência.

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, em especial Dona Bete, Vitalina, Fábio, Jeferson, Nei, João e os porteiros da noite, pela preocupação e cuidado.

Aos componentes titulares, Profa. Dra. Milene Rachid, Profa. Dra. Alessandra Estrela, Dra. Carla Osório e Dr. Juneo Freitas, e aos suplentes, Profa Cleuza Ferreira e Prof Dr. José Carlos de Oliveira filho, pela compreensão e prontidão em compor a banca para avaliação desta tese.

Aos Professores Geovanni Cassali e Enio Ferreira do LPC, por me acolherem sempre e continuar a me ajudar e auxiliar quando precisei.

À Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais, a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro destinado a realização deste trabalho.

*“Se eu quiser falar com Deus,
Tenho que ficar a sós, tenho que apagar a luz,
Tenho que calar a voz, tenho que encontrar a paz,
Tenho que folgar os nós dos sapatos, da gravata
Dos desejos, dos receios
Tenho que esquecer a data, tenho que perder a conta
Tenho que ter mãos vazias, ter a alma e o corpo nus*

*Se eu quiser falar com Deus,
Tenho que aceitar a dor(...),
(...) Tenho que me ver tristonho,
Tenho que me achar medonho
E apesar de um mal tamanho
Alegrar meu coração*

*Se eu quiser falar com Deus
Tenho que me aventurar,
Tenho que subir aos céus sem cordas para segurar
Tenho que dizer adeus, dar as costas,
Caminhar decidido pela estrada
Que ao findar vai dar em nada
Nada, nada, nada, nada
Do que eu pensava encontrar”.*
Gilberto Gil

Agradecemos especialmente à aluna de medicina portadora de hipertireoidismo congênito associado a nanismo, que com sua indagação sobre a gênese dos seus problemas ósseos, motivou a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELA.....	18
RESUMO.....	19/
ABSTRACT.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS.....	24
CAPÍTULO 1.....	25
REVISÃO DE LITERATURA.....	25
1. Formação óssea ou ossificação endocondral.....	25
2. Crescimento ósseo endocondral.....	30
3. Mecanismos regulatórios, genes e fatores de crescimento envolvidos na formação e crescimento ósseos endocondrais.....	33
3.1 Controle da proliferação e diferenciação dos condroblastos e condrócitos.....	34
3.2 Controle da atividade apoptótica.....	41
3.3 Regulação da atividade angiogênica nas cartilagens de crescimento.....	43
3.4 Controle da atividade de síntese dos condrócitos.....	47
4. A tireoide e os hormônios tireoidianos.....	50
5. Ação dos hormônios tireoidianos no osso e na cartilagem.....	53
5.1 Disfunções tireoidianas e alterações ósseas.....	55
5.2 Disfunções tireoidianas maternas e alterações ósseas na prole.....	56
CAPÍTULO 2.....	59
Efeito do excesso de tiroxina materna sobre o perfil proliferativo e angiogênico das cartilagens de crescimento de ratos ao nascimento e desmame.....	59
Resumo.....	59
Introdução.....	59
Material e Métodos.....	60
<i>Acasalamento e administração de tiroxina.....</i>	60
<i>Dosagem plasmática de T₄ livre.....</i>	61
<i>Processamento e análise histomorfométrica da tireoide.....</i>	62
<i>Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur.....</i>	62
<i>Processamento histológico e análise histomorfométrica dos ossos.....</i>	62
<i>Análise imunoistoquímica das cartilagens de crescimento.....</i>	63
<i>Expressão de transcritos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento.....</i>	63
<i>Análise estatística.....</i>	64
Resultados.....	64
<i>Concentração plasmática de tiroxina e histomorfometria da tireoide.....</i>	64
<i>Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur.....</i>	66
<i>Histomorfometria óssea.....</i>	67
<i>Expressão imunoistoquímica de CDC-47, VEGF, Flk-1, Ang2 e Tie2.....</i>	71

Discussão	79
CAPÍTULO 3	83
Efeito do excesso de tiroxina materna associado ao hipertireoidismo pós-natal sobre o crescimento ósseo endocondral e perfil proliferativo e angiogênico das cartilagens de crescimento de ratos.....	83
Resumo	83
Introdução	83
Material e métodos	84
<i>Acasalamento e administração de tiroxina</i>	85
<i>Dosagem plasmática de T₃ total e T₄ livre</i>	85
<i>Processamento e análise histomorfométrica da tireoide</i>	85
<i>Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur</i>	86
<i>Processamento histológico e análise histomorfométrica dos ossos</i>	86
<i>Análise imunoistoquímica das cartilagens de crescimento</i>	87
<i>Expressão de transcriptos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento</i>	87
<i>Análise estatística</i>	88
Resultados	88
<i>Concentração plasmática dos hormônios tireoidianos e histomorfometria da tireoide</i>	88
<i>Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur</i>	90
<i>Histomorfometria das cartilagens de crescimento e do tecido ósseo</i>	90
<i>Expressão imunoistoquímica de CDC-47 e VEGF</i>	93
<i>Expressão dos transcritos gênicos para VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2</i>	96
Discussão	98
CAPÍTULO 4	101
Efeito do excesso de tiroxina materna e pós-natal na histoquímica, morfometria e expressão de transcritos gênicos da matriz condrogênica de ratos em crescimento.....	101
Resumo	101
Introdução	101
Material e métodos	102
<i>Acasalamento e administração de tiroxina</i>	102
<i>Dosagem plasmática de T₄ livre</i>	104
<i>Processamento e análise histomorfométrica da tireoide</i>	104
<i>Processamento histológico, análise morfométrica e histoquímica das cartilagens de crescimento</i>	104
<i>Expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento</i>	105
<i>Análise estatística</i>	105
Resultados	106
<i>Concentrações plasmáticas de tiroxina e histomorfometria da tireoide</i>	106
<i>Análise histomorfométrica e histoquímica das cartilagens de crescimento</i>	108
<i>Expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento</i>	111
Discussão	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS	121

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
ANEXOS	151
Anexo 1. Certificado do CEUA.....	151
Anexo 2. Preparo da solução de tiroxina (50µg/5mL) para indução do hipertireoidismo	152
Anexo 3. Metodologia para descalcificação dos ossos longos	152
Anexo 4. Técnica de inclusão em parafina para processamento histológico de ossos.....	152
Anexo 5. Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina	153
Anexo 6. Protocolo para gelatinizar lâminas.....	153
Anexo 7. Protocolo da imunistoquímica para osso.....	154
Anexo 8. Extração de RNA total com trizol (tecido).....	155
Anexo 9. Síntese do cDNA	155
Anexo 10. RT-PCR tempo real	156
Anexo 11. Protocolo da coloração por safranina-O.....	156
Anexo 12. Protocolo da coloração por alcian blue (pH 2,5)	157
Anexo 13. Protocolo da coloração por ácido periódico de schiff (PAS)	157

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK: proteína quinase ativada por AMP
Ang: angiopoetina
ANOVA: análise de variância
Bax: proteína x associada ao Bcl-2
Bcl-2: *B cell lymphoma -2*
BMPs: proteínas morfogenéticas do osso
CDC-47: proteína 47 de controle de divisão celular
Col: colágeno
COMP: proteína oligomérica da matriz cartilaginosa
CTGF/CCN2: fator de crescimento de tecido conectivo
D: iodotironina desidase
DAB: diaminobenzidina
DC: displasia compomélica
DEPC: Diethylpirocarbonato
Dhh: *desert hedgehog*
DNA: ácido desoxirribonucleico
En-1: Homeobox engrailed-1
ERA: crista ectodérmica apical
FGF: fator de crescimento fibroblástico
FGFBP: proteína de ligação específica a FGF
FGFR: receptor do fator de crescimento fibroblástico
Flk-1: *Fetal liver kinase 1* (VEGFR2)
Flt1: receptor Fms tirosine quinase 1(VEGFR1)
Flt-(1-3)-IgG: Proteína quimera solúvel
GAG: glicosaminoglicano
GH: hormônio do crescimento
HE: Hematoxilina-Eosina
Hh: proteína hedgehog
HHT: eixo hipotálamo-hipófise-tireoide
HIF: fator induzível por hipóxia
HREs: elementos responsivos ao hormônio
HTs: hormônios tireoidianos
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina
Ihh: hedgehog indiano
MAPK: proteína quinase mitógeno-ativada
MEC: matriz extracelular
MMPs: metaloproteinases de matriz
N-caderina: caderina neural
N-CAM: molécula de adesão celular neural
PAS: ácido periódico de *Schiff*
PBS: solução tampão de fosfato padrão
PCR: reação em cadeia da polimerase
Pi: fósforo inorgânico
PlGF: fator de crescimento placentário
Ptc: receptor *patched*
PTH: paratormônio
PTHrP: peptídeo relacionado ao paratormônio

RNA: ácido ribonucleico
rT3 - T3 reverso
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
RUNX: fator de transcrição 2 relacionado ao Runt
Shh: *sonic hedgehog*
Smo: coreceptor smoothemed
SOX: *SRY-box*
T₃: triiodotironina
T₄: tiroxina
TGF: fator de transformação de crescimento
Tie: receptor tirosina quinase
TIMPs: inibidores de metaloproteinases específicas de tecidos
TNF: fator de necrose tumoral
TR: receptor tireoidiano
TRH: hormônio liberador da tireotropina
TRs: receptores nucleares tireoidianos
TSH: hormônio estimulador da tireoide
VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular
WNT: via de sinalização *Wingless*
ZPA: zona de atividade polarizada

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama esquemático da condrogênese demonstrando a diferenciação das células tronco mesenquimais até condrócitos e as principais alterações na composição da matriz extracelular. 27
- Figura 2. Desenho esquemático da formação e crescimento ósseos endocondrais. 29
- Figura 3. Zonas da placa epifisária. 31
- Figura 4. Atuação do Runx durante a diferenciação osteogênica e condrogênica.. 36
- Figura 5. Síntese dos hormônios tireoidianos a partir do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e biodisponibilização para os tecidos.. 52
- Figura 6. Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo e seleção da prole nos grupos controle e tratado com L-tiroxina. 61
- Figura 7. Concentrações plasmáticas de T₄ livre (média±SD) de ratas em lactação controle e tratada com L-tiroxina e de ratos com 20 dias de idade.. 65
- Figura 8. Histomorfometria da tireoide (média±SD) dos neonatos e ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina.. 66
- Figura 9. Peso corporal (g) e comprimento e largura (mm) do fêmur dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina.. 67
- Figura 10. Histomorfometria óssea da região distal dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina..... 69
- Figura 11. Expressão imunoistoquímica de CDC-47 nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. 72
- Figura 12. Expressão imunoistoquímica de VEGF nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. 73
- Figura 13. Expressão imunoistoquímica de Flk-1 nas epífises cartilaginosa da região distal dos fêmures dos neonatos, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. 75
- Figura 14. Expressão imunoistoquímica de Tie2 nas epífises cartilaginosa da porção distal do fêmur dos neonatos, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina..... 76
- Figura 15. Expressão dos transcritos gênicos para *Vegf*, *Flk-1*, *Ang1*, *Ang2* e *Tie2* pela técnica de RT-PCR em tempo real..... 77

Figura 16. Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo nas ratas mães e prole com 40 dias nos grupos controle e tratado com L-tiroxina.....	86
Figura 17. Níveis de hormônios da tireoide (média±SD) no plasma das ratas mães controle e tratadas com L-tiroxina e da prole aos 40 dias de idade..	89
Figura 18. Histomorfometria da tireoide (média±SD) de ratos controle e hipertireoideos..	89
Figura 19. Peso corporal (g), comprimento (mm) e espessura (mm) do fêmur de ratos controle e hipertireoideos (p >0,05).....	90
Figura 20. Histomorfometria óssea da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideo.	91
Figura 21. Expressão imunistoquímica de CDC-47 nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideo..	94
Figura 22. Expressão imunistoquímica de VEGF nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideos.	95
Figura 23. Expressão dos transcritos gênicos para <i>Vegf</i> , <i>Flk-1</i> , <i>Ang1</i> , <i>Ang2</i> e <i>Tie-2</i> pela técnica de RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideos.....	96
Figura 24. Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo e seleção da prole nos grupos controle e tratado com L-tiroxina.	103
Figura 25. Concentrações plasmáticas de T ₄ livre (média±SD) ao final da lactação das ratas controle e tratadas com L-tiroxina e da prole com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado. Histomorfometria da tireoide (média±SD) de ratos tratados e controle.....	107
Figura 26. Histomorfometria das cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina..	108
Figura 27. Histoquímica pela coloração de safranina-O das cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina..	109
Figura 28. Histoquímica pela coloração de <i>alcian blue</i> nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina..	112

Figura 29. Histoquímica pela coloração de PAS das cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina. 113

Figura 30. Expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Runx2*, *Agrecan*, *colágeno I*, *colágeno II*, *caspase3*, *Fostatase alcalina*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Bmp2* pela técnica de RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideos. 114

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Iniciadores dos transcritos gênicos delineados com base na sequência do mRNA <i>Rattus norvegicus</i>	64
Tabela 2. Efeito do excesso de T4 em todos os parâmetros avaliados na prole de ratas em relação ao grupo controle.	78
Tabela 3. Iniciadores dos transcritos gênicos delineados com base na sequência do mRNA <i>Rattus norvegicus</i>	88
Tabela 4. Efeito do excesso de T4 em todos os parâmetros avaliados na prole com 40 dias em relação ao grupo controle.	97
Tabela 5. Iniciadores dos transcritos gênicos delineados com base na sequência do mRNA <i>Rattus norvegicus</i>	106
Tabela 6. Efeito do excesso de T4 em todos os parâmetros avaliados na prole com 40 dias em relação ao grupo controle.	115

RESUMO

Foram realizados três estudos distintos para avaliar os efeitos do excesso de tiroxina materna e pós-natal sobre o crescimento ósseo e as cartilagens de crescimento de ratos. Foram utilizadas 16 ratas Wistar adultas. As ratas cruzaram e a partir do primeiro dia de gestação foram distribuídas igualmente nos grupos controle e tratado, com oito animais cada. Foi administrada diariamente L-tiroxina (50µg/animal) para as mães do grupo tratado e água destilada para o controle, por via oral, durante a gestação e a lactação. Foram separados três filhotes de cada rata, o primeiro eutanasiado ao nascimento e o segundo com 20 dias de idade. O terceiro filhote foi desmamado aos 20 dias de idade e permaneceu recebendo tiroxina ou água destilada, dependendo do grupo, até os 40 dias de idade. O primeiro estudo avaliou os efeitos do excesso de tiroxina materna nas cartilagens de crescimento ao nascimento e aos 20 dias de idade, a partir da avaliação do perfil proliferativo, baseado na expressão de CDC-47 e do perfil angiogênico, pela expressão de VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2. O segundo estudo avaliou os efeitos do excesso da tiroxina materna e pós-natal sobre o perfil proliferativo e angiogênico das cartilagens de crescimento de ratos com 40 dias de idade. O terceiro estudo avaliou os efeitos do excesso da tiroxina materna e pós-natal nas atividades de síntese das cartilagens de crescimento de ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade, baseado na histoquímica da matriz cartilaginosa pelas colorações de safranina-O, *alcian blue* e PAS, e na expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Runx2*, *Agrecan*, *Col I*, *Col II*, *Caspase 3*, *FA*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Bmp2* por RT-PCR em tempo real. Foi realizada análise de variância com comparação das médias pelo teste T de *student*. A dosagem de T₄ livre foi maior nas ratas mães tratadas e na prole com 40 dias, enquanto a altura do epitélio folicular da tireoide foi menor em todos os animais dos grupos tratados. O excesso de tiroxina materna reduziu o peso corporal e o comprimento do fêmur dos filhotes ao nascimento e aos 20 dias. Os animais com 40 dias do grupo tratado apresentaram redução do crescimento ósseo em espessura. Houve aumento da espessura e da porcentagem de trabéculas ósseas e alteração na espessura das zonas da placa epifisária dos neonatos e dos ratos com 20 dias do grupo tratado. Nos animais com 40 dias de idade tratados com tiroxina, foi observada alteração na morfologia da placa epifisária e redução na espessura da cartilagem articular. Além disso, o excesso de tiroxina reduziu a proliferação celular e a expressão de VEGF nas cartilagens de crescimento em todas as idades estudadas. Houve também redução da expressão imunohistoquímica de Tie2 na epífise cartilaginosa dos neonatos, de Flk-1 na cartilagem articular dos ratos com 20 dias e dos transcritos gênicos para Ang1 na cartilagem articular dos ratos com 40 dias. A histomorfometria das cartilagens de crescimento revelou menor porcentagem de condrócitos/área na epífise cartilaginosa dos neonatos e na cartilagem articular dos ratos com 40 dias de idade dos grupos tratados. O excesso de tiroxina esteve associado ainda à redução de glicogênio, glicosaminoglicanos, proteoglicanos não sulfatados e dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Mmp2*, *Mmp9*, *col II* e *Bmp2* nas cartilagens de crescimento da prole. Conclui-se que a redução do crescimento ósseo decorrente do excesso de tiroxina está associada à menor proliferação e da expressão de VEGF nas cartilagens de crescimento em todas as idades, à redução da expressão dos receptores *Flk-1* e *Tie2* nas cartilagens de ratos neonatos e com 20 dias e à redução da expressão de *Ang1* nas cartilagens de crescimento de ratos com 40 dias. Além disso, o excesso de tiroxina influencia a composição da MEC das cartilagens de crescimento, por reduzir a quantidade de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Mmp2*, *Mmp9*, *col II* e *Bmp2* e por alterar de forma diferenciada, de acordo com a idade, a expressão dos transcritos para *Runx2*, *Agrecan*, *col I* e *caspase3*.

Palavras-chave: tiroxina, cartilagens de crescimento, angiogênese, proliferação, matriz extracelular, rato

ABSTRACT

Three different experiments were developed to evaluate *in vivo* effects of excess maternal and postnatal thyroxine in bone growth and growth cartilages. Sixteen female adult Wistar rats were used. The rats mated and, they were divided into two groups – control and treated – with eight animals each on the first day of gestation. L-thyroxine (50µg/animal) was orally administered daily for female rats in the treated group and distilled water for the control group during pregnancy and lactation. Three offspring were separated from each rat, the first was euthanized at birth and the second at 20-days-old. The third offspring was weaned at 20-day-old and received a daily dose of L-thyroxine or distilled water, depending on the group, until 40 days old. The aim of the first study was to evaluate the effects of excess of maternal thyroxine on the growth cartilage of neonatal and weanling rats, analyzing the proliferative activity by CDC-47 expression and angiogenic profile by VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2, and Tie2 expression. The second experiment evaluated the effects of excess of maternal thyroxine associated with postnatal hyperthyroidism on the proliferative and angiogenic profile of cartilage growth of 40-day-old rats. The third experiment evaluated the effects of excess of maternal and postnatal thyroxine on the synthesis activities of the cartilage matrix in neonatal, 20-day-old and 40-day-old rats based on histochemistry of the cartilage matrix by Safranin-O, alcian blue, and PAS stainings and expression of gene transcripts for Sox9, Runx2, aggrecan, Col I, Col II, Caspase3, alkaline phosphatase, Mmp2, Mmp9 and Bmp2 by real-time RT-PCR. Data were analyzed using Student's *t*-test. Free T₄ was significantly higher only in the treated female rats and in treated 40-day-old rats, but the height of the follicular epithelium of the thyroid offspring was significantly lower in the treated group regardless of age. The excess of maternal thyroxine significantly reduced the body weight and length of the femur in treated neonates and 20-day-old rats. The treated 40-day-old rats showed reduction in width of the bone shaft. There was a significant increase in thickness of the trabecular bone and a change in thickness of the zones of the growth plate in treated neonates and 20-day-old rats. In treated 40-day-old rats it was observed an altered morphology of the epiphyseal plate and reduction in the thickness of the articular cartilage. Furthermore, excessive maternal thyroxine caused reduction in both cell proliferation and VEGF expression in the growth cartilage in all offspring ages. There was also a decrease in immunohistochemical expression of Tie2 in the cartilaginous epiphysis of the newborns and Flk-1 in the articular cartilage of 20-day-old rats and significant reduction in gene transcripts for Ang1 in articular cartilage of 40-day-old rats. Histomorphometry of cartilage growth plates showed a lower percentage of chondrocytes/area in the cartilaginous epiphysis of newborns and in the articular cartilage of treated 40-day-old rats. Excess of maternal and postnatal thyroxine was also associated to reduction of intracellular glycogen and glycosaminoglycans and non-sulfated proteoglycans in the cartilage growth and gene transcripts for Sox9, Mmp2, Mmp9, Col II, and Bmp2 in all treated offspring. It is concluded that the reduced endochondral bone growth caused by excessive maternal thyroxine is associated with reduction in proliferation rate and the VEGF expression in the growth cartilage of in all ages, Flk-1 and Tie2 receptors in the growth cartilages in neonates and at 20-day-old and reduction of Ang1 expression in growth plate of 40-day-old rats. Moreover, excess of maternal thyroxine influences the ECM composition of growth cartilages, to reduce the amount of proteoglycans, glycosaminoglycans, collagens proteins and metalloproteinases, and gene transcripts for Sox9, Mmp2, Mmp9, Col II, and Bmp2 in all treated offspring, and changed differently with the age, the expression of gene transcripts as Runx2, Aggrecan, Col I, and Caspase3.

Keywords: thyroxine, growth cartilages, angiogenesis, proliferation, extracellular matrix, rats.

INTRODUÇÃO

A tireoide, por meio da tiroxina (T_4) e da triiodotironina (T_3), é responsável por controlar diversos processos metabólicos, sendo essencial para a fisiologia óssea, seja durante a formação óssea ou ossificação pré-natal ou durante o crescimento ósseo pós-natal (Waung *et al.*, 2012). Esses hormônios estimulam a condrogênese e a osteogênese, além de regula a síntese de matriz (Serakides *et al.*, 2004) e a reabsorção ósseas (Mundy *et al.*, 1976). Dessa forma, os hormônios tireoidianos são de fundamental importância, não somente para a formação e crescimento ósseos, como também para a manutenção da massa óssea no indivíduo adulto (Bassett e Williams, 2003).

A atuação dos hormônios tireoidianos ocorre principalmente pela ação da T_3 que é a forma metabolicamente ativa, capaz de se ligar aos receptores $TR\alpha$ e $TR\beta$, que são expressos em diversos tipos celulares. No osso, esses receptores estão presentes nas células tronco mesenquimais da medula óssea, osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e também nos condrócitos das cartilagens de crescimento (Bassett e Williams, 2009; Gogakos *et al.*, 2010). Mas, é importante salientar que os hormônios tireoidianos fazem parte de uma extensa lista de hormônios que juntamente com os fatores de transcrição possuem ações importantes e coordenadas sobre o osso, mantendo a higidez do tecido ósseo e homeostasia do cálcio e do fósforo séricos (Bassett e Williams, 2003).

Na medicina humana, tanto o hipotireoidismo quanto o hipertireoidismo são endocrinopatias frequentemente diagnosticadas e que cursam com alterações em diferentes sistemas e órgãos (Boelaert e Franklyn, 2005). Desde 1997, esta equipe tem pesquisado os efeitos das disfunções tireoidianas sobre o metabolismo ósseo e mineral (Serakides *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2005; Serakides *et al.*, 2008; Boeloni *et al.*, 2010) e também sobre a atividade reprodutiva em modelos animais com hipo e hipertireoidismo gestantes e não gestantes (Silva *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). Também tem sido estudada a participação das células tronco da medula óssea na patogênese das alterações ósseas causadas pelas disfunções da tireoide e os efeitos dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose (Boeloni *et al.*, 2009; Hell *et al.*, 2011; Boeloni *et al.*, 2013a; Boeloni *et al.*, 2013b; Boeloni *et al.*, 2013c). Este estudo, além de trazer conhecimento novo no que concerne à patogênese do excesso dos hormônios tireoidianos sobre o crescimento ósseo, representa também a continuidade e ampliação dos temas envolvidos na linha de pesquisa denominada “Doenças ósseas de origem endócrina e nutricional”.

Em mulheres, a prevalência das disfunções tireoidianas é elevada e a cada 1.000 mulheres, cinco apresentam hipotireoidismo e três apresentam hipertireoidismo. Grande parte dessa casuística é observada em mulheres em idade fértil, e apesar de menos frequente, as disfunções tireoidianas vêm sendo cada vez mais diagnosticadas em gestantes (Fernández, 2013). Em consequência, as alterações hormonais maternas podem refletir em desenvolvimento anormal do feto, uma vez que os hormônios tireoidianos maternos têm ação crítica em todos os sistemas, principalmente sobre a formação óssea pré-natal (Medici *et al.*, 2013).

É fato que o hipotireoidismo congênito tem recebido muito mais atenção do que o hipertireoidismo, pela sua frequência e porque além de todas as implicações para o desenvolvimento neurológico e de outros sistemas e órgãos, ele retarda o crescimento e a maturidade óssea com consequente nanismo (Rivkees *et al.*, 1988). Mas, embora menos

frequente que o hipotireoidismo, o hipertireoidismo congênito se não reconhecido e tratado também pode ter efeitos graves sobre o crescimento ósseo, particularmente nos primeiros dois anos de vida (Segni *et al.*, 2001). Além disso, o hipertireoidismo na gestação também preocupa pelo fato de causar alterações graves não somente na mãe, como também no feto e no neonato (Fernández, 2013).

A principal causa de hipertireoidismo em mulheres, inclusive durante a gestação, é a doença de Graves, uma condição autoimune causada por hiperestimulação da tireoide por anticorpos dirigidos contra o receptor de tireotrofina. Uma em cada 500 mulheres apresenta doença de Graves no período gestacional (Cooper, 2003) e esse número aumenta à medida que se inclui a avaliação do perfil sérico dos hormônios tireoidianos em gestantes. No hipertireoidismo materno, os tecidos fetais são expostos a quantidades excessivas de hormônios tireoidianos (Cooper, 2003) e pode estar associado à morte intrauterina, aborto espontâneo, parto prematuro e baixo peso ao nascimento (Millar *et al.*, 1994; Mestman, 2004; Phoojaroenchanachai *et al.*, 2001; Medici *et al.*, 2013), alteração da maturidade óssea e interrupção precoce do crescimento ósseo com fusão prematura das placas de crescimento e das suturas ósseas (Segni *et al.*, 1999; Polak *et al.*, 2006).

Durante a embriogênese, no início da formação óssea endocondral, as células tronco mesenquimais diferenciam-se em células progenitoras osteocondrais que, por sua vez, sofrem condensação e tornam-se condroblastos (Leboy, 2006; Yang, 2009). Os condroblastos proliferam e expressam fatores de transcrição para formar um molde de cartilagem que antecede a formação óssea (Kronenberg, 2003; Tsumaki e Yoshikawa, 2005; Abarca-Buis *et al.*, 2006; Degnin *et al.*, 2010). Ao nascimento, na maioria das espécies animais e também em crianças, quase todo o molde cartilaginoso já foi substituído por tecido ósseo, com exceção da cartilagem articular e da placa epifisária, a partir das quais ocorre o crescimento ósseo endocondral (Pines e Hurwitz, 1991; Shapiro, 2008).

O controle do crescimento ósseo longitudinal ocorre pela íntima interação de hormônios sistêmicos, de fatores de crescimento e peptídeos locais, tais como os hormônios da tireoide, hormônio de crescimento, glicocorticoides, estrógeno, andrógenos e o fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-I). 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 celular que é requerida durante o processo de maturação, o que provoca uma série de mudanças na expressão gênica dos condrocitos da placa epifisária (Robson *et al.*, 2002; Ballock e O'Keefe, 2003; Eerden *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2005; Shapiro e Forriol, 2005).

Algumas moléculas que controlam a ossificação endocondral pré-natal 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 aos fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), participam do controle da proliferação e da diferenciação dos condroblastos e da gradativa substituição da cartilagem por tecido ósseo (Vortkamp *et al.*, 1998; Schipani e Provot, 2003; Kronenberg, 2006; Degnin *et al.*, 2010; Goltzman, 2010). Sabe-se que a triiodotironina controla a diferenciação dos condroblastos durante o crescimento ósseo por meio da participação dos fatores *Ihh*, proteína morfogenéticas do osso (BMP) e PTHrP. A triiodotironina também aumenta a síntese de fosfatase alcalina e de fatores pró-angiogênicos como a metaloproteinase de matriz 13 (MMP-13) (Bassett e Williams, 2003). No entanto,

apesar dos hormônios, fatores de crescimento, genes e vias de sinalização que controlam o crescimento ósseo serem amplamente estudados, é pouco compreendido como esses fatores participam da gênese das alterações do crescimento ósseo decorrentes do hipertireoidismo materno e neonatal. O que se sabe é que ratos com hipotireoidismo induzido durante o crescimento e imediatamente após a maturidade sexual, ou seja, com seis semanas de idade, apresentam, nas cartilagens de crescimento, redução da síntese de colágeno X, aumento da expressão do PTHrP e anormalidades da síntese de proteoglicanos sulfatados e que ratos com hipertireoidismo também induzido durante o crescimento, apresentam redução do número de receptores para PTHrP nas cartilagens de crescimento (Stevens *et al.*, 2000).

Resultados preliminares de pesquisas recentes realizadas por esta equipe demonstraram que filhotes de ratas com hipertireoidismo apresentam ao nascimento e ao desmame redução significativa da formação e do crescimento ósseo endocondral e que algumas dessas alterações podem ser reversíveis nos ratos que tiveram contato com o excesso de hormônios tireoidianos somente durante o período gestacional e lactacional. No entanto, esses estudos foram obtidos baseando-se somente em avaliações histomorfométricas. Neste contexto, o que se pretende é ampliar os conhecimentos pela avaliação, por meio de um modelo animal experimental já previamente estabelecido, dos efeitos moleculares do excesso de tiroxina materna e pós-natal sobre as cartilagens de crescimento, a fim de compreender melhor a gênese das alterações da formação e do crescimento ósseo endocondral induzidas pelo hipertireoidismo.

OBJETIVOS

Capítulo 2

Estudar os efeitos *in vivo* do excesso de tiroxina materna sobre as cartilagens de crescimento de ratos neonatos e ao desmame, a partir da avaliação do perfil proliferativo, baseado na expressão da proteína 47 de controle de divisão celular (CDC-47) e do perfil angiogênico, pela expressão imunohistoquímica e/ou dos transcritos gênicos para *Vegf*, *Flk-1*, angiopoetinas 1 e 2 (*Ang1*, *Ang2*) e receptor tirosina quinase 2 (*Tie2*).

Capítulo 3

Estudar os efeitos *in vivo* do excesso de tiroxina materna e pós-natal sobre as cartilagens de crescimento de ratos aos 40 dias de idade, a partir da avaliação do perfil proliferativo, baseado na expressão de CDC-47 e do perfil angiogênico, pela expressão imunohistoquímica e/ou dos transcritos gênicos para VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2.

Capítulo 4

Estudar os efeitos *in vivo* do excesso de tiroxina materna e pós-natal nas atividades de síntese da matriz das cartilagens de crescimento de ratos neonatos, aos 20 dias (desmame) e aos 40 dias, baseado na histoquímica da matriz cartilaginosa pelas colorações de PAS, *alcian blue* e safranina-O e na expressão dos transcritos gênicos para Sox9, Runx2, agrecan, colágeno I, colágeno II, caspase 3, fosfatase alcalina, MMP2, MMP9 e BMP2.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Formação óssea ou ossificação endocondral

Durante o desenvolvimento pré-natal, dois mecanismos independentes e distintos são responsáveis pela formação do esqueleto, a ossificação ou formação óssea intramembranosa e a endocondral (Karaplis, 2008). O processo de ossificação intramembranosa caracteriza-se pelo desenvolvimento dos ossos a partir da diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos e é responsável pela formação de uma pequena fração do esqueleto, particularmente de alguns ossos craniofaciais (Crombrughe *et al.*, 2001).

No entanto, a maior parte dos ossos (base do crânio, mandíbula, costelas, vértebras e membros) deriva da formação óssea endocondral, na qual há o desenvolvimento de um molde cartilaginoso, a partir do processo de condrogênese, que será posteriormente substituído por osso (Adams *et al.*, 2007). Entretanto, apesar desta divisão da formação óssea em endocondral e intramembranosa, alguns pesquisadores consideram que o desenvolvimento dos ossos longos envolve ambos os processos de ossificação, sendo a ossificação intramembranosa representada pela formação do colar ósseo na diáfise que ocorre a partir da diferenciação das células tronco mesenquimais do perióstio em osteoblastos e a ossificação endocondral caracterizada pela substituição do molde cartilaginoso por osso (Baron, 2008).

A condrogênese é um fenômeno complexo que, seja *in vitro* ou *in vivo*, envolve várias etapas, sendo um dos primeiros eventos celulares que ocorre durante o desenvolvimento do esqueleto (Chen e Liu, 2009). O controle da condrogênese é mediado por interações celulares com a matriz circundante, fatores de crescimento e de diferenciação, bem como outros fatores que iniciam ou suprimem as vias de sinalização celular e a transcrição de genes específicos numa sequência temporal de eventos (White e Wallis, 2001). É importante salientar que este conjunto de etapas temporais e espaciais confere aos condrocitos um ciclo de vida caracterizado pelas fases de proliferação, diferenciação, maturação e apoptose, de forma que a identificação e caracterização destas fases irão revelar a base molecular da cartilagem, bem como sua forma e função (Shum *et al.*, 2003).

A cartilagem é um tecido mesenquimal que apresenta diferentes origens embrionárias. Sua formação é iniciada pela diferenciação de células mesenquimais, que surgem a partir de três fontes: crista neural, que são células do ectoderma neural e originam os ossos craniofaciais; o esclerótomo do mesoderme paraxial ou somitos, que formam o esqueleto axial; e a mesoderme da placa lateral, de onde se originam os ossos dos membros (Olsen *et al.*, 2000). Existem distintos centros de sinalização durante a embriogênese, os quais direcionam o crescimento em três diferentes dimensões. A crista ectodérmica apical (ERA) está relacionada ao eixo próximo-distal cujas moléculas de sinalização são o FGF-2, FGF-4 e FGF-8; a zona de atividade polarizadora (ZPA) que é responsável pelo eixo ântero-posterior, sendo o *sonic hedgehog* a molécula de sinalização e os ectodermas dorsal e ventral, com as moléculas *wingless-7a* (Wnt-7a) e homeobox engrailed-1 (En-1), respectivamente, responsáveis pelo crescimento dorso-ventral (DeLise *et al.*, 2000; Al-Qattan *et al.*, 2009). A formação dos membros ocorre a partir de um botão primordial, constituído por células mesodérmicas que expressam FGF-10. Este botão

é saliente na superfície lateral do eixo ântero-posterior do embrião, o qual é recoberto pelo ectoderma. Em sequência, a extremidade distal do ectoderma fica mais espessa e forma a ERA, iniciando a expressão de FGF-8, BMP2 e BMP4 (DeLise *et al.*, 2000).

Quando o crescimento inicia, o núcleo do mesênquima expressa os genes Hox, responsáveis por determinar a localização precisa de cada membro. A partir do recrutamento gradual de células tronco mesenquimais, forma-se primeiro o estilópodo (úmero e fêmur), então o primórdio da cartilagem se bifurca e origina o zeugópodo (rádio-ulna e tibia-fíbula), o qual se ramifica para formar o autópodo (carpos e tarsos) (Abarca-Buis *et al.*, 2006). As regiões de condensação mesenquimal formam-se e serão responsáveis por dar origem às células condroprogenitoras resultando no delineamento do molde cartilaginoso do membro (Adams *et al.*, 2007).

Durante a condrogênese (Figura 1), as células tronco mesenquimais proliferam-se e, em seguida migram para as áreas destinadas à formação óssea, onde sofrem condensação. Há aumento na quantidade de células por unidade de área ou volume, sem aumento na proliferação celular, ou seja, ocorre migração das células e agrupamento destas em áreas específicas (Janners e Searls, 1970). Neste momento, há maior síntese de fibronectina que reduz à medida que as células tronco se diferenciam em células condroprogenitoras. Esta proteína de adesão auxilia as células a fixarem-se na matriz extracelular (MEC), além de estabelecer ligações com outras moléculas, tais como o colágeno e o ácido hialurônico. O colágeno I está presente especificamente na matriz das células indiferenciadas e é substituído posteriormente por outras proteínas específicas da matriz cartilaginosa, como o colágeno II, agregcan e colágeno X (Shum *et al.*, 2003).

O início da condensação celular está associado ao aparecimento de moléculas de adesão celular, como a caderina neural (N-caderina) e a molécula de adesão de células neurais (N-CAM). A N-caderina tem sua síntese aumentada durante a condensação/determinação celular, facilitando a interação célula a célula (Oberlander e Tuan, 1994). A determinação refere-se ao processo pelo qual ocorrem interações genéticas e ambientais que direcionam a progressão do desenvolvimento de uma linhagem celular (Shum *et al.*, 2003). Esta fase é importante, pois as células mesenquimais são precursoras comuns das linhagens condrogênica, osteogênica e miogênica (Goldring *et al.*, 2006). Desta forma, as células diferenciam-se na linhagem condroprogenitora que, por sua vez, sofre condensação e diferencia-se em condroblastos, sob estímulo de moléculas da família TGF β (fator de transformação de crescimento β) e das vias de sinalização Wnt (Leboy, 2006; Yang, 2009).

O TGF β estimula inicialmente a síntese de fibronectina e posteriormente de sindecam. Esta última liga-se à fibronectina, regulando negativamente a N-CAM, estabelecendo, assim, os limites de condensação (Goldring *et al.*, 2006). Outras moléculas da matriz extracelular também são produzidas, incluindo a tenascina, trombospondina e a proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP). Todas estas moléculas interagem com as células objetivando ativar as vias de sinalização para iniciar a transição de células indiferenciadas para células condroprogenitoras (DeLise *et al.*, 2000).

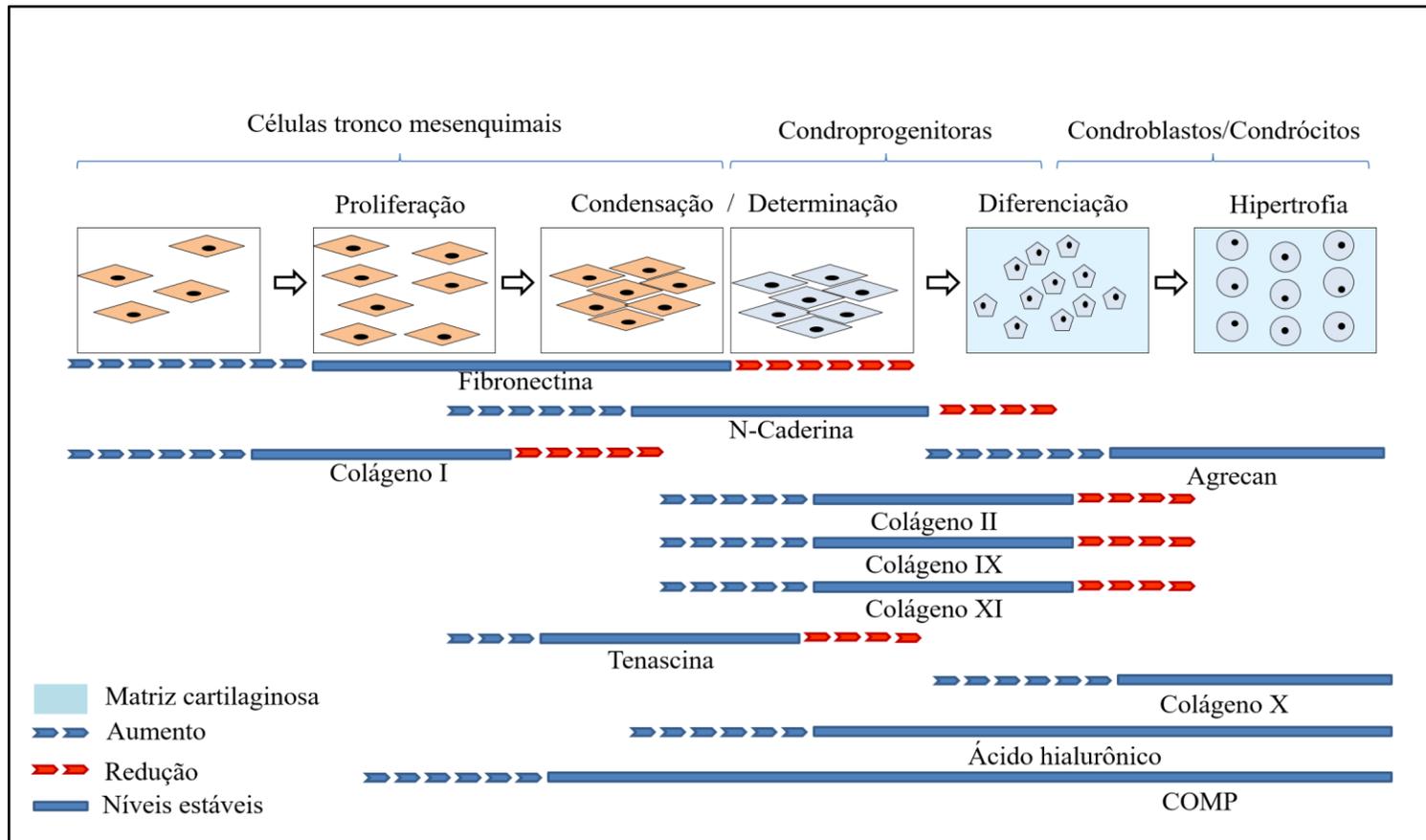


Figura 1. Diagrama esquemático da condrogênese demonstrando a diferenciação das células tronco mesenquimais até condrócitos e as principais alterações na composição da matriz extracelular. Modificado de Shum *et al.*, 2003. COMP: proteína oligomérica da matriz cartilaginosa

A partir daí, ocorre uma mudança expressiva na composição da MEC, caracterizada pela redução na expressão de colágeno I e aumento da expressão de ácido hialurônico e produção de proteínas específicas da cartilagem, representadas pelos colágenos II, IX e XI, além de outras proteínas não colágenas, como a proteína Gla (osteocalcina), condroitina e agrecan. O ácido hialurônico é encontrado na MEC de células condroprogenitoras e é mantido nos condrócitos hipertróficos. Já a expressão da proteína COMP inicia-se na fase de condensação das células mesenquimais e permanece até a fase de hipertrofia celular, sendo fundamental para ativar a transição das células mesenquimais em condroprogenitoras (Shum *et al.*, 2003).

No início da formação do molde de cartilagem, os nódulos cartilagosos aparecem no meio do blastema e, simultaneamente, as células da periferia tornam-se achatadas e alongadas, formando o pericôndrio (Goldring *et al.*, 2006; Yu e Ornitiz, 2007). Os condroblastos localizados no centro do molde cartilaginoso são estimulados a proliferar e durante esta etapa, há maior expressão do fator de transcrição Sox9. Este fator ativa os genes alvos nas células condrogênicas, resultando na secreção de matriz extracelular rica em colágeno e em outras proteínas não colágenas (DeLise *et al.*, 2000). Similar aos osteoblastos, os condroblastos são envolvidos progressivamente pela própria matriz que sintetizam e adquirem a morfologia arredondada típica, permanecendo dentro de uma lacuna, sendo assim denominados condrócitos. Entretanto, diferentemente dos osteócitos, os condrócitos continuam a proliferar por um tempo, devido particularmente a consistência característica da matriz condrogênica (Baron *et al.*, 2008). Em seguida, os condrócitos passam pelo processo de maturação até sua hipertrofia. Há alterações no tamanho das células, bem como na síntese de matriz extracelular, com diminuição da expressão de colágeno II e aumento na expressão de colágeno X e agrecan (Wallis, 1996; Kronenberg, 2003; Tsumaki e Yoshikawa, 2005; Abarca-Buis *et al.*, 2006; Degnin *et al.*, 2010). Estes eventos são regulados por sinais parácrinos, incluindo o PTHrP e o *Ihh* oriundos do pericôndrio (Staines *et al.*, 2013).

A formação do molde cartilaginoso (Figura 2A-C) ocorre a partir da proliferação contínua e ascendente dos condroblastos (Kronenberg, 2003). Na transição da fase proliferativa para a hipertrófica, estas células apresentam grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e de vesículas secretoras (Crombrughe *et al.*, 2001). Na diáfise do molde cartilaginoso, forma-se o centro de ossificação primário que primeiro envolve a formação de um colar ósseo. Na periferia do molde, as células pericondrais adjacentes aos condrócitos hipertróficos se diferenciam em osteoblastos e secretam matriz óssea, formando assim o colar ósseo. Este colar posteriormente formará o tecido ósseo cortical que atua como fonte de osteoblastos para a esponjosa primária. Em seguida, os vasos sanguíneos trazem, ao centro do molde, as células tronco mesenquimais que darão origem aos osteoblastos, osteoclastos e às células hematopoiéticas, resultando na formação definitiva e expansão do centro de ossificação primário dos ossos longos (Yu e Ornitiz, 2007).

Desta forma, a matriz óssea vai sendo sintetizada pelos osteoblastos sobre os condrócitos hipertróficos do molde (Crombrughe *et al.*, 2001; Degnin *et al.*, 2010). A invasão da cartilagem por vasos sanguíneos é mediada pelo aumento da expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) que está correlacionada com o fator induzível por hipóxia (HIF-1), pela angiopoetina-2 (Ang2) e metaloproteinases da matriz (MMP) (Yu e Ornitiz, 2007; Sasaki *et al.*, 2012).

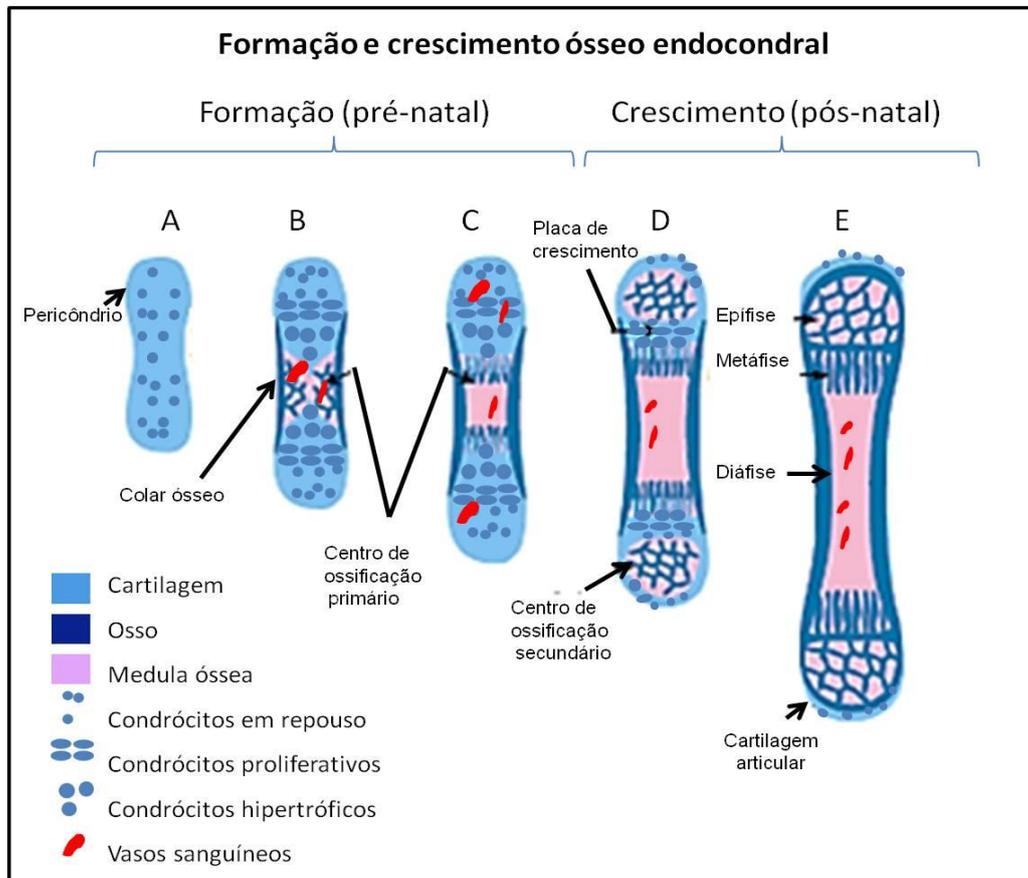


Figura 2. Desenho esquemático da formação e crescimento ósseos endocondrais. A) Molde cartilaginoso que formará o osso. B) Formação do colar ósseo e início da formação do centro de ossificação primário. C) Expansão do centro de ossificação primário em direção às extremidades. D) Formação dos centros de ossificação secundários e placa epifisária entre os centros de ossificação primários e secundários. E) Maturidade esquelética, com a substituição completa da cartilagem da placa epifisária por osso, com apenas a cartilagem articular nas extremidades do osso. Modificado a partir de Mackie *et al.*, 2008.

Em fetos de camundongos o centro de ossificação primário começa a se desenvolver com 14,5 dias de gestação e os vasos sanguíneos a partir do periósteo penetram a cartilagem calcificada, trazendo osteoblastos que produzem matriz óssea sobre a matriz cartilaginosa para formar osso trabecular (Tsang *et al.*, 2015). A cartilagem vai sendo continuamente substituída por osso trabecular e medula óssea, com consequente expansão da cavidade medular em direção às extremidades ósseas. À medida que o osso aumenta, as células tronco hematopoiéticas interagem com o estroma para determinar o local principal para a hematopoiese na vida pós-natal (Kronenberg, 2003). Posteriormente, há formação dos centros de ossificação secundários que darão origem às epífises (Horton e Degnin, 2010). Estes aspectos demonstram que as vias de diferenciação de condroblastos e osteoblastos devem estar interligadas e coordenadas durante todo o processo de formação óssea endocondral (Crombrughe *et al.*, 2001).

2. Crescimento ósseo endocondral

Ao nascimento, na maioria das espécies animais e em humanos, quase todo o molde cartilaginoso já foi substituído por tecido ósseo, com exceção da cartilagem articular e da placa epifisária (Figura 2D), as quais determinarão o comprimento final do osso adulto (Pines e Hurwitz, 1991; Mackie *et al.*, 2008; Shapiro, 2008; Tsang *et al.*, 2015). Este processo de crescimento ósseo longitudinal é regido por uma complexa rede de sinais endócrinos, incluindo o hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), glicocorticoides, hormônios da tireoide, estrogênio, androgênio, vitamina D e leptina. Muitos destes sinais regulam o crescimento a partir da placa epifisária, tanto atuando localmente em condrócitos como também, indiretamente, por modulação dos sinais das vias endócrinas (Eerden *et al.*, 2003).

Os centros de ossificação secundários começam a formar as epífises do molde cartilaginoso e nos camundongos, isso ocorre em torno dos cinco a sete dias de vida pós-natal, individualizando a cartilagem articular e a placa epifisária (Dao *et al.*, 2012). A cartilagem articular é constituída morfologicamente por componentes distintos, como colágenos e proteínas não colágenas, que variam em sua quantidade e formam diferentes camadas, conhecidas como zonas. E iniciando desde a superfície articular até próximo do osso subcondral, denominam-se zona superficial, zona média e zona profunda (Camarero-Espinosa *et al.*, 2016). Na vida fetal apresenta canais vasculares, os quais ainda podem ser vistos no período pós-natal no período de crescimento, reduzindo até desaparecer completamente nos adultos (Visco *et al.*, 1989). Sua expansão ocorre a partir da divisão mitótica das células condrogênicas e secreção de matriz extracelular pelas células filhas, resultando no aumento de matriz ao redor das células (Las Heras *et al.*, 2012).

A placa de crescimento ou placa epifisária é uma estrutura cartilaginosa localizada entre a epífise e a metáfise dos ossos longos, responsável pelo crescimento longitudinal pós-natal do osso (Eerden *et al.*, 2003). É composta por condrócitos, os quais sofrem uma série de mudanças moleculares, bioquímicas e morfológicas durante o processo de diferenciação e de síntese da matriz extracelular. Com base em sua morfologia e padrão de expressão gênica, os condrócitos organizam-se de formas diferentes ao longo do eixo maior do osso, as quais definem distintas áreas denominadas zona de repouso, zona proliferativa, zona pré-hipertrófica e zona hipertrófica (Figura 3) (Ballock e O'Keefe, 2003; Nilsson *et al.*, 2005; Belluoccio *et al.*, 2008; Degnin *et al.*, 2010; Mackie *et al.*, 2011; Staines *et al.*, 2013).

As células da zona de repouso servem como precursoras de condrócitos para as outras zonas e são submetidas ao processo de diferenciação. São quase esféricas em secção transversal, dispostas aleatoriamente e separadas por grande quantidade de matriz, composta principalmente por colágeno II e proteoglicanos (Adams *et al.*, 2007). Estímulos ainda pouco conhecidos convertem os condrócitos dispostos arbitrariamente na zona de repouso em células dispostas em colunas altamente organizadas, formando a zona proliferativa, caracterizada assim por apresentar proliferação celular máxima (Romereim *et al.*, 2014). Os condrócitos da zona de proliferação são pequenos e sintetizam matriz extracelular abundante, constituída por colágeno II, IX, XI e agrecan (Vortkamp *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2007; Karaplis, 2008).

Os condrócitos apresentam comportamentos específicos para regular sua própria morfogênese, exemplificado pela orientação do plano de divisão mitótica e formação da coluna de condrócitos na zona proliferativa. Esta sinalização ocorre através da via *wingless/int-1* (Wnt) não-canônica,

β -catenina, que é crucial para alinhar os planos de divisão e promover a formação das colunas dos condrócitos da zona de proliferação (Topczewski *et al.*, 2001; Li e Dudley, 2009).

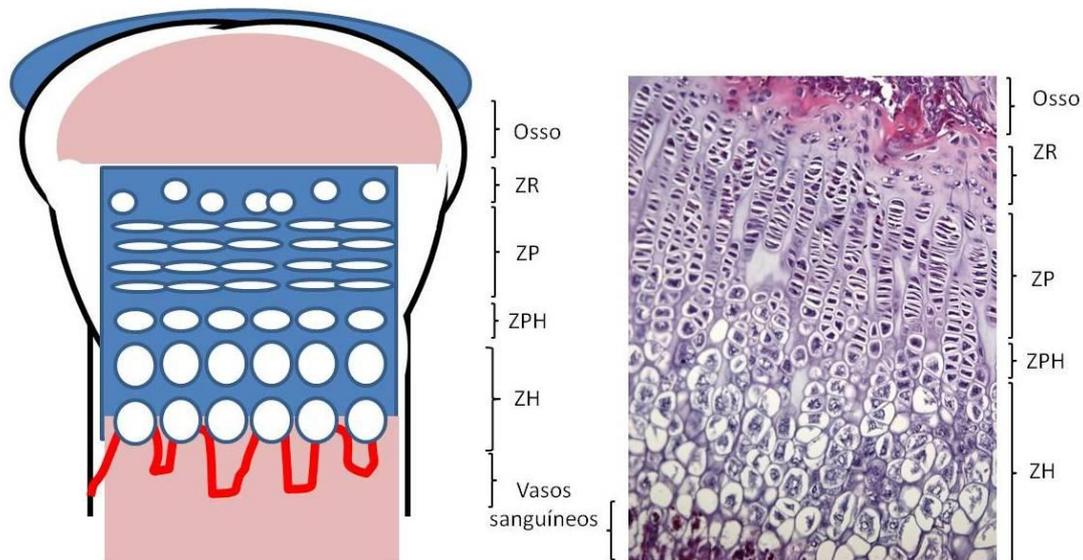


Figura 3. Zonas da placa epifisária. ZR: Zona de repouso; ZP: Zona proliferativa; ZPH: Zona pré hipertrofica e ZH: Zona hipertrofica. (Lorena Gabriela Rocha Ribeiro)

Avaliações tridimensionais realizadas na placa epifisária de camundongos demonstraram que os condrócitos da zona de repouso possuem mitose orientada perpendicularmente ao eixo da própria célula e a rotação do plano mitótico, quando ocorre, é ligeiramente desorientada. Diferente do que é observado com os condrócitos da zona proliferativa durante a mitose, os quais rotacionam em quase 90 graus em torno do eixo longo da placa epifisária e as células filhas permanecem em íntima associação umas com as outras enquanto rotacionam para formar as colunas verticais (Romereim *et al.*, 2014).

Alterações na formação das colunas de condrócitos ao longo do eixo de orientação estão associadas a defeitos ósseos (Ahrens *et al.*, 2009; Li e Dudley, 2009; Gao *et al.*, 2012). Por exemplo, a expressão de um receptor negativo dominante *frizzled-7* em condrócitos proliferativos interfere com a orientação da divisão celular (Li e Dudley, 2009). Embora existam muitos estudos sobre a regulação da morfogênese esquelética pelas vias de sinalização, a integração entre os processos celulares específicos, a estrutura da matriz para gerar vetores de crescimento e a arquitetura do tecido não são bem compreendidas (Romereim *et al.*, 2014).

Pela expressão do fator de transcrição Runx2, os condrócitos passam pelo processo de diferenciação, aumentam de tamanho, perdem a característica discoide e diminuem a taxa de proliferação, entrando desta forma, na zona de maturação, caracterizada por condrócitos pré-hipertrofos. À medida que os condrócitos amadurecem, sofrem hipertrofia, aumentando intensamente o volume e alterando a composição da matriz extracelular, com síntese abundante

de colágeno X (Vortkamp *et al.*, 1998; Crombrughe *et al.*, 2001; Kroneberg, 2006; Vaes *et al.*, 2006; Degnin *et al.*, 2010).

Os condrócitos hipertróficos desempenham papel-chave no interior da placa epifisária, não apenas referente ao crescimento longitudinal do osso pelo aumento do volume celular, mas também atuam como centros de sinalização para a secreção de fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas de sinalização que podem agir em outros tipos de células envolvidos no crescimento endocondral, tais como osteoclastos, osteoblastos e células endoteliais (Chung, 2004).

De acordo com os conceitos gerais, os condrócitos e os osteoblastos são considerados tipos celulares de linhagens independentes, porém ambos derivados de células osteocondroprogenitoras comuns. A linhagem condrogênica segue algumas etapas caracterizadas por proliferação e diferenciação, passando de condroblastos a condrócitos, finalizando este processo com apoptose dos condrócitos hipertróficos. No entanto, a possibilidade dos condrócitos hipertróficos sobreviverem e se tornar osteoblastos *in vivo* tem sido debatida por mais de um século (Yang *et al.*, 2013). Estudos recentes têm mostrado, a partir de recombinação genética específica, o destino final dos condrócitos hipertróficos. Estas pesquisas comprovam que algumas destas células também são capazes de se tornar osteoblastos, sugerindo a plasticidade da linhagem condrogênica (Yang *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2015; Tsang *et al.*, 2015).

A maior parte dos condrócitos da borda inferior da zona hipertrófica é removida por apoptose, particularmente quando o glicogênio celular se esgota (Farnum e Wilsman, 1987), ocorrendo ativação das caspases e redução da expressão do fator anti-apoptótico Bcl-2 (Staines *et al.*, 2013). Ocorre também a formação de vesículas de matriz ligadas à membrana dos condrócitos hipertróficos, as quais contêm uma combinação específica de proteínas envolvidos no processo de mineralização, incluindo anexinas, as quais medeiam a captação de cálcio, transportadores de fosfato e promovem a precipitação de cristais de hidroxiapatita. E este processo cursa também com baixa tensão de oxigênio (Eerden *et al.*, 2003; Gohr, 2004; Sasaki *et al.*, 2012).

As proteínas que promovem a mineralização, como a fosfatase alcalina, também são encontradas na zona hipertrófica, desta forma, a matriz desta zona eventualmente torna-se mineralizada e atua como molde para a síntese de tecido ósseo trabecular (Adams *et al.*, 2007). Uma vez mineralizada, a matriz da cartilagem em torno dos condrócitos hipertróficos é reabsorvida e esta ação é dependente particularmente da atividade da MMP13. Há ainda maior expressão de VEGF pelos condrócitos hipertróficos, permitindo a invasão de vasos sanguíneos (Eerden *et al.*, 2003; Stickens, *et al.*, 2004), que fornecem suporte para o recrutamento das células envolvidas na reabsorção da cartilagem e na síntese de matriz óssea. Assim, subsequentes ciclos de substituição dos condrócitos hipertróficos por matriz óssea neoformada permitem o crescimento longitudinal do osso (Staines *et al.*, 2013).

Embora a invasão de vasos sanguíneos seja necessária, é desconhecido se a apoptose dos condrócitos hipertróficos funciona como estímulo para o recrutamento de vasos sanguíneos e de células especializadas ou, se a própria invasão de vasos sanguíneos é a sinalização para a morte dos condrócitos (Gerber *et al.*, 1999). Estes eventos interconectados de hipertrofia, mineralização, apoptose de condrócitos, invasão vascular e recrutamento de osteoblastos são responsáveis pela substituição da cartilagem por osso. Esse novo osso gerado, a partir das placas

de crescimento, permite o crescimento ósseo longitudinal (Crombrugge *et al.*, 2001; Koedam *et al.*, 2002; Ballock e O'Keefe, 2003; Nilsson *et al.*, 2005).

A formação e o crescimento ósseos são controlados principalmente pelas taxas de proliferação e hipertrofia dos condrócitos da placa epifisária (Hunziker, 1994; Ballock e O'Keefe, 2003). Fatores hormonais, como o GH, o IGF e os HTs atuam diretamente na placa epifisária e estimulam o crescimento longitudinal do osso pelo recrutamento das células da zona de repouso para a zona proliferativa (Nilsson *et al.*, 2005). O descontrole destes processos pode resultar em diferentes doenças, tais como as condrodisplasias (Mundlos e Olsen, 1997; Zelzer e Olsen, 2005; Liu *et al.*, 2015) ou mesmo os tumores condrogênicos (Aigner, 2002; Beier, 2005).

O crescimento continua até a maturidade sexual, quando a proliferação dos condroblastos cessa e há fusão entre a epífise e a metáfise e desaparecimento da placa epifisária (White e Wallis, 2001). A parte externa do osso é formada por uma camada espessa e densa de tecido ósseo compacto, o córtex, que limita o canal medular na diáfise, onde as células hematopoiéticas da medula óssea estão alojadas. Na metáfise e epífise, o córtex torna-se progressivamente mais fino e o espaço interno é preenchido por uma rede de trabéculas mineralizadas formando o osso esponjoso ou trabecular. Os espaços delimitados por estas trabéculas também estão preenchidos por células da medula óssea e são contínuos com a cavidade medular diafisária. Desta forma, resta apenas uma fina camada da cartilagem articular, que recobre a superfície das epífises ósseas (Figura 2E) e permanece ao longo da idade adulta, protegendo o osso subjacente e proporcionando a articulação dos ossos. (Baron, 2008).

3. Mecanismos regulatórios, genes e fatores de crescimento envolvidos na formação e crescimento ósseos endocondrais

Um importante desafio na morfogênese esquelética é o preciso controle do crescimento, que é necessário para criar as proporções funcionais do esqueleto (Staines *et al.*, 2013). Algumas moléculas envolvidas na formação óssea endocondral, ou seja, no período pré-natal, também são expressas durante o crescimento ósseo pós-natal, sugerindo que esses processos sejam controlados por fatores similares (Eerden *et al.*, 2000). Para que estes eventos ocorram é necessário um equilíbrio temporal e espacial entre a síntese e a degradação da matriz extracelular, proliferação e apoptose de condrócitos, além da vascularização e mineralização (White e Wallis, 2001; Adams *et al.*, 2007).

As mudanças sequenciais no comportamento dos condroblastos e condrócitos são fortemente reguladas por fatores sistêmicos e locais, os quais ativam a sinalização intracelular e a síntese de fatores de transcrição específicos para os condroblastos. Numerosas moléculas têm sido implicadas como reguladores destes processos, como os fatores sistêmicos que controlam o comportamento dos condrócitos nas cartilagens de crescimento, representados pelo hormônio do crescimento e pelos hormônios da tireoide. Além deles, os fatores locais incluem o *Ihh* e seu receptor *patched* (*Ptc*), o PTHrP, FGFs e seu receptor FGFR, IGFs, os retinoides e os componentes da matriz cartilaginosa (Lanske *et al.*, 1996; Kronenberg, 2006; Adams *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2008).

Os fatores de transcrição que desempenham ação crítica no controle da expressão gênica dos condrócitos incluem o Runx2 e o Sox9. Além disso, a invasão da matriz da cartilagem pelos

vasos sanguíneos é dependente da sua reabsorção pelas metaloproteinases da matriz (Vortkamp *et al.*, 1998; DeLise *et al.*, 2000; Crombrughe *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2008; Degnin *et al.*, 2010).

3.1 Controle da proliferação e diferenciação dos condroblastos e condrócitos

3.1.1 Fator de transcrição Sox9

A família de fatores de transcrição Sox (*Sry-type high mobility group box*) tem funções essenciais em diversos processos do desenvolvimento, incluindo a determinação do sexo, a indução neural e a esquelotogênese. Caracteriza-se ainda por apresentar um grupo de alta mobilidade, o HMG-*box*, que é capaz de curvar o ácido desoxirribonucleico (DNA) para facilitar as interações dos amplificadores com as regiões promotoras distantes do gene alvo (Crombrughe *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2002).

O Sox9 está relacionado aos eventos iniciais que ocorrem durante a formação do esqueleto, sendo um determinante da diferenciação dos condroblastos (Wright *et al.*, 1995). O padrão de expressão embrionária do Sox9 revela maior associação entre o aumento da expressão de RNA mensageiro (mRNA) de Sox9 com os eventos precoces da formação esquelética. Em camundongos, é observada expressão deste fator no mesênquima que forma o crânio, no esclerótomo dos somitos e nas áreas de condensação mesenquimal dos membros (Wright *et al.*, 1995; DeLise *et al.*, 2000).

O Sox9 já foi identificado também nos condrócitos da zona de repouso, de proliferação e nos condrócitos pré-hipertróficos da placa epifisária. No entanto, não há expressão de Sox9 na zona hipertrófica da placa epifisária (Wright *et al.*, 1995; Kronenberg, 2003; Tsumaki e Yoshikawa, 2005; Abarca-Buis *et al.*, 2006; Degnin *et al.*, 2010). Sabe-se ainda que o Sox9 também é expresso em tecidos não esqueléticos, como a notocorda, tubo neural, cérebro e nas gônadas em desenvolvimento (Lefebvre *et al.*, 1998).

Em camundongos, a inativação do Sox9 nos brotos dos membros antes da condensação mesenquimal resulta na completa ausência dos membros. No entanto, os marcadores para os diferentes eixos de sinalização dos membros apresentaram um padrão normal de expressão (Akiyama *et al.*, 2002). Já a inativação pós-natal do Sox9, tem como consequência o crescimento reduzido dos ossos, caracterizado pela diminuição da proliferação, aumento da morte celular e desdiferenciação de condrócitos da placa epifisária. A desdiferenciação refere-se à perda gradual de marcadores moleculares que definem o condrócito já diferenciado, como os glicosaminoglicanos, colágeno II e agrecan, enquanto adquirem maior expressão de colágeno I e IX (Benya *et al.*, 1978; Caron *et al.*, 2012). A inativação pós-natal do Sox9 também reduz drasticamente o teor de proteoglicano sulfatado e agrecan na cartilagem articular, reafirmando o papel do Sox9 no controle fisiológico dos tecidos cartilagosos (Henry *et al.*, 2012).

A importância do Sox9 no desenvolvimento do esqueleto é claramente demonstrada pela identificação do seu papel na desordem esquelética humana, denominada displasia campomélica (DC). Esta evidência foi comprovada a partir da associação de mutações no gene Sox9 com esta doença genética rara, caracterizada por hipoplasia da maior parte dos ossos derivados da formação óssea endocondral (Foster *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1997). Ocorrem mutações

heterozigóticas localizadas na região do cromossoma 17q24 (Foster *et al.*, 1994). Em indivíduos com DC há elevada taxa de mortalidade no período neonatal por insuficiência respiratória devido ao estreitamento do tórax e hipoplasia dos pulmões e das vias respiratórias (Houston *et al.*, 1983). Clinicamente são observados ossos longos curvos e defeitos craniofaciais (Jo *et al.*, 2014; Karaer *et al.*, 2014).

Durante a formação e o crescimento endocondrais, o Sox9 apresenta interação com diversos genes que codificam proteínas que compõe ou interagem na cartilagem, inclusive com fatores de transcrição e moléculas de sinalização que participam na regulação da diferenciação de condroblastos e condrócitos (Akiyama *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2010). O Sox9 é coexpresso com outros dois membros da família Sox, o L-Sox5 e o Sox6, que em conjunto são necessários para a proliferação dos condroblastos e para a progressão ordenada da hipertrofia, bem como para o controle da expressão de genes específicos da cartilagem, como o Col2a1, Col9a1, Col11a1 e agrecan (Lefebvre e Smits, 2005; Han e Lefebvre, 2008; Lin *et al.*, 2014). Este fator está ainda associado com o controle da ossificação endocondral, uma vez que juntamente com o PTHrP, inibe a transição para condrócitos hipertróficos (Huang *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2011). Desta forma, a ausência de expressão de Sox9 está associada ao aumento na espessura das zonas hipertróficas e à mineralização prematura (Crombrughe *et al.*, 2001).

Na placa epifisária fetal, o Sox9 é altamente expresso em condrócitos das zonas de proliferação e pré-hipertrófica, entretanto diminui abruptamente na zona hipertrófica, sugerindo que a baixa expressão de Sox9 nos condrócitos hipertróficos seja um passo necessário para iniciar a transição de cartilagem para osso (Leung *et al.*, 2011; Dy *et al.*, 2012; Tsang *et al.*, 2014). Desta forma, foi demonstrado que camundongos transgênicos com superexpressão de Sox9 na zona de hipertrofia da placa epifisária apresentam falha na formação da medula óssea, baixa expressão de VEGFA, MMP13 e osteopontina na placa epifisária. Sendo assim, a ausência de expressão de Sox9 na zona hipertrófica normal sugere que a regulação negativa do Sox9 é essencial para permitir a invasão vascular e o crescimento ósseo, sendo este um importante inibidor da penetração vascular da cartilagem de crescimento (Hattori *et al.*, 2010).

3.1.2 Fator de transcrição Runx2

A família Runx possui três fatores de transcrição, o Runx1, Runx2 e Runx3, que são importantes para diferentes linhagens celulares. O Runx1 (AML1/Cbfa2) é essencial para a diferenciação das células tronco hematopoiéticas e está envolvido na leucemia mieloide aguda, pois é considerado um gene supressor de tumores mieloides (Goyama *et al.*, 2013). O Runx3 (Cbfa3/AML2) desempenha papel importante na regulação do crescimento de células gástricas e na neurogênese e está relacionado com neoplasias gástricas malignas (Komori, 2011).

O Runx2, também conhecido como Cbfa1 ou AML3, desempenha importantes funções na formação óssea, sendo fundamental para a diferenciação das células mesenquimais progenitoras em osteoblastos (Ducy *et al.*, 1997; Komori, 2005). Além disso, estimula a diferenciação dos condroblastos, os quais se destinarão à formação do molde cartilaginoso para a invasão subsequente por osteoblastos e síntese de matriz óssea. Portanto, pode-se afirmar que assim como a formação da cartilagem é responsiva ao Sox9, a formação óssea é responsiva ao Runx2 (Crombrughe *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2007).

O Runx2 é expresso em todos os osteoblastos e células do perióstio (Ducy *et al.*, 1997; Stricker *et al.*, 2002), bem como em condrócitos desde os estágios iniciais de hipertrofia até a diferenciação terminal, influenciando a composição da matriz celular (Inada *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Mackie *et al.*, 2008). Também é expresso em células do pericôndrio durante a esqueletogênese (Stricker *et al.*, 2002; Hinoi *et al.*, 2006). Os genes Runx2 e Runx3 são coexpressos em áreas de condensação mesenquimal que formarão a cartilagem e juntos são importantes para a diferenciação de condrócitos nas fases iniciais da esqueletogênese (Stricker *et al.*, 2002) (Figura 4). Estes genes estão também associados durante a fase tardia da diferenciação dos condrócitos (Komori, 2011), entretanto a expressão de Runx3 é ausente em osteoblastos (Stricker *et al.*, 2002).

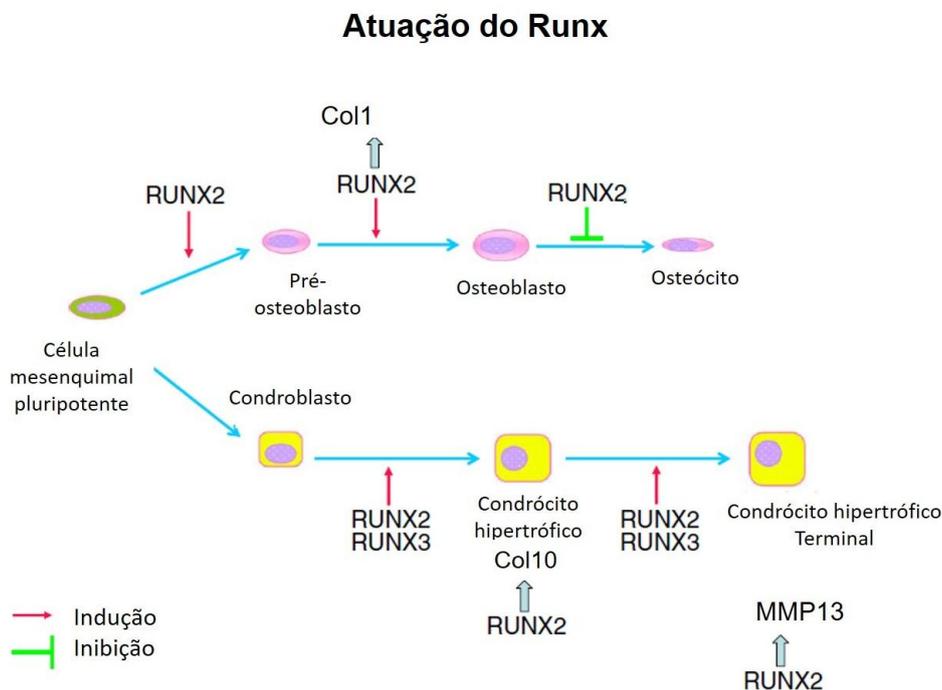


Figura 4. Atuação do Runx durante a diferenciação osteogênica e condrogênica. Modificado de Komori *et al.*, 2010.

Em camundongos, a proteína Runx3 é expressa em condrócitos pré-hipertrofos, pericôndrio e em células hematopoiéticas da esponjosa primária (Soung *et al.*, 2007). A perda da função de Runx3 em camundongos não foi associada a nenhuma alteração esquelética. Já a perda simultânea das funções de Runx2 e Runx3 induz atraso intenso da formação da cartilagem nos esqueletos apendicular e axial, quando comparadas com a deleção isolada de Runx2 (Yoshida *et al.*, 2004).

Mutações no gene Runx2/Cbfa1 são responsáveis por uma alteração denominada displasia cleidocraniana, que é uma doença autossômica dominante caracterizada por múltiplas anormalidades ósseas, como hipoplasia de clavículas e baixa estatura, persistência da fontanela e dentes supranumerários (Mundlos *et al.*, 1997; Stricker *et al.*, 2002; El-Gharbawy *et al.*, 2010). As cartilagens embrionárias de humanos com esta doença apresentam redução da placa

epifisária e menor expressão de mRNAs que codificam MMP13 e colágeno X, indicando que o colágeno X é um alvo transcricional do Runx2 (Adams *et al.*, 2007). O Runx2 parece também influenciar a expressão de outros genes, como a osteocalcina em osteoblasto (Inada *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999) e o osterix em condrócitos pré-hipertrofos e em osteoblastos (Nakashima *et al.*, 2002).

O Runx2 contribui ainda para o ciclo de *feedback Ihh/PTHrP*, pois ativa o promotor *ihh* e assim estimula a expressão de *Ihh* (Yoshida *et al.*, 2004). Já o PTHrP inibe a expressão de Runx2, favorecendo a capacidade do PTHrP em atrasar o processo de hipertrofia dos condrócitos (Guo *et al.*, 2006). Portanto, o Runx2 desempenha importante função na manutenção do equilíbrio no processo de hipertrofia de condrócitos das cartilagens de crescimento (Mackie *et al.*, 2008).

Além disso, o Runx2 parece aumentar a expressão de VEGF nos condrócitos hipertrofos, o que promove a invasão dos vasos sanguíneos na placa epifisária. Em condrócitos, a superexpressão de Runx2 aumenta a transcrição de mRNA e a síntese protéica de VEGF (Zelzer *et al.*, 2001; Zelzer *et al.*, 2004). Em embriões de galinha, a superexpressão de Runx2 resulta na fusão de múltiplas articulações, alargamento dos ossos do carpo e encurtamento de alguns ossos longos (Stricker *et al.*, 2002).

Diversos estudos têm demonstrado alterações decorrentes da deleção do gene Runx2. Já foi descrito que a deleção deste fator pode reduzir intensamente a diferenciação de condrócitos, osteoblastos e osteoclastos com ausência das formações ósseas endocondral e intramembranosa (Otto *et al.*, 1997; Stricker *et al.*, 2002). Pode-se observar camundongos com esqueleto cartilaginoso, ou seja, com total ausência de osteoblastos e de matriz óssea (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997), ausência de invasão da zona hipertrofica por vasos sanguíneos (Kim *et al.*, 1999; Inada *et al.*, 1999) e menor expressão de receptores para VEGF nas células do pericôndrio (Zelzer *et al.*, 2001).

A menor expressão de VEGF associada à menor expressão de Runx2 pode ser uma das razões para a redução na hipertrofia dos condrócitos, na formação óssea e na mineralização da cartilagem, sugerindo que o Runx2 é um regulador positivo da diferenciação de condrócitos e da invasão vascular (Maes *et al.*, 2002; Dai e Rabie, 2007; Conen *et al.*, 2009). Entretanto a deleção de Runx2 em osteoblastos já comprometidos com a diferenciação não resulta em letalidade fetal e os ossos são indistintos quando comparados com os de camundongos controle ao nascimento. Porém, os camundongos *knockout* de Runx2 passam a apresentar redução da massa óssea no primeiro mês de vida, mostrando a importância da expressão deste fator no período pós-natal para a síntese e mineralização da matriz óssea (Adhami *et al.*, 2014).

3.1.3 Peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) e *indian hedgehog (Ihh)*

O peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) e a molécula de sinalização *Indian hedgehog (Ihh)* são necessários para o crescimento ósseo, pois participam do controle da proliferação e da diferenciação dos condrócitos e dos osteoblastos, ou seja, atuam na gradativa substituição da cartilagem por tecido ósseo (Vortkamp *et al.*, 1998; Schipani e Provot, 2003; Kronenberg, 2006; Adams *et al.*, 2007; Degnin *et al.*, 2010; Goltzman, 2010).

O PTHrP é um fator parácrino sintetizado em diversos tecidos e cuja estrutura é homóloga ao paratormônio (PTH), com semelhança estrutural em uma porção da região amino-terminal. Ambos se ligam a um receptor comum, o PTH/PTHrP-R, cuja expressão é baixa nos condrócitos da zona proliferativa e elevada nos condrócitos pré-hipertrofos (Lanske e Kronenberg, 1998; Kim *et al.*, 2008). A alta similaridade no domínio funcional faz com que o PTH e PTHrP sejam igualmente potentes na inibição da hipertrofia dos condrócitos (Zhang *et al.*, 2012). O PTHrP foi identificado pela primeira vez em pacientes com síndromes paraneoplásicas, como a hipercalemia da malignidade, na qual era observada hipercalemia e hipofosfatemia decorrente do aumento de PTHrP (Juppner *et al.*, 1991). Nas placas de crescimento, reduz a taxa de expressão do gene p57 (MacLean *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008) e ativação dos condrócitos da zona de repouso, os quais irão para a fase de proliferação (Kronenberg, 2006).

A análise da deleção do gene que codifica o PTHrP em camundongos sugere algumas hipóteses para o papel deste fator no desenvolvimento do esqueleto. O PTHrP parece ser necessário para a proliferação de condrócitos normais. Assim, sua ausência, caracteriza-se por redução intensa no tamanho das placas de crescimento e desorganização das zonas da placa dos ossos longos e redução do tecido ósseo trabecular da esponjosa primária (Burch e Lebovitz, 1983; Koike *et al.*, 1990). Camundongos com ausência do gene que codifica o PTHrP morrem logo após o nascimento. Os fetos com 18,5 dias apresentam graves alterações no esqueleto, com fenótipo condrodissplásico, caracterizado por focinho e mandíbula curtos, língua saliente, estreitamento da cavidade torácica, membros curtos e desproporcionais, além de ossificação e mineralização precoces. Entretanto, a ausência de PTHrP nos estágios iniciais da formação óssea, aparentemente não altera a condensação de células tronco mesenquimais, sendo observadas as primeiras anormalidades aos 14,5 dias embrionários, coincidindo com o aparecimento dos centros de ossificação primários (Karaplis *et al.*, 1994).

Culturas de células tronco mesenquimais em meio condrogênico e tratadas com diferentes doses de PTHrP demonstram um efeito dose dependente na indução da condrogênese. Nas doses mais baixas, a hipertrofia dos condrócitos é favorecida quando comparada ao meio padrão. Entretanto em doses muito elevadas, há inibição da condrogênese nas fases mais tardias, sendo observada redução na expressão de marcadores condrogênicos, como o colágeno II, colágeno X e fosfatase alcalina (ALP) (Mueller *et al.*, 2013). Em contraste, na administração simultânea de TGF- β e PTHrP, apesar da redução de colágeno X, há aumento do colágeno II (Weiss *et al.*, 2010).

Por outro lado, a superexpressão de PTHrP em condrócitos de ratos leva ao atraso na maturação de condrócitos e na formação óssea, fazendo com que esses animais apresentem o esqueleto completamente cartilaginoso ao nascimento (Weir *et al.*, 1996). Aumenta ainda a expressão de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, inibindo a morte celular por apoptose e alterando a arquitetura da placa epifisária (Chung *et al.*, 1998). Já a deleção do receptor para PTH/PTHrP-R em camundongos resulta em um fenótipo letal, caracterizado por displasia do esqueleto, com maturação prematura dos condrócitos e excessiva formação óssea ao nascimento (Karaplis *et al.*, 1994; Lanske *et al.*, 1996).

A ligação do PTHrP ao seu receptor ativa a proteína quinase A que fosforila várias proteínas alvo, incluindo o fator de transcrição Sox9. Como consequência, ao regular a fosforilação do Sox9, há redução na diferenciação terminal e promoção da transcrição de genes específicos da cartilagem, como o que codifica o colágeno II (Huang *et al.*, 2001). Além disso, o PTHrP diminui a síntese do Runx2 que é necessária para a diferenciação terminal dos condroblastos na

maioria dos ossos (Adams *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008) e suprime também a expressão de *Ihh*, que é essencial para o crescimento ósseo (Kronenberg, 2006).

O gene que codifica o *hedgehog* foi identificado pela primeira vez na *Drosophila melanogaster* e foi nomeado a partir de fenótipos mutantes de seus embriões, os quais apresentavam cerdas desorganizadas semelhantes a espinhos de ouriços (Nusslein-Volhard e Wieschaus, 1980). Nos mamíferos, a família de ligantes *hedgehog* possui três proteínas homólogas, *Ihh*, *sonic hedgehog* (Shh), e *desert hedgehog* (Dhh) (Yang *et al.*, 2015). Todos os três se ligam ao Ptc, uma proteína transmembrana, e liberam o co-receptor *Smoothened* (Smo) que medeia as ações celulares do *hedgehog* (Nakamura *et al.*, 2015). O *Ihh* e o *Shh* estão relacionados aos processos de formação e crescimento endocondral. O Shh atua principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento ósseo. Já o *Ihh* age nos eventos mais tardios da formação endocondral (Kronenberg, 2003) e tem sido descrito como um dos principais fatores que controla as vias moleculares durante a formação endocondral (Karp *et al.*, 2000; Botelho *et al.*, 2015).

As moléculas de *Ihh* são secretadas por condrócitos pré-hipertróficos e controlam o ritmo da proliferação de condrócitos quiescentes, ou seja, atuam na transição de condrócitos pré-hipertróficos para condrócitos hipertróficos até o fim da fase de hipertrofia (Mak *et al.*, 2008). O *Ihh* é ainda essencial para a diferenciação dos osteoblastos nos ossos com formação endocondral a partir das células do pericôndrio, sinalizando o local onde as células mesenquimais se diferenciarão em osteoblastos, independente dos sinais do PTHrP (Karp *et al.*, 2000). Camundongos *Ihh*^{-/-} apresentam desenvolvimento ósseo normal até a fase de condensação mesenquimal, posteriormente desenvolvem graves anormalidades no crescimento ósseo (Long *et al.*, 2001). Há redução intensa na proliferação de condrócitos, maturação anormal dos condrócitos e ausência de osteoblastos maduros (St-Jacques *et al.*, 1999). Além disso, o bloqueio da atividade de *Ihh* pode alterar os níveis de expressão de Runx2 e Runx3, havendo redução de ambos no período embrionário (Kim *et al.*, 2013). Isto demonstra que a sinalização de *Ihh* é necessária para manter a alta taxa de proliferação de condrócitos durante o crescimento dos ossos longos de mamíferos nas fases iniciais da formação e do crescimento endocondrais (St-Jacques *et al.*, 1999).

Recentemente, foram identificados novos agonistas das proteínas *Hedgehog* (*Hh*), as moléculas Hh-Ag 1.3 e Hh-Ag 1.7, as quais ativam a expressão de Gli1, um alvo de sinalização de Hh, com capacidade de promover a diferenciação de linhagens de células tronco mesenquimais em osteoblastos, mesmo com a deleção do fator de transcrição Runx2 (Nakamura *et al.*, 2015). Hh atua também sinergicamente com a BMP2 e estimula a diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos (Nakamura *et al.*, 2014).

O PTHrP e o *Ihh* também estabelecem um ciclo de *feedback* negativo, cujo objetivo é regular a maturação dos condrócitos e a hipertrofia de forma coordenada (Wallis, 1996; Yang *et al.*, 2015). O PTHrP difunde-se para a região da placa epifisária para promover a proliferação de condrócitos que ao saírem do ciclo celular sofrem hipertrofia, reduzindo a expressão de PTHrP para um valor abaixo do nível crítico (Yang *et al.*, 2015). O *Ihh* é expresso nos condrócitos pré-hipertróficos e regula o início da hipertrofia do condrócito pelo controle da expressão do PTHrP-R. Já a ativação do PTHrP pelo *Ihh* resulta na inibição da conversão dos condrócitos pré-hipertróficos em condrócitos hipertróficos, mantendo os condrócitos em estágio proliferativo (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996; St-Jacques *et al.*, 1999).

3.1.4 Fatores de crescimento fibroblástico (FGFs)

Os fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) constituem uma família de pelo menos 23 polipeptídeos nos mamíferos, sendo os ligantes agrupados em subfamílias baseado em diferenças na homologia e filogenia de suas sequências, FGFs canônicos (FGF1-10, 16-18, 20, 22), FGFs similares a hormônios (FGF15/19, 21, 23) e FGFs intracelulares (FGF11-14) (Dennin *et al.*, 2010). Estes fatores exercem funções essenciais tanto no processo de ossificação endocondral quanto intramembranoso (Ornitz e Marie, 2015).

Os FGFs são fatores parácrinos que, após a liberação pelas células, induzem sinais em células vizinhas ou distantes e modulam inúmeros efeitos biológicos (Harmer *et al.*, 2004). Ligam-se e ativam com alta afinidade os quatro diferentes receptores de tirosina quinase transmembrana, os receptores dos fatores de crescimento fibroblástico (FGFRs 1-4), os quais medeiam a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal (Colvin *et al.*, 1999; Ornitz e Marie, 2002; Chen e Deng, 2005; Ornitz e Marie, 2015). A sinalização FGF/FGFR é importante para a regulação da formação óssea pré-natal e pós-natal, sendo sintetizados desde os estágios iniciais da formação óssea até a remodelação óssea no indivíduo adulto (Ornitz e Marie, 2002; Marie, 2003).

Em diversas espécies, incluindo a humana, o FGF-1 e o FGF-2 são encontrados na zona proliferativa e na porção superior da zona hipertrófica da placa epifisária (Gonzalez *et al.*, 1990; Gonzalez *et al.*, 1996). A superexpressão do FGF-2 em camundongos pode resultar em encurtamento e achatamento dos ossos longos e redução da zona hipertrófica (Coffin *et al.*, 1995). A injeção sistêmica de FGF-2 em ratos em crescimento tem como consequência o aumento na espessura da placa epifisária, com achatamento dos condrócitos na porção inferior da zona hipertrófica e separação das colunas na zona proliferativa. Pode-se observar ainda inibição da invasão vascular e da reabsorção da matriz cartilaginosa pela menor expressão de MMP13 pelos condrócitos hipertróficos (Nagai e Aoki, 2002). O FGF-2 também tem papel pró-angiogênico, uma vez que acelera a invasão vascular, modula a osteoblastogênese e o recrutamento de osteoblastos e regula a diferenciação terminal dos condrócitos, mantendo o crescimento celular contínuo e impedindo a diferenciação prematura (Carlevaro *et al.*, 2000; Dailey *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2008).

Além disso, os FGFs podem aumentar a expressão do Sox9, tanto em condrócitos quanto nas células mesenquimais indiferenciadas, sendo esta regulação positiva mediada pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Murakami *et al.*, 2000; Yu e Ornitz, 2007). Esta é a via de sinalização mais predominantemente ativada pelos FGFRs durante o desenvolvimento embrionário, cujo principal efeito é na proliferação celular, promovendo entrada na fase S do ciclo celular (Turner e Grose, 2010; Goetz e Mohammadi, 2013). Já o FGF23 age indiretamente como um hormônio e está associado ao processo de mineralização endocondral regulando a homeostase do fósforo (Ornitz e Marie, 2015).

Após a secreção, os FGFs ficam presos na matriz extracelular da qual são liberados pela ação de heparinases, proteases ou proteínas de ligação específicas ao FGF (FGFBP). As FGFBPs ligam o FGF aos proteoglicanos presentes na superfície celular que estabilizam a interação do ligante FGF com os receptores específicos FGFR (Ori *et al.*, 2008). Diferenças na composição e na estrutura dos proteoglicanos parecem alterar a sinalização do FGFR (Schlessinger *et al.*, 2000). A distribuição dos FGFRs na cartilagem de crescimento pode diferir entre as espécies de mamíferos (De Luca e Baron, 1999). Mutações nos FGFRs podem afetar a condensação mesenquimal com consequentes alterações morfológicas do esqueleto. Em humanos podem

resultar em formas de acondroplasias (Horton *et al.*, 2007), pois o gene *Fgfr2* é um dos primeiros a regular positivamente a condensação das células mesenquimais (Peters *et al.*, 1992).

O FGFR3 possui funções contrárias que dependem da fase de desenvolvimento. No início da formação do esqueleto, o FGFR3 promove proliferação de condrócitos na placa epifisária, entretanto após o nascimento, torna-se um regulador negativo da placa epifisária e inibe a proliferação e a diferenciação terminal de condrócitos, bem como a síntese de matriz por estas células (Kronenberg, 2003; Ornitz, 2005). Esta regulação negativa está associada com a inibição da sinalização de *hedgehog* e da expressão da BMP4 (Nagai e Aoki, 2002). As funções do FGFR1 e do FGFR2 são bem menos caracterizadas com relação ao crescimento endocondral, quando comparadas às do FGFR3 (Denning *et al.*, 2010). Nos estágios iniciais da formação endocondral, foi detectada expressão de FGFR1 ao redor das células mesenquimais e expressão de FGFR2 na periferia das células em condensação (Ornitz, 2005). No osso maduro, o FGFR-1 e FGFR-2 são expressos no pericôndrio (Peters *et al.*, 1992) e na placa epifisária. O FGFR-1 é também expresso em condrócitos articulares (Lazarus *et al.*, 2007).

3.2 Controle da atividade apoptótica

A apoptose é uma forma de morte celular que pode ser ou patológica caracterizada por alterações na morfologia celular, como redução no tamanho e na integridade das membranas e das organelas, intensa condensação da cromatina e fragmentação do núcleo e do citoplasma em vesículas denominadas corpos apoptóticos, os quais são removidos por células fagocíticas (Kerr *et al.*, 1972).

Este processo não serve apenas para regular os estágios finais do ciclo de vida dos condrócitos, mas também para determinar a taxa de condrócitos que entrarão no processo de maturação (Shapiro *et al.*, 2014). Sem a morte destas células por apoptose, a placa epifisária aumentaria de volume e o osso apresentaria característica condroide, com baixas propriedades mecânicas, físicas e estruturais (Adams e Shapiro, 2002). Desta forma, a apoptose dos condrócitos hipertróficos da placa é essencial para que ocorra a transição da condrogênese para a osteogênese (Goldring *et al.*, 2006), além de ser crucial no esqueleto pós-natal e adulto para a remodelação óssea fisiológica e reparo ósseo (Horton Jr. *et al.*, 1998; Hock *et al.*, 2001; Magne *et al.*, 2003).

Duas vias de sinalização da apoptose são descritas, a via intrínseca e mediada pela mitocôndria e a via extrínseca. Esta última apresenta vários estimuladores, em sua maioria, receptores de membrana como o fator de necrose tumoral (TNF) e o seu receptor, CD95 (Fas/Apo-1), TRAMP, TRAIL e DR6 (Hajra e Liu, 2004; Peták e Houghton, 2001). Ambas as vias de sinalização são reguladas por caspases (Hail *et al.*, 2006). A apoptose está ativa durante a embriogênese e fornece um mecanismo para remover células e auxiliar na formação dos tecidos e órgãos. Quando há perda do controle do processo apoptótico, doenças, malformações e até mesmo a morte podem ser observadas (Shapiro *et al.*, 2005).

Durante a ossificação endocondral, os condrócitos hipertróficos devem ser removidos e substituídos por células da linhagem osteogênica. Diversas evidências sugerem que os condrócitos hipertróficos sofrem apoptose. Esta conclusão é baseada na detecção de características moleculares associadas ao processo de apoptose, como fragmentação do DNA,

ativação das caspases e redução da expressão de Bcl-2 (Adams e Shapiro, 2002; Mackie *et al.*, 2011). As proteínas que regulam a apoptose são predominantemente expressas nas zonas proliferativa e hipertrófica (Amling *et al.*, 1997; Adams e Shapiro, 2002; Staines *et al.*, 2013).

A ativação da apoptose dos condrócitos é regulada por diversos fatores específicos presentes na zona juncional entre a cartilagem calcificada e o osso, como os elevados níveis de cálcio intracelular, o ácido retinoide e a vitamina D (Shapiro *et al.*, 2005). Os níveis de fosfato inorgânico (Pi) aumentam na matriz extracelular nas células das zonas proliferativa e hipertrófica da placa epifisária e atingem níveis mais elevados na zona terminal de diferenciação dos condrócitos. Distúrbios na homeostase do Pi podem levar à ossificação endocondral anormal, sugerindo que o Pi extracelular é um regulador da apoptose dos condrócitos da placa epifisária e conseqüentemente, do crescimento (Kim *et al.*, 2010). O Pi estimula a apoptose de células condrogênicas pela diminuição da proporção do mRNA para Bcl-2/Bax. Há também fragmentação do DNA e aumento da expressão de caspase 3, além de aumento da expressão de colágeno X (Magne *et al.*, 2003). A Bcl-2 é uma molécula anti-apoptótica, expressa em condrócitos das zonas proliferativa e pré-hipertrófica da placa epifisária. Mas, nos condrócitos hipertróficos há menor expressão de Bcl-2 quando comparadas às demais zonas (Tare *et al.*, 2008).

Outro fator associado a apoptose dos condrócitos é o fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1), cuja expressão ocorre em níveis mais elevados nos condrócitos hipertróficos. A expressão deste fator é responsiva à quantidade de oxigênio do microambiente. Os condrócitos geram energia metabólica através da glicólise anaeróbica, uma adaptação do ambiente que permite que estas células sobrevivam com um fornecimento vascular restrito. Quando os valores da pO_2 ficam menores que 5%, o HIF-1 é expresso e ativa genes que são requeridos para a sobrevivência celular (Shapiro *et al.*, 2005). Desta forma, a inativação condicional do gene que codifica o HIF-1 leva à redução da maturação dos condrócitos e ao aumento da apoptose (Bohensky *et al.*, 2007) durante a embriogênese, resultando em letalidade ao nascimento (Schipani *et al.*, 2001).

Algumas pesquisas têm sugerido que os condrócitos hipertróficos sofrem um processo denominado autofagia, pois em alguns aspectos morfológicos, estas etapas de morte celular diferem tanto da necrose quanto da apoptose (Ahmed *et al.*, 2007; Emons *et al.*, 2009), sendo inclusive utilizado o termo “condroptose” (Roach *et al.*, 2004). A resposta autofágica é observada durante condições de estresse, tais como esgotamento de nutrientes, hipóxia e envelhecimento (Srinivas *et al.*, 2009). Este processo foi reconhecido como morte celular programada tipo II, que difere da apoptose clássica, que é a morte celular programada tipo I (Shapiro *et al.*, 2014). Os condrócitos hipertróficos passam a apresentar em seu interior vesículas denominadas autofagossomos. Ocorre a imersão dos componentes citosólicos e das organelas dentro dos autofagossomos, os quais apresentam membrana dupla e lisossomos fundidos para degradar as macromoléculas em seu interior (Srinivas *et al.*, 2010) até a completa autodestruição dos condrócitos, como evidenciado pela presença de lacunas vazias (Roach *et al.*, 2004).

Do ponto de vista fisiológico, a autofagia dos condrócitos na placa epifisária é controlada por fatores como o HIF-1, o HIF-2, a proteína alvo da rapamicina em mamífero (mTOR) e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Enquanto o HIF-1 atua como um sensor metabólico celular e estimula o fluxo glicolítico dos condrócitos e a autofagia, o HIF-2 é um regulador negativo potente da autofagia (Bohensky *et al.*, 2009). A hipóxia promove a expressão de HIF-1A e alta atividade glicolítica, com significativa diminuição de ATP,

elevando os níveis de AMP e suprimindo a mTOR, uma serina/treonina quinase que modula a tradução e a divisão celular. A atividade da AMPK é sensível a muitos sinais metabólicos e ao estresse no microambiente, incluindo a hipóxia (Shapiro *et al.*, 2014). Em adição, a atividade da mTOR também é regulada pela AMPK, a qual inibe a ativação da sinalização dependente da mTOR (Phornphutkul *et al.*, 2008).

Aparentemente, o catabolismo das macromoléculas objetiva gerar energia para os condrócitos hipertróficos em seu microambiente restritivo, aumentando a longevidade da célula (Roach *et al.*, 2004). Ou seja, a indução da autofagia tem por objetivo retardar a morte dos condrócitos até a conclusão do processo de maturação. Isto ocorre, porque o adiamento da apoptose e a retenção de condrócitos na placa epifisária impediria sua substituição pelos osteoblastos e o crescimento ósseo entraria em estase (Srinivas *et al.*, 2009). Assim, eventualmente, a autofagia leva a sensibilização dos condrócitos terminais e acredita-se que mesmo os condrócitos sendo bem adaptados ao ambiente de hipóxia, a invasão vascular na junção condro-óssea e a reoxigenação dos condrócitos hipertróficos pode sensibilizá-los a passar pelo processo de morte celular programada (Shapiro *et al.*, 2005; Shapiro *et al.*, 2014).

3.3 Regulação da atividade angiogênica nas cartilagens de crescimento

A vascularização adequada é crucial para a formação, crescimento, homeostase e reparo ósseo. Durante a formação e o crescimento ósseos endocondrais, a progressiva conversão do molde cartilaginoso, inicialmente avascular, em osso é intimamente dependente da neovascularização (Maes, 2013). Este processo requer um minucioso controle e equilíbrio de moléculas com potenciais opostos. Diversos achados indicam que os condrócitos são capazes de sintetizar tanto estimuladores quanto inibidores da angiogênese, dependendo do estágio de diferenciação (Carlevaro *et al.*, 2000).

As células que participam deste processo, como os condroblastos, osteoblastos e os osteoclastos devem apresentar uma interação funcional com o sistema vascular, sendo inclusive reguladas por moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas (Carrington e Reddi, 1991; Maes, 2013). Diversas moléculas têm sido implicadas como reguladores positivos da angiogênese, incluindo os membros da família do VEGF, FGF, TGF, fator de necrose tumoral (TNF), Angs, dentre outras (Dai e Rabie, 2007).

3.3.1 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

O VEGF é um mitógeno de células endoteliais codificado em mamíferos por cinco genes designados VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e pelo fator de crescimento placentário (PlGF) (Huang e Bao, 2004; Liu e Olsen, 2014). Foi identificado inicialmente como um dos principais fatores parácrinos tanto para a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente, quanto para a vasculogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir da diferenciação de angioblastos em células endoteliais (Gonzalez-Crussi, 1971; Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996).

Alguns estudos têm demonstrado que o VEGF pode atuar como mediador essencial durante o processo de formação e crescimento ósseos endocondrais, pois apresenta múltiplas funções, não apenas na angiogênese do molde cartilaginoso, mas também em diferentes aspectos do crescimento ósseo (Zelzer e Olsen, 2005; Dai e Rabie, 2007; Berendsen e Olsen, 2014; Liu e Olsen, 2014). Este fator é importante para a sobrevivência das células endoteliais, hematopoiéticas, bem como das células das linhagens osteogênica e condrogênica (Berendsen e Olsen, 2014). Desta forma, o VEGF apresenta função essencial para o desenvolvimento do esqueleto e para homeostasia óssea pós-natal (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Hall *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012; Marini *et al.*, 2015).

Durante a tradução do ácido ribonucleico (RNA) há retirada dos *introns* e união dos *exons*. Mas no *splicing* alternativo, pode haver uniões e retiradas em diferentes locais, dando origem a diversas proteínas codificadas por um mesmo gene. Esse *splicing* alternativo do transcrito primário de VEGF gera diversas isoformas de mRNAs, as quais codificam diferentes proteínas com quantidades variáveis de resíduos de aminoácidos (Ferrara e Keyt, 1997). O VEGF murino apresenta um aminoácido a menos comparado com a isoforma humana correspondente e é denominado VEGF-A120, VEGFA144, VEGF-A164 e VEGF-A188, os quais apresentam diferentes atividades biológicas (Tamayose *et al.*, 1996).

Os efeitos parácrinos do VEGF são mediados por receptores específicos de tirosina quinase (VEGFRs), como o receptor do endotélio vascular-1 (VEGFR1/Flt1) e o receptor do endotélio vascular-2 (VEGFR2/Flk-1/KDR), os quais são expressos em células endoteliais (Deckers *et al.*, 2000; Dai e Rabie, 2007). Todas as isoformas do VEGF podem se ligar a ambos os receptores, e apesar do VEGF apresentar até 10 vezes mais afinidade com o Flt1 do que o Flk-1, este último é o principal receptor envolvido na sinalização celular pela forte atividade da tirosina quinase (Berendsen e Olsen, 2014). A ação do Flk-1 nos osteoblastos ainda não é muito esclarecida, entretanto estudos *in vitro* indicam que ele apresenta papel importante na diferenciação e na sobrevida dos osteoblastos (Alonso *et al.*, 2008). A ligação do VEGF ao receptor Flt-1 não parece induzir proliferação celular e, ao contrário, acredita-se que a sua função seja principalmente inibitória (Shraga-Heled *et al.*, 2007).

Deficiências em qualquer receptor para o VEGF resultam em letalidade embrionária (Hall *et al.*, 2006). Camundongos VEGFR^{-1/2} *knockout* morrem no oitavo dia embrionário, enquanto embriões homozigotos VEGF^{+/-} morrem entre o 11^o e 12^o dia embrionário em consequência das difusas falhas na vascularização (Hanahan, 1997). De forma similar, a deleção de Flk-1 resulta em ausência de vasculogênese e intensa alteração na hematopoiese, com desenvolvimento incompleto do embrião e do saco vitelínico, resultando em morte intrauterina nos dias embrionários 8,5^o e 9,5^o (Shalaby *et al.*, 1995).

Está bem estabelecido que a hipóxia é um dos principais estímulos para a expressão de VEGF, pois a zona hipertrófica da placa epifisária é avascular e estas células são potenciais fontes de VEGF (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Na placa epifisária de neonatos humanos, o VEGF é expresso fracamente em uma minoria de condrócitos da zona proliferativa e é intensamente expresso nos condrócitos hipertróficos e na zona mineralizada da junção entre cartilagem e osso (Horner *et al.*, 1999). No entanto, as diferentes funções do VEGF durante o crescimento e a manutenção do osso ainda não são completamente entendidas (Berendsen e Olsen, 2014). O VEGF é expresso nas células do pericôndrio no início da formação óssea endocondral para permitir a invasão vascular da cartilagem (Takimoto *et al.*, 2009). Em embriões de aves e camundongos, o VEGF é expresso nos condrócitos hipertróficos e esporadicamente em

condrócitos pré-hipertróficos, mas não é expresso nos condrócitos em repouso e em proliferação (Carlevaro *et al.*, 2000).

O VEGF é de fundamental importância durante a formação do centro de ossificação primário. Sendo assim, camundongos com deficiência na expressão de VEGF apresentam invasão tardia de vasos sanguíneos no centro de ossificação primário e retardo na remoção de condrócitos hipertróficos (Zelzer *et al.*, 2004). A inativação do VEGF pode suprimir completamente a invasão de vasos sanguíneos e está associada a prejuízos na formação do osso trabecular, expansão da zona hipertrófica de condrócitos bem como alteração no recrutamento e na diferenciação de condroblastos, embora a proliferação de condrócitos seja aparentemente normal (Gerber *et al.*, 1999). Isso ocorre porque o VEGF não age apenas na angiogênese óssea, mas também pode apresentar múltiplas funções no crescimento ósseo, como diferenciação de condroblastos e osteoblastos e recrutamento de osteoclastos (Zelzer e Olsen, 2005). Assim, o VEGF é um coordenador essencial para a morte dos condrócitos hipertróficos, para a ação dos condroclastos e osteoclastos e para a síntese e remodelação da matriz extracelular (Gerber *et al.*, 1999).

Os condrócitos produzem uma variedade de fatores que regulam positivamente ou negativamente a angiogênese (Descalzi *et al.*, 1995; Carlevaro *et al.*, 1997; Horner *et al.*, 1999). Adicionalmente, o Runx2 é um componente necessário para a regulação do VEGF (Zelzer *et al.*, 2004), pois camundongos deficientes de Runx2 apresentam quase ausência total da expressão de VEGF em condrócitos hipertróficos, bem como apresentam redução drástica dos níveis dos receptores para VEGF nas células do pericôndrio (Zelzer *et al.*, 2001). Além disso, a perda parcial de VEGF prejudica a angiogênese esquelética, com conseqüente retardo da hipertrofia dos condrócitos, da formação óssea e da calcificação da cartilagem (Maes *et al.*, 2002; Zelzer *et al.*, 2002).

3.3.2 Angiopoetinas

Além do VEGF, outros reguladores são importantes para o processo de angiogênese e maturação dos vasos sanguíneos, como a angiopoetina-1 (Ang1), Ang2 e os ligantes do receptor de tirosina quinase (Tie2). As Angs são peptídeos altamente homólogos e se ligam com grande afinidade ao Tie2 (Maisonpierre *et al.*, 1997; Huang e Bao, 2004). A deleção dos receptores Tie1 e Tie2, ainda no período embrionário, resulta em óbito (Dumont *et al.*, 1994).

Apesar do VEGF apresentar maior expressão durante o crescimento ósseo humano, tanto a Ang1 quanto a Ang2 são coexpressas com o VEGF em locais de ossificação endocondral e de remodelação óssea. Na cartilagem, tanto as proteínas quanto a expressão de mRNA para Ang1 e Ang2 aumentam com a diferenciação dos condrócitos, no entanto a Ang2 apresenta maior intensidade de expressão, principalmente nas zonas de proliferação e hipertrófica próximas de vasos sanguíneos (Horner *et al.*, 2001). Em fetos de suínos, a imunomarcagem para Ang2 no rádio é menor nas regiões de ossificação endocondral, enquanto a Ang1 não foi detectada (Spiegelhaere *et al.*, 2010).

Em camundongos, a Ang1 e a Ang2 apresentam funções opostas na regulação da angiogênese. Enquanto a Ang1 estimula o recrutamento de pericitos e a estabilização da interação entre células e matriz, a Ang2 induz instabilidade nas interações entre células e célula-matriz, o que

facilita a indução da angiogênese pelo VEGF (Asahara *et al.*, 1998). No entanto, em camundongos, na ausência de VEGF, a Ang2 induz a regressão dos vasos sanguíneos (Dumont *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995).

3.3.3 Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

As metaloproteinases da matriz (MMPs) representam uma família de enzimas que degrada a MEC, estando envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos que requerem a remodelação da MEC. As MMPs compartilham várias características estruturais em comum, incluindo a presença de um catalisador com domínio de ligação ao zinco. Estas enzimas são sintetizadas como enzimas latentes e transformadas na forma ativa por remoção de um pró-peptídeo amino terminal. As MMPs são endopeptidases que regulam o crescimento e a migração celular e a remodelação da matriz extracelular (Zhang *et al.*, 2009) e são reguladas negativamente pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (Mackie *et al.*, 2008).

As MMPs são ativas em pH neutro e podem digerir sinergicamente todas as macromoléculas de matriz. De acordo com a sua estrutura e o substrato específico ao qual se liga, os membros da família das metaloproteinases são classificados em subgrupos de collagenases (MMP 1, 8, 13), estromelisininas (MMP 3, 10), estromelisininas *like* (MMP 11, 12), matrisilinas (MMP 7, 26), gelatinases (MMP 2, 9), MMPs tipo membrana (MMP 14, 15, 16, 17, 24, 25), dentre as mais de 20 MMPs descritas (Reynolds, 1996; Nagase *et al.*, 1997).

A MMP13 é seletivamente expressa por condrócitos hipertróficos e osteoblastos e tem papel essencial na biologia óssea, degradando componentes da matriz extracelular, em particular o colágeno, tanto o fibrilar quanto o agregado, sendo importante na degradação da cartilagem da junção condro-óssea das cartilagens de crescimento (Nagai e Oaki, 2002; Cawston e Wilson, 2006; Komori, 2010). É a principal collagenase expressa em centros de ossificação primários e secundários (Brozi *et al.*, 2010). Em camundongos com deleção da MMP13, os condrócitos hipertróficos são aparentemente normais. No entanto, há expansão da zona hipertrófica e a ossificação é prejudicada (Inada *et al.*, 2004).

A MMP9 não degrada o colágeno fibrilar e sim o colágeno desnaturado e o agregado. A MMP-9 é altamente expressa em osteoclastos em regiões mineralizadas e em condroclastos em áreas não mineralizadas da junção da cartilagem com o osso, onde auxilia também na invasão vascular (Karapalis, 2008). Alguns estudos têm demonstrado que a MMP9 é fundamental para o crescimento embrionário (Lehmann *et al.*, 2005). Camundongos MMP9^{-/-} apresentam aumento da espessura da zona hipertrófica da epífise, redução da ossificação endocondral e prejuízos na formação da cavidade medular e do osso trabecular, na apoptose de condrócitos, na invasão vascular e no recrutamento de osteoclastos (Vu *et al.*, 1998).

Apesar de importantes alterações serem observadas em ratos *knockout* para MMP13 ou MMP9, o processo de ossificação apresenta maiores prejuízos quando há deleção de ambos (Stickens *et al.*, 2004), pois a MMP13 parece compensar parcialmente a ausência de expressão da MMP-9 em camundongos MMP9^{-/-} (Kojima *et al.*, 2013). As MMPs também podem remover moléculas anti-angiogênicas e promover a biodisponibilidade de fatores angiogênicos, como o VEGF (Dai e Rabie, 2007). A expressão reduzida de MMP9 nos osteoclastos altera a indução da angiogênese na placa epifisária. Ratos com deleção de MMP9 apresentam características similares ao bloqueio da atividade de VEGF, com expansão da zona hipertrófica e redução da vascularização e da ossificação (Vu *et al.*, 1998).

3.4 Controle da atividade de síntese dos condrócitos

A cartilagem é um tecido conjuntivo especializado responsável por múltiplas funções na vida pré e pós-natal, como dar suporte estrutural para o embrião e servir de molde para a formação e crescimento ósseos endocondrais, bem como amortecer o impacto das articulações e participar do reparo de ossos e da consolidação de fraturas. É composta por condrócitos, que ocupam apenas 5% do volume da cartilagem e pela MEC produzida por estas células. As propriedades bioquímicas e a função física da cartilagem são criticamente dependentes da integridade da matriz (Kiani *et al.*, 2002; Shum *et al.*, 2003).

A MEC não representa apenas uma estrutura passiva e sim uma zona dinâmica, com interação entre os condrócitos e diversas moléculas, como proteínas de matriz extracelular capazes de se ligar diretamente aos receptores de superfície celular e iniciar as vias de transdução de sinal para modular ou desencadear a ação de fatores de crescimento e diferenciação (Streuli, 1999).

3.4.1 Síntese e composição da MEC

As proteínas estruturais e funcionais da MEC contribuem para a integridade estrutural do tecido e para sua forma original. Estas proteínas também regulam a sobrevivência celular, proliferação, diferenciação, adesão e migração por meio das interações célula-matriz (Bissel *et al.*, 1982). Os condrócitos são responsáveis pela síntese dos inúmeros componentes da matriz, bem como de substâncias que a degradam (Lofgren *et al.*, 2014). A MEC que envolve os condrócitos é composta por líquido tissular e uma rede estrutural de macromoléculas que conferem forma e estabilidade ao tecido. O líquido tissular é formado por água, gases, pequenas proteínas, metabólitos e alta concentração de cátions para contrabalancear os proteoglicanos carregados negativamente (Bray *et al.*, 1996).

Devido à característica avascular da cartilagem, a estrutura da MEC desempenha papel crítico, não apenas no suporte estrutural de condrócitos, mas também na difusão de substâncias, particularmente das moléculas de sinalização e dos fatores de crescimento (Cortes *et al.*, 2009). A MEC é formada principalmente pelas proteínas colágenas II, IX e X, expressas predominantemente nas zonas de proliferação, pré-hipertrófica e hipertrófica, respectivamente e que garantem a integridade da matriz (Eerden *et al.*, 2003).

A MEC pode afetar o comportamento das células, seja pela síntese das proteínas que formam a própria MEC ou pela ligação dos fatores de crescimento e de diferenciação. Ou seja, qualquer alteração da sua composição ou estrutura pode ter efeitos drásticos sobre a diferenciação celular (Streuli, 1999). As anomalias esqueléticas, como as condrodisplasias, podem ser causadas não apenas por deficiências de colágenos ou proteoglicanos, mas também a partir de alterações de um simples componente da MEC. Isso pode conduzir à uma cascata de interrupção em outras atividades de genes nos condrócitos que contribuem para um conjunto de alterações patológicas na arquitetura da placa epifisária. Como por exemplo, uma alteração isolada de aminoácidos no colágeno II resulta em vários efeitos secundários sobre a síntese e arquitetura dos componentes da matriz extracelular (So *et al.*, 2001).

As macromoléculas estruturais correspondem a 20% do peso total do tecido. Deste percentual, o colágeno corresponde a 60%, os proteoglicanos 25% a 35% e as proteínas não colágenas e as

glicoproteínas correspondem a 15% a 20%. A cartilagem articular contém múltiplos tipos distintos de colágeno, especificamente os II, VI, IX, X e XI. A organização das fibrilas de colágeno em uma forte rede que se estende por todo o tecido, confere sua forma e resistência tênsil. O colágeno II está presente em maior quantidade na cartilagem articular normal. O colágeno XI, embora seja responsável por um pequeno percentual do total, altera a espessura das fibras no interior da matriz, ligando-se com o colágeno II para manter a rede fibrilar. Já o colágeno X se associa ao colágeno II e é abundante na zona hipertrófica (Bray *et al.*, 1996; Chambers *et al.*, 2002).

Além das proteínas colágenas, a cartilagem é particularmente rica em proteínas não colágenas. O principal glicosaminoglicano presente na cartilagem é o sulfato de condroitina, sendo denominado posteriormente de agrecan, que apresenta como particularidade a função de interagir com outros glicosaminoglicanos como o ácido hialurônico, *biglican* e *glipican*, os quais necessitam de grupos de sulfatos livres para ativação e ligação na MEC (Knudson e Knudson, 2001; Settembre *et al.*, 2008).

Macromoléculas como agrecan possuem capacidade eficiente para o suporte de forças de carga de compressão, enquanto que a rede de colágeno proporciona ao tecido resistência à tração (Burdan *et al.*, 2009; Perrier-Groult *et al.*, 2013). Deleções no gene agrecan em camundongos podem levar à letalidade, com fenótipo esquelético muito alterado, com perda da arquitetura da placa epifisária e redução significativa dos elementos cartilagosos (Krueger *et al.*, 1999). Em camundongos com mutação no gene fosfoadenosina fosfossulfato sintetase (PAPS), observa-se condrodysplasia pós-natal, com níveis reduzidos de proteínas PAPS e proteoglicanos e diminuição de *indian hedgehog*, mostrando a importância dos proteoglicanos sulfatados na modulação dos sinais de regulação do desenvolvimento ósseo (Cortes *et al.*, 2009).

A família agrecan inclui outros membros importantes, como o versican, também denominado PG-M, neurocan ou brevican (Kiani *et al.*, 2002). É expresso em áreas de condensações mesenquimais do molde cartilaginoso e regulado negativamente pelo agrecan durante a diferenciação condrogênica, quando a expressão de agrecan por condrócitos diferenciados predomina sobre outros proteoglicanos (Ovadia *et al.*, 1980).

A expressão e a secreção dos componentes da MEC da cartilagem, incluindo o colágeno II e o agrecan são estimuladas por uma variedade de fatores solúveis presentes na placa epifisária, incluindo o IGF-1, as BMPs e outros membros da superfamília TGF β (Lefebvre e Smits, 2005; Tew *et al.*, 2008). Por exemplo, em cultivo de condrócitos de embriões de ratos, a BMP2 é extremamente eficiente em aumentar a síntese de pró-colágeno II e agrecan (Perrier-Groult *et al.*, 2013).

Os hormônios tireoidianos também apresentam funções que podem alterar a composição da matriz extracelular (Luegmayer *et al.*, 1996; Fratzi-Zelman *et al.*, 1997). Assim, estudos utilizando T3 em cultivos de condrócitos de origens diferentes têm sido realizados, principalmente da placa epifisária e com condrócitos de feto, envolvendo diferentes sistemas de cultura e condições de meio (Randau *et al.*, 2013). Entretanto, os resultados são contraditórios. Condrócitos articulares humanos cultivados em monocamada submetidos à influência de T3 no meio apresentam proliferação celular aumentada (Malinin e Hornicek, 1997). Em células de cartilagem de bovinos jovens, T3 não apresentou nenhum efeito na proliferação ou na síntese de proteoglicanos (Yates *et al.*, 2005).

Em culturas primárias de condrócitos da cartilagem articular de coelhos jovens, T3 foi capaz de estimular a síntese de proteoglicanos, de forma bifásica, dependendo da concentração. A associação de insulina com T3 e T4, isolados ou combinados ao meio de cultivo, estimula a produção de matriz extracelular a partir do aumento da síntese de proteoglicanos ricos em sulfato de condroitina e colágeno II, sugerindo que estes hormônios podem modular o metabolismo dos condrócitos (Glade *et al.*, 1994). Com relação às proteínas colágenas, T3 é capaz de elevar os níveis de mRNA de *Col X* e *Col II*, bem como de fosfatase alcalina em cultivo tridimensional de condrócitos de bovinos em hidrogel (Randau *et al.*, 2013). Já as pesquisas com cultivo de osteoblastos MC3T3-E1, em diferentes concentrações de T3, demonstram que este hormônio também interfere na matriz óssea por aumentar os níveis de mRNA de *Colla1*, podendo resultar em alterações na ligação cruzada e maturação do colágeno (Varga *et al.*, 2010).

Existem outros fatores importantes, como o fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF, CCN2) que é uma proteína membro da família CCN (Perbal, 2001) e é indutor da MEC pela deposição excessiva de colágeno em processos de fibrose (Stratton *et al.*, 2001). Entretanto, este fator também é importante durante o desenvolvimento ósseo, pois o CTGF parece agir mediando TGFs e as BMPs (Abreu *et al.*, 2002). Camundongos com deleção deste gene apresentam defeitos na formação óssea endocondral, com expansão da placa epifisária, alteração na proliferação de condrócitos e na composição da matriz extracelular da zona hipertrófica da placa de crescimento, particularmente com redução na expressão de MMP9, MMP13 e VEGF (Ivkovic *et al.*, 2003).

3.4.2 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são fatores de crescimento e de diferenciação pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF β) que foram originalmente definidos por sua capacidade para induzir a formação de cartilagem e regular de forma autócrina e parácrina a maturação dos condrócitos (Vortkamp, 1997; Adams *et al.*, 2007).

As BMPs atuam pela ligação aos receptores transmembrana da superfície celular e induzem a autofosforilação, o que leva a ativação da *Smad* ou da *p38*, uma proteína quinase MAPK (Suutere *et al.*, 2010). Sua regulação ocorre pela ligação com antagonistas extracelulares e citoplasmáticos, como o *Noggin*, *chordin*, *chordin-like* e a folistatina (Vortkamp, 1997; Reddi, 2000; Canalis *et al.*, 2003). A ativação da sinalização das BMPs está associada à proliferação de condrócitos, sendo as BMPs importantes tanto para o processo de ossificação quanto para a condrogênese. Estas proteínas atuam nas fases iniciais da condensação mesenquimal, na fase de determinação de células condroprogenitoras e diferenciação celular, mas também regula as fases posteriores da maturação dos condrócitos representadas pela diferenciação terminal e pelo fenótipo hipertrófico (Andreson *et al.*, 2000; Tsumaki, *et al.*, 2005). As BMPs 2, 4 e 7 regulam coordenadamente a modelação dos membros no processo de condensação mesenquimal, dependendo da expressão temporal e espacial dos receptores e antagonistas das BMPs (Tickle *et al.*, 2003; Pignatti *et al.*, 2014).

Algumas pesquisas demonstraram que a sinalização das BMPs estimula a maturação *in vitro* dos condrócitos, uma vez que o tratamento de condrócitos pré-hipertróficos com BMPs induz a expressão de mRNA para colágeno X, bem como da atividade da fosfatase alcalina (Leboy *et*

al., 1997). Estas proteínas atuam também na diferenciação das células mesenquimais osteoprogenitoras, influenciando direta ou indiretamente a expressão de citocinas e de fatores de crescimento que também atuam neste processo (Wozney, 1992).

Mais de 20 subtipos de BMPs estão atualmente identificados na superfamília TGF β . Destes, a BMP2 tem a maior atividade e é o único fator que pode induzir, sem a participação de nenhum outro, a formação de osso (Sheu *et al.*, 2014). A adição de BMP2, 4 e 6 em cultivo de osteoblastos murino resulta em aumento da deposição de cálcio e maior expressão de VEGF-A, ambos de forma dose dependente (Deckers *et al.*, 2000). A adição de BMP6 e BMP7 em cultura de condrócitos promove a expressão de colágeno X, enquanto que a adição de BMP2 promove a expressão de colágeno X, *Ihh*, PTH, PTHrP e de ALP (Sheu *et al.*, 2014).

4. A tireoide e os hormônios tireoidianos

A ação dos hormônios tireoidianos (HTs) ocorre a partir do período embrionário, entretanto alguns órgãos e tecidos são imaturos ao nascimento e têm um padrão de desenvolvimento temporal específico (Araújo *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2004). Desta forma, níveis adequados de tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodo-L-tiroxina, T₄) e triiodotironina (3,5,3'-triiodo-L-tironina, T₃) são responsáveis por controlar diversos processos metabólicos durante o crescimento, desenvolvimento e na vida adulta dos vertebrados (Cooper, 2003).

A T₄ e a T₃ são assim denominadas em função da quantidade de iodo presente em sua molécula, sendo este necessário para a síntese e bioatividade dos HTs. Cada molécula de T₄ apresenta quatro iodios, correspondendo a 66% do seu peso e a T₃ apresenta três iodios por molécula, representando 58% do seu peso. A síntese destes hormônios depende essencialmente do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT) (Figura 5). O hormônio liberador de tirotrofina (TRH), produzido pelo hipotálamo, atua em receptores específicos de membrana presentes nos tireotrófos da hipófise estimulando a transcrição gênica e a secreção do hormônio tireotrófico (TSH) (Nunes, 2003). O TSH é o principal regulador da função da tireoide, pois interage com os receptores presentes na membrana da célula folicular tireoidiana, induzindo a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos HTs, com aumento na atividade celular e consequente secreção hormonal (Bassett e Williams, 2003; Nunes, 2003).

A tiroxina é liberada pela tireoide diretamente na circulação e carreada por proteínas transportadoras, como a globulina de ligação à tiroxina, a transtirretina e a albumina do soro (Boelaert e Franklin, 2005; Pascual e Aranda, 2013). Anteriormente, postulava-se que os HTs, por serem lipofílicos, poderiam entrar na célula por difusão passiva. No entanto, nos últimos anos, tem sido comprovado que a expressão destas proteínas transportadoras na membrana plasmática facilita a entrada dos HTs na célula (Visser *et al.*, 2011).

Apesar da tiroxina ser o principal hormônio secretado pela tireoide, a T₃ é o hormônio mais ativo, uma vez que possui maior afinidade pelos receptores nucleares tireoidianos (TRs), os quais medeiam a maioria das ações desses hormônios (Flamant *et al.*, 2003). Em humanos, apenas 20% da forma biologicamente ativa da T₃ é secretada diretamente pela tireoide. Assim, a conversão da T₄ em T₃ nos tecidos alvos é catalisada por uma selenioproteína denominada iodotironina desiodase, a qual apresenta três isoformas, a tipo I (D1), a tipo II (D2) e a tipo III (D3), codificadas por diferentes genes (Bianco *et al.*, 2002). As desiodases são divididas em

duas classes, as ativadoras (D1 e D2) e as inativadoras (D3 e D1) dos hormônios tireoidianos. Esta diferença depende do local onde elas agem, se nos anéis fenol ou tirosil das iodotironinas, respectivamente. Desta forma, enquanto D1 e D2 retiram o resíduo de iodo da posição 3' ou 5' do anel externo da tiroxina, a D3 remove tal resíduo do anel interno da T_4 e da T_3 (Kuiper *et al.*, 2005).

As D1 e D2 são as principais enzimas que participam da formação da T_3 circulante e intracelular, pois são responsáveis pela conversão de T_4 em T_3 nos diferentes tecidos (Fisher e Polk, 1989; Farquharson, 2011). A D1 é uma enzima de membrana plasmática e expressa predominantemente no fígado, nos rins e na tireoide. A D2 é uma enzima do retículo endoplasmático, sendo expressa na tireoide, no tecido adiposo marrom, na pituitária e no cérebro (Bianco e Kim, 2006). Já a D3 está presente na membrana plasmática de células do sistema nervoso central e da placenta e é responsável por inativar os hormônios tireoidianos, convertendo T_4 e T_3 em metabólitos inativos, a partir da deiodinação no anel tirosil, resultando na formação da T_3 reversa (rT_3) e da T_2 , respectivamente. Sendo assim, a expressão e a distribuição das desidases desempenham papel importante na ação dos HTs no organismo, uma vez que regulam a quantidade de hormônio que atinge o receptor nuclear da célula específica nas diferentes fases do desenvolvimento e na vida adulta (Selmi-Ruby *et al.*, 2006).

A maioria das ações da T_3 nos tecidos ocorre por meio da ligação aos membros da superfamília c-erbA de receptores nucleares. Os receptores tireoidianos, $TR\alpha$ e $TR\beta$, são codificados pelos genes $TR\alpha$ e $TR\beta$, respectivamente, e são fatores de transcrição modulados pelo ligante, que atuam diretamente em sequências específicas do DNA, denominadas elementos responsivos ao hormônio (HREs), que ativam ou suprimem a expressão gênica (Sap *et al.*, 1986; Adams *et al.*, 2007).

O receptor $TR\alpha$ apresenta várias isoformas originadas a partir do *splicing* alternativo do mRNA e cuja diferença entre eles está na porção carboxi-terminal. No entanto, apenas $TR\alpha 2$ apresenta capacidade de ligação à T_3 . A transcrição do gene $TR\beta$, também por *splicing* alternativo do mRNA e diferentes promotores, produz três receptores funcionais, $TR\beta 1$, $TR\beta 2$ e $TR\beta 3$, os quais diferem entre si na porção amino-terminal (Sarlieve *et al.*, 2004). Desta forma, a ligação da T_3 aos TRs ocorre com grande afinidade e especificidade, alterando fundamentalmente a estrutura tridimensional do receptor. Para isto, ocorre ligação com outras proteínas, co-repressoras ou co-ativadoras, que facilitam a interação de T_3 aos TRs com os componentes de transcrição no promotor dos genes alvos (Adams *et al.*, 2007).

Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide

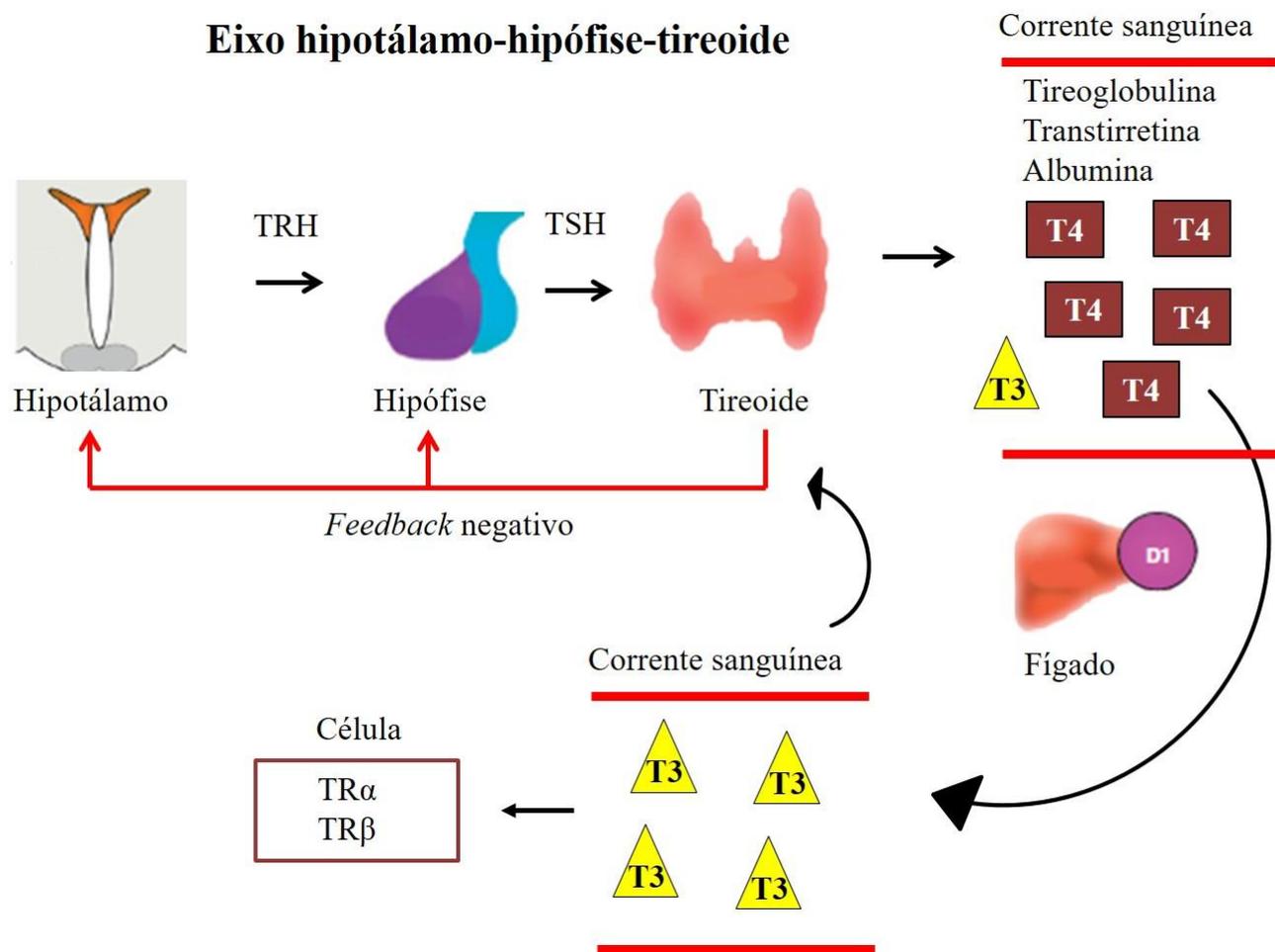


Figura 5. Síntese dos hormônios tireoidianos a partir do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e biodisponibilização para os tecidos. TRH: hormônio liberador da tireotrofina, TSH: hormônio tireotrófico. D1: iodotironina desiodase-1, T₄: tiroxina, T₃: triiodotironina TR: receptores nucleares tireoidianos. Modificado de Waung *et al.*, 2012.

5. Ação dos hormônios tireoidianos no osso e na cartilagem

Os hormônios tireoidianos são reguladores imprescindíveis do desenvolvimento e crescimento do esqueleto e apresentam ações fundamentais no osso tanto durante a ossificação pré-natal quanto no crescimento ósseo pós-natal, pois estes hormônios estimulam a condrogênese e a osteogênese e ainda regulam a síntese de matriz e a reabsorção óssea (Mundy *et al.*, 1976; Yen, 2001; Bassett e William, 2003; Desjardin *et al.*, 2014). No entanto, é importante salientar que os hormônios tireoidianos fazem parte de uma extensa lista de hormônios que, juntamente com fatores de transcrição, possuem ações importantes e coordenadas sobre o osso (Bassett e William, 2003).

A ação dos hormônios tireoidianos é mediada por receptores específicos, que estão presentes em inúmeras células do organismo, incluindo as células ósseas e cartilaginosas. Os receptores TR α 1 e TR β 1 são expressos em diversos órgãos e seus níveis relativos diferem durante as fases do desenvolvimento, devido à regulação tempo-espacial específica do tecido (Forrest, 1990). As isoformas TR α 1 e TR β 1 são expressas no osso e pesquisas com RT-PCR quantitativo demonstraram que TR α 1 é expresso 10 vezes mais que TR β 1, sugerindo que TR α 1 apresenta predomínio como mediador da ação da T₃ no osso (O'Shea *et al.*, 2003; Gogakos *et al.*, 2010). A importância deste receptor foi ressaltada em pesquisas com camundongos com mutações no TR α 1 em condrócitos e osteoblastos, os quais apresentaram durante o crescimento pós-natal um fenótipo semelhante ao observado no hipotireoidismo, com ausência de resposta à T₃ na maturação das cartilagens de crescimento, ossificação e mineralização (Desjardin *et al.*, 2014).

Nos sítios de ossificação endocondral em humanos, o receptor TR β 1 é expresso nos condrócitos indiferenciados, proliferativos e nos hipertróficos. O TR α 1 é pouco expresso nestes sítios, porém sua expressão ocorre principalmente nas células da zona de repouso, diferente da variante α 2, que é minimamente expressa nos condrócitos indiferenciados. Isso sugere que nos locais de ossificação endocondral, a ativação dos condrócitos em repouso pode ser mediada pelos receptores TR β 1 e TR α 1, enquanto a proliferação, maturação e a hipertrofia dos condrócitos é predominantemente mediada por TR β 1 (Abu *et al.*, 1997).

Ainda não é completamente identificada a ação dos HTs na regulação e na transcrição de genes alvo (Yen, 2001), ou seja, se agem diretamente na cartilagem de crescimento e nas células ósseas ou se suas ações são decorrentes da secreção ou da ação direta ou indireta de outros fatores (Desjardin *et al.*, 2014). As pesquisas que demonstram os efeitos de T₃ nos osteoblastos apresentam resultados bastante variados, podendo estimular, inibir ou mesmo não exibir efeitos, mas a maioria dos trabalhos sugere um efeito estimulatório da T₃ na atividade osteoblástica. Estes resultados podem ser devido às diferenças quanto às espécies alvo de estudo, estágio de diferenciação dos osteoblastos, o grau de confluência das células, tipo de célula utilizada, número de passagens, bem como a dose e duração do tratamento com T₃ (Harvey *et al.*, 2002).

Sabe-se que os hormônios tireoidianos agem no osso pelo estímulo do GH e do IGF-I ou pelos efeitos diretos nos genes alvos (Yen, 2001). Foi demonstrado que nas linhagens de pré-osteoblastos MC3T3-E1, a expressão de IGF-1 está diretamente regulada pelos hormônios tireoidianos, pois culturas tratadas com tiroxina e triiodotironina apresentam maior expressão de mRNA para IGF-1, de forma dose dependente, sugerindo a importância destes hormônios na diferenciação dos osteoblastos (Varga *et al.*, 1994). Boeloni e colaboradores (2013a) ao avaliar o efeito de diferentes concentrações de T₃ na diferenciação osteogênica em cultura de células tronco mesenquimais de ratas, observaram melhor diferenciação osteogênica, com maior síntese

de fosfatase alcalina, maior viabilidade celular pelo teste de conversão do MTT em cristais de *formazan* e maior síntese e maturação de colágeno quando comparados ao controle. Entretanto, na concentração mais elevada de T₃, houve efeito negativo na diferenciação osteogênica. Resultados similares foram observados em cultivo de osteoblastos MC3T3-E1 com diferentes concentrações de tiroxina, demonstrando que T₃ em baixas doses aumenta a multiplicação celular, enquanto em elevadas concentrações não apresenta efeito estimulatório (Varga *et al.*, 2010).

Os HTs estimulam a síntese de uma série de proteínas nos osteoblastos, incluindo a fosfatase alcalina que atua no tecido ósseo contribuindo para a mineralização da matriz, bem como para a síntese e secreção de proteínas como osteocalcina, osteopontina e colágeno (Sato *et al.*, 1987; Allain e McGregor, 1993; Klaushofer *et al.*, 1995; Gouveia, 2004; Boeloni *et al.*, 2013a). T₃ estimula a atividade de osteoblastos direta e indiretamente por vias complexas que envolvem diversos fatores de crescimento e citocinas (Gogakos *et al.*, 2010). *In vitro*, T₃ promove a diferenciação celular por indução de inibidores de cinase dependentes de ciclina (CDKs) que regulam a transição das fases G1-S do ciclo celular (Ballock *et al.*, 2000). Foi identificada ainda, uma via de sinalização nos osteoblastos em que T₃ aumenta a atividade de FGFR1 em resposta aos estímulos de FGF a partir da ação dos TRs, mostrando a importante relação entre o FGF e os hormônios tireoidianos para o desenvolvimento ósseo (Stevens *et al.*, 2003).

T₃ estimula a expressão de MMP13, que contribui para a progressão da hipertrofia dos condrócitos, expressão de BMP (Robson *et al.*, 2000; Lassoava *et al.*, 2009) e para o aumento de MMP9, com conseqüente remodelação da matriz óssea. A MMP13 tem por função degradar a matriz óssea ainda não mineralizada e posteriormente dar início à reabsorção pelos osteoclastos (Kusano *et al.*, 1998). As ações de T₃ nos osteoblastos são importantes para a formação e atividade dos osteoclastos (Gogakos *et al.*, 2010). Entretanto, os efeitos dos hormônios tireoidianos nos osteoclastos são complexos e pouco compreendidos, principalmente devido a dificuldade em se obter culturas primárias ou linhagens celulares (Yen *et al.*, 2001).

Assim, em culturas isoladas de osteoclastos, T₃ parece não estimular a reabsorção óssea, sendo imprescindível a co-cultura com osteoblastos para que se tornem responsivas a este hormônio (Allain *et al.*, 1992). Uma importante evidência da interação entre estas duas linhagens celulares é que o tratamento de culturas primárias de osteoblastos com T₃ resulta na expressão aumentada de mRNA do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), que é uma molécula essencial na formação de osteoclastos em culturas de células osteoprogenitoras (Miura *et al.*, 2002b). Além disso, durante a reabsorção óssea, T₃ aumenta a expressão de interleucina 6 (IL-6) e de prostaglandina E2 (PGE2), que são importantes para a osteoclastogênese como fatores de diferenciação dos osteoclastos (Bassett e William, 2009). IL-6 e PGE2 ainda agem sinergicamente influenciando os osteoclastos a partir da ação do PTH (Gu *et al.*, 2001) e da vitamina D (Gruber *et al.*, 1999).

Nos condroblastos, T₃ controla a diferenciação durante o crescimento ósseo por meio da participação dos fatores *Ihh*, BMP e PTHrP, além de aumentar a síntese de fosfatase alcalina e de fatores que estimulam a angiogênese, como MMP13 (Bassett e Williams, 2003). Assim, nota-se que a T₃ é um regulador positivo da maturação da cartilagem por estimular a expansão clonal dos condrócitos em repouso e a sua diferenciação subsequente em condrócitos hipertróficos, os quais estão associados com alterações na secreção de glicosaminoglicanos da matriz e na indução da expressão de colágeno X (Miura *et al.*, 2002a).

Em explante de escápula fetal de suínos, T₃ estimula a maturação do osso bem como o aumento da atividade da fosfatase alcalina na placa epifisária. Em cartilagem de embrião de aves, os HTs estimulam *in vitro* a síntese de proteoglicanos e potencialização da ação da somatomedina na cartilagem, além de estimular a maturação óssea, aumentar o número de condrócitos hipertróficos e a atividade da fosfatase alcalina. A síntese de fosfatase alcalina é elevada nos condrócitos hipertróficos, particularmente dentro das vesículas de matriz e nos condrócitos imaturos é ausente ou em quantidade mínima, sendo um importante marcador de maturação da cartilagem (Burch e Lebovitz, 1982).

5.1 *Disfunções tireoidianas e alterações ósseas*

Em condições normais, o hormônio tireoidiano ativa tanto a síntese quanto a reabsorção da matriz óssea, sendo, portanto, importante para a manutenção da integridade do esqueleto (Gouveia, 2004). Na medicina humana, tanto o hipotireoidismo quanto o hipertireoidismo são endocrinopatias frequentemente diagnosticadas e que cursam com alterações em diferentes sistemas e órgãos (Boelaert e Franklyn, 2005). Nos humanos e em animais de laboratório, alterações na secreção dos hormônios tireoidianos podem resultar em severas alterações do crescimento do esqueleto e da maturação óssea (Burch e Lebovitz, 1982; Gogakos *et al.*, 2010).

O hipotireoidismo é uma disfunção caracterizada pela produção insuficiente de hormônios da tireoide, que pode advir da deficiência na síntese dos HT ou da resistência a ação dos mesmos (Castro e Soares, 2014). Clinicamente pode ser evidenciado letargia, aumento de peso, mixedema, efusões, dispneia, letargia, hipertensão e mialgia (Wiersinga, 2002). Já o hipertireoidismo é uma síndrome na qual os tecidos são expostos a uma quantidade excessiva de hormônios tireoidianos. Esta enfermidade apresenta diversas causas, sendo as mais frequentes a doença de Graves, uma condição autoimune causada hiperestimulação dos receptores de tireotropina por auto-anticorpos; nódulos funcionais na tireoide, os quais produzem quantidades excessivas de hormônios tireoidianos e algumas formas de tireoidites (Cooper, 2003). Diante da ampla ação dos hormônios tireoidianos no organismo, há uma variedade de sintomas clínicos associados ao hipertireoidismo, os quais podem variar dependendo dos níveis de hormônios circulantes. Em geral, os pacientes apresentam fadiga, nervosismo ou ansiedade, perda de peso, taquicardia, sensibilidade ao calor e pele quente e úmida (Trzepacz *et al.*, 1989).

As disfunções tireoidianas também podem cursar com alterações ósseas. Como por exemplo, o hipotireoidismo espontâneo ou induzido nos seres humanos ou outros mamíferos está associado à redução da taxa de crescimento linear com atraso na ossificação do esqueleto (Bassett e Williams, 2003). Além disso, o hipotireoidismo causa osteoporose em ratas e potencializa a osteoporose após a castração pela redução do número e da atividade de osteoblastos, e também pela redução da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula em osteoblastos (Boeloni *et al.*, 2009; Hell *et al.*, 2011; Boeloni *et al.*, 2013a; Boeloni *et al.*, 2013b; Boeloni *et al.*, 2013c).

A tireotoxicose em adultos resulta em maior metabolismo ósseo e redução do ciclo de remodelação óssea, além de reduzir a densidade óssea, com consequente aumento do risco de fraturas ósseas (Klaushofer *et al.*, 1995; Yen 2001; Gogakos *et al.*, 2010). Camundongos *knockouts* para TR β também exibem alterações esqueléticas compatíveis com a tireotoxicose,

com diferenciação acelerada de condrócitos e ossificação precoce (Gauthier *et al.*, 1999, Gauthier *et al.*, 2001, Bassett *et al.*, 2007).

O hipertireoidismo pode minimizar a redução da massa óssea advinda da deficiência dos esteroides sexuais, por estimular a diferenciação das células tronco da medula óssea em osteoblastos e por aumentar a atividade de síntese dos osteoblastos. Mas também foi observado em ratas que à medida que o curso da doença aumenta, o hipertireoidismo potencializa a redução da massa óssea causada pela castração, por aumentar a reabsorção óssea em supremacia à síntese de matriz óssea (Boeloni *et al.*, 2013a; Boeloni *et al.*, 2013b; Boeloni *et al.*, 2013c).

Foi comprovado também que os efeitos do hipertireoidismo sobre o tecido ósseo de ratas adultas são dependentes do curso da doença e do perfil plasmático de hormônios sexuais. Em ratas não castradas com hipertireoidismo, inicialmente há perda óssea por aumento da reabsorção, e posteriormente há maior aposição óssea, equilibrando o processo de síntese e reabsorção óssea. A administração de tiroxina nas ratas castradas pode ainda reduzir a osteopenia resultante da castração (Serakides *et al.*, 2004). O excesso de hormônios tireoidianos em ratas ainda está associado com melhora da osteopenia vertebral no período lactacional, uma vez que eles estimulam a aposição óssea pelos osteoblastos (Serakides *et al.*, 2008).

T₃ é um potente regulador do crescimento e da maturação do osso e suas ações podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento (Waung *et al.*, 2012). Assim, diferentes manifestações podem ser observadas como consequência do excesso de HTs, as quais podem variar com a idade. Ou seja, nos casos de hipertireoidismo em adultos a perda óssea é predominante ao aumento da reabsorção, enquanto o hipertireoidismo durante a infância aumenta a mineralização óssea e acelera a maturação da placa epifisária (Cardoso *et al.*, 2014). A administração exógena de tiroxina em ratos pode apresentar comportamento bifásico, pois em concentração elevada inibe o crescimento e estimula a reabsorção, enquanto em concentração baixa estimula o crescimento óssea (Ren *et al.*, 1990). Entretanto, esta influência pode ainda ser variável com relação ao sítio ósseo, pois ratas com hipertireoidismo induzido podem apresentar maior porcentagem de tecido ósseo trabecular na metáfise femoral, mas sem alterações nas vértebras (Boeloni *et al.*, 2010).

5.2 Disfunções tireoidianas maternas e alterações ósseas na prole

Em mulheres, a prevalência das disfunções tireoidianas é elevada e em média a cada 1.000 mulheres, cinco apresentam hipotireoidismo e três apresentam hipertireoidismo. Grande parte dessa casuística é observada em mulheres em idade fértil e apesar de menos frequente, as disfunções tireoidianas vêm sendo cada vez mais diagnosticadas em gestantes (Fernández, 2013). Em consequência, as alterações hormonais maternas podem refletir em desenvolvimento anormal do feto, uma vez que os hormônios tireoidianos maternos têm ação crítica em todos os sistemas e principalmente sobre a formação óssea pré-natal (Medici *et al.*, 2013).

No hipertireoidismo materno, os tecidos fetais são expostos a quantidades excessivas de hormônios tireoidianos (Cooper, 2003) que podem prejudicar a capacidade do feto e do neonato em regular seus níveis de TSH e de T₄ (Patel *et al.*, 2011). Dessa forma, o hipertireoidismo materno pode estar associado à morte intra-uterina, aborto espontâneo, parto prematuro e baixo peso ao nascimento (Millar *et al.*, 1994; Phoojaroenchanachai *et al.*, 2001; Mestman, 2004; Medici *et al.*, 2013), alteração da maturidade óssea e interrupção precoce do crescimento ósseo

com fusão prematura das placas de crescimento, das suturas ósseas e baixa estatura final (Segni, 1999; Polak *et al.*, 2006)

O hipertireoidismo materno também pode estar associado ao hipertireoidismo transitório fetal e neonatal, os quais são causados pela passagem de anticorpos tireoestimulantes da mãe com doença de Graves para o feto. Essa alteração geralmente ocorre em 1% dos neonatos de mães com hipertireoidismo (Péter e Muzsnai, 2011). Embora raros, os casos de hipertireoidismo congênito persistente também têm sido descritos por alterações genéticas e hereditárias do receptor para tireotropina (Polak *et al.*, 2006). Essas observações clínicas demonstram a sensibilidade do esqueleto em desenvolvimento, particularmente das cartilagens de crescimento, aos hormônios tireoidianos maternos.

Durante o desenvolvimento, tanto a falta quanto o excesso de HTs podem prejudicar a altura final do indivíduo. Além da influência direta sobre o tecido ósseo e a cartilagem de crescimento, foi observado que a secreção espontânea de GH noturno é baixa nos indivíduos com hipo e hipertireoidismo (Cardoso *et al.*, 2014).

É fato que o hipotireoidismo congênito tem recebido muito mais atenção do que o hipertireoidismo, pela sua frequência e porque além de todas as implicações para o desenvolvimento neurológico e de outros sistemas e órgãos, ele retarda o crescimento e a maturidade óssea com conseqüente nanismo, pelo atraso na ossificação e alterações na morfologia da placa epifisária (Rivkees *et al.*, 1988). Em crianças, o hipotireoidismo pode resultar em baixa estatura, atraso no fechamento das epífises e no desenvolvimento dentário, displasia esquelética, com alterações nas placas de crescimento, as quais se tornam mais finas e com prejuízos na hipertrofia de condrócitos. Além disso, está associado às alterações séricas de vários marcadores ósseos, refletindo tanto reabsorção quanto formação óssea (Willians *et al.*, 1998; Yen, 2001; Gorka *et al.*, 2013).

Embora menos frequente que o hipotireoidismo, o hipertireoidismo congênito se não reconhecido e tratado também pode ter efeitos graves sobre o crescimento ósseo, particularmente nos primeiros dois anos de vida (Segni e Gorman, 2001). O hipertireoidismo na gestação também preocupa pelo fato de causar alterações graves não somente na mãe, como também no feto e no neonato (Fernandez, 2013). A principal causa de hipertireoidismo em mulheres é a doença de Graves, inclusive durante a gestação. Uma em cada 500 mulheres apresentam doença de Graves no período gestacional (Cooper, 2003) e esse número aumenta à medida que se inclui a avaliação do perfil sérico dos hormônios tireoidianos em gestantes. A doença de Graves deve ser reconhecida e controlada durante a gestação logo após o seu surgimento, a fim de prevenir o desenvolvimento de doenças ou alterações neonatais (Péter e Muzsnai, 2011). Elevados níveis de gonadotropina coriônica humana também podem causar hipertireoidismo durante a gestação pelo fato da gonadotropina apresentar estrutura semelhante à da tireotropina, podendo estimular a tireoide materna (Cooper, 2003).

No entanto, apesar dos hormônios, fatores de crescimento, genes e vias de sinalização que controlam o crescimento ósseo serem amplamente estudados, pouco se sabe sobre como esses fatores participam da gênese das alterações do crescimento ósseo decorrentes do hipertireoidismo materno e neonatal. O que se sabe é que ratos com hipotireoidismo, induzido durante o crescimento e imediatamente após a maturidade sexual, ou seja, com seis semanas de idade, apresentam, nas cartilagens de crescimento, redução da síntese de colágeno X, aumento da expressão do peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) e anormalidades da síntese de

proteoglicanos sulfatados. Já ratos com hipertireoidismo, também induzido durante o crescimento, apresentam redução do número de receptores para PTHrP nas cartilagens de crescimento (Stevens *et al.*, 2000).

Em filhotes de cães, o hipertireoidismo provoca aumento desproporcional da proliferação de células cartilaginosas e maturação óssea, com elevada atividade osteoblástica na metáfise. Porém, apesar do aumento inicial da taxa de crescimento celular, a estatura final é menor (Dott, 1923). De forma similar, a administração de tiroxina em ratos leva a aceleração prematura do crescimento ósseo (Simpson *et al.*, 1950).

Resultados preliminares desta equipe de pesquisa demonstraram, por histomorfometria, que o hipertireoidismo materno em ratas resulta em redução significativa da formação e do crescimento ósseo endocondral na prole ao nascimento e ao desmame, caracterizado por redução dos membros, aumento da espessura da placa epifisária e aumento da porcentagem de osso trabecular e que estas alterações podem ser reversíveis 20 dias após o desmame (Maia *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 2

Efeito do excesso de tiroxina materna sobre o perfil proliferativo e angiogênico das cartilagens de crescimento de ratos ao nascimento e desmame

Resumo

O objetivo deste estudo foi elucidar os efeitos do excesso da tiroxina materna sob o perfil proliferativo e angiogênico das cartilagens de crescimento de ratos neonatos e com 20 dias de idade (desmame). Foram utilizadas 16 ratas *Wistar* adultas distribuídas igualmente em dois grupos, tratado com tiroxina e controle. O grupo tratado recebeu diariamente L-tiroxina, por via oral, durante a gestação e a lactação e o grupo controle recebeu água destilada como placebo. Ao nascimento e aos 20 dias de idade, foi obtida a média do peso corporal dos filhotes. Ao desmame, foi colhido o plasma das mães e dos ratos com 20 dias para dosagem de T₄ livre. Foram colhidos as tireoides e os fêmures direitos dos neonatos e dos ratos com 20 dias para análise histomorfométrica. A largura e o comprimento dos fêmures foram mensurados. Nas epífises distais foram realizadas avaliações histomorfométrica e imunoistoquímica do perfil proliferativo pela expressão de CDC-47 e do perfil angiogênico pela expressão de VEGF, Flk-1, Ang2 e Tie2. Dos fêmures esquerdos, foram removidos fragmentos da epífise cartilaginosa dos neonatos e da cartilagem articular dos animais com 20 dias para avaliação da expressão dos transcritos gênicos para VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2 pela técnica de RT-PCR em tempo real. As médias entre grupos foram comparadas pelo teste T. A dosagem de T₄ livre foi significativamente mais elevada somente nas ratas tratadas lactantes. Mas, a altura do epitélio folicular da tireoide dos filhotes foi menor no grupo tratado em todas as idades em relação ao grupo controle (P<0,05). O excesso de tiroxina materna reduziu, na prole, o peso corporal e o comprimento do fêmur, mas aumentou a espessura das suas trabéculas ósseas e alterou a espessura das zonas da placa epifisária (P<0,05). Além disso, o excesso de tiroxina materna reduziu a proliferação celular e a expressão de VEGF nas cartilagens de crescimento dos neonatos e dos animais com 20 dias (P<0,05). Houve também redução da expressão imunoistoquímica de Tie2 na epífise cartilaginosa dos neonatos e de Flk-1 na cartilagem articular dos ratos com 20 dias. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de Ang2 entre grupos. Conclui-se que o excesso de tiroxina materna durante a gestação e lactação reduz o crescimento ósseo endocondral da prole pelo decréscimo da taxa de proliferação e da expressão de VEGF e dos receptores Flk-1 e Tie2 nas cartilagens de ratos em crescimento sem, no entanto, alterar a expressão gênica de Ang 1 e 2.

Palavras-chave: hipertireoidismo materno, cartilagem de crescimento, angiogênese, ratos.

Introdução

A tiroxina (T₄) e a triiodotironina (T₃) são essenciais para a formação e o crescimento ósseos endocondrais, bem como para os metabolismos ósseo e mineral (Mundy *et al.*, 1976; Bassett e Williams, 2003; Serakides *et al.*, 2004). Desta forma, tanto o hipotireoidismo quanto o hipertireoidismo podem cursar com várias alterações ósseas (Serakides *et al.*, 2004; Boelaert e Franklyn, 2005).

Em mulheres, as disfunções tireoidianas são frequentes e vem sendo cada vez mais diagnosticadas em gestantes (Fernández, 2013; Nazarpour *et al.*, 2015). No hipertireoidismo materno, os tecidos fetais são expostos a quantidades excessivas de hormônios tireoidianos (Cooper, 2003) que podem prejudicar a capacidade do feto e do neonato em regular seus níveis de TSH e de T₄ (Patel *et al.*, 2011).

Resultados preliminares das pesquisas desenvolvidas por nossa equipe demonstraram que a prole de ratas com hipertireoidismo apresenta, ao nascimento e ao desmame, redução significativa da formação e do crescimento ósseos endocondrais, respectivamente. Além disso, foi observado na prole das ratas tratadas com tiroxina, aumento na espessura da placa epifisária com aumento da zona hipertrófica (Maia *et al.*, 2016). Uma das hipóteses formuladas é que haja redução do crescimento ósseo por insuficiência da invasão vascular das cartilagens de crescimento.

A angiogênese é crucial no processo de ossificação endocondral que ocorre na vida pré-natal e pós-natal, na qual há conversão progressiva da cartilagem em osso por meio da interação funcional entre os condroblastos e as células do sistema vascular (Maes, 2013). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é expresso nas cartilagens de crescimento, principalmente nos condrocitos hipertróficos (Ferrara e Davis-Smyth, 1997) e atua pela ligação aos seus respectivos receptores tirosina quinase, Flt-1(VEGFR1) e Flk-1/KDR (VEGFR2) (Dai e Rabie, 2007), sendo essencial para o desenvolvimento do esqueleto (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Yang *et al.*, 2012). A inativação do VEGF suprime a invasão de vasos sanguíneos com redução da formação de osso trabecular, expansão da zona hipertrófica de condrocitos e alteração na diferenciação dos condroblastos (Gerber *et al.*, 1999).

Além do VEGF, outros reguladores também são importantes para a angiogênese e maturação dos vasos sanguíneos, como a angiopoetina-1 (Ang1) e angiopoetina-2 (Ang2). Estes são peptídeos altamente homólogos que se ligam com grande afinidade ao receptor tirosina-quinase (Tie2) (Maisonpierre *et al.*, 1997). A Ang1 e a Ang2 são co-expressas com o VEGF em locais de ossificação endocondral do molde cartilaginoso e sua expressão aumenta com a diferenciação dos condroblastos (Horner *et al.*, 2001).

O objetivo deste estudo foi esclarecer os efeitos do excesso de tiroxina materna sobre as cartilagens de crescimento dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, a partir da avaliação do perfil proliferativo, baseado na expressão de CDC-47 e do perfil angiogênico, pela expressão de VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo n.º 47/2014) (Anexo 1)

Acasalamento e administração de tiroxina

Foram utilizadas 16 ratas *Wistar* com dois meses de idade (Figura 6), alojadas em caixas plásticas (quatro ratas/caixa) e recebendo ração comercial e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após adaptação de duas semanas, todas as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para determinar a fase do ciclo estral (Marcondes *et al.*, 2002). As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de duas fêmeas para cada macho. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal e esse dia foi considerado dia 0 de gestação (Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Após a cópula, as fêmeas foram mantidas individualmente em caixas plásticas.

A partir do primeiro dia de gestação, as ratas foram distribuídas nos grupos tratado e controle, com oito animais cada. As ratas tratadas receberam a administração diária de L-tiroxina (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 5 mL de água destilada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Serakides *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2013) (Anexo 2), por todo período da gestação e lactação. Para as fêmeas

controle, foi fornecido, como placebo, 5 mL de água destilada, por sonda oro-gástrica, durante todo o período experimental.

Da prole de cada rata foram separados e eutanasiados dois animais, sendo um ao nascimento e o outro ao desmame, ou seja, aos 20 dias. Dessa forma foram constituídos quatro grupos: 1) neonatos de ratas tratadas com L-tiroxina (n=8), 2) neonatos de ratas controle (n=8), 3) ratos com 20 dias, filhos de ratas tratadas com L-tiroxina (n=8) e 4) ratos com 20 dias, filhos de ratas controle (n=8). A eutanásia foi realizada por punção cardíaca precedida por anestesia com xilazina (40 mg/Kg; Vetril, Brasil) e quetamina (10 mg/Kg; Konig, Brasil).

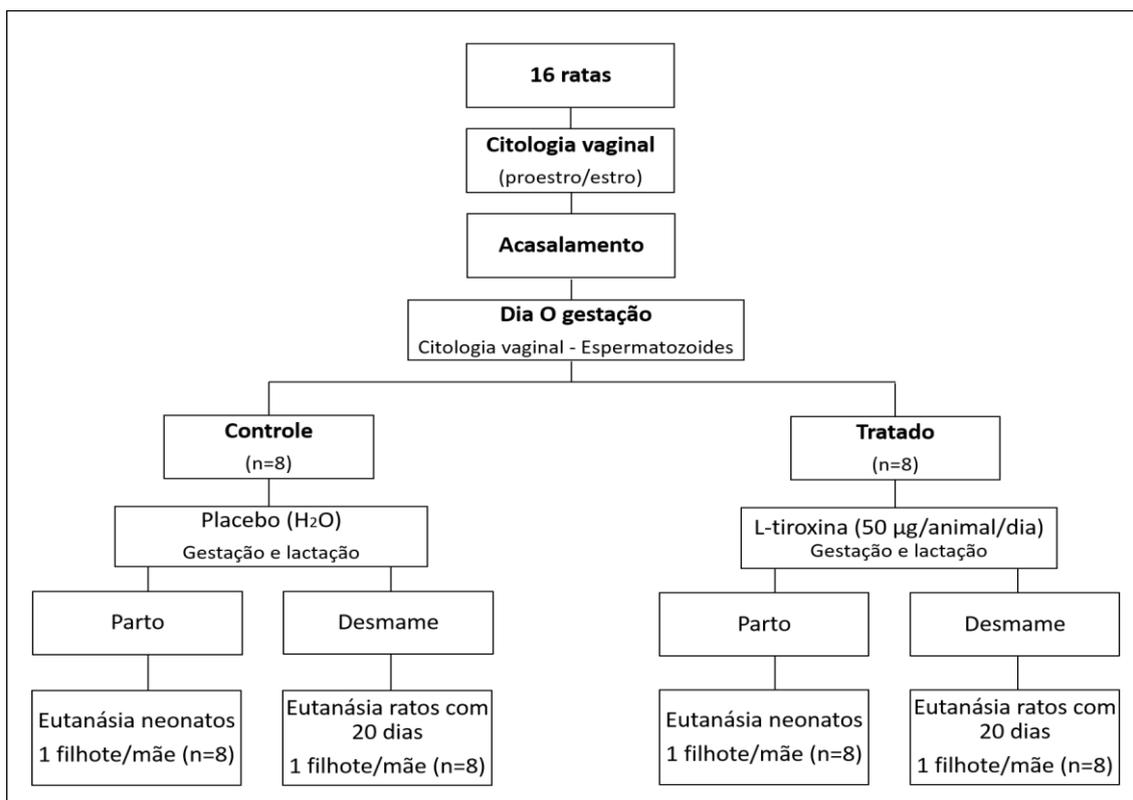


Figura 6. Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo e seleção da prole nos grupos controle e tratado com L-tiroxina.

Dosagem plasmática de T₄ livre

Ao desmame, o sangue das ratas em lactação e dos ratos com 20 dias de idade foi colhido por punção cardíaca em tubos contendo heparina seguido de centrifugação para obtenção do plasma e armazenado a -20°C para dosagem de T₄ livre. Foi realizada a técnica de ELISA de quimioluminescência (IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA) (sensibilidade: 0,4 ng/dl) em sistema totalmente automático (Serakides *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2008).

Processamento e análise histomorfométrica da tireoide

As tireoides dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade foram dissecadas, fixadas em formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico e processadas de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4µm foram coradas pela técnica de HE para avaliação histomorfométrica.

Foram mensurados, ao acaso, em cada tireoide, os diâmetros maior e menor de 30 folículos, obtendo-se a média destas medidas. Esta mensuração foi realizada em uma secção histológica por animal com auxílio de uma ocular com régua, acoplada ao microscópio em objetiva de 40x. A altura do epitélio foi mensurada em 20 folículos. Em cada folículo, foram mensurados quatro pontos distintos e equidistantes, obtendo-se o valor médio das quatro medidas. Esta mensuração foi realizada com auxílio de uma ocular com régua acoplada ao microscópio em objetiva de 100x. Os valores obtidos para o diâmetro e altura do epitélio foram transformados em micrômetros utilizando-se a escala de uma lâmina micrométrica (Serakides *et al.*, 2000).

Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur

A média do peso corporal (g) foi obtida ao nascimento e aos 20 dias de idade em todos os grupos. Tanto nos neonatos quanto nos animais com 20 dias, a mensuração do fêmur direito foi realizada com auxílio de régua milimetrada (paquímetro), sendo o comprimento medido da epífise proximal até a epífise distal, enquanto a largura foi medida no meio da diáfise do osso.

Processamento histológico e análise histomorfométrica dos ossos

De todos os animais dos quatro grupos experimentais, foram dissecados e colhidos o fêmur direito para processamento histológico. As amostras foram fixadas em formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico por no máximo 48 horas. As amostras foram submetidas à descalcificação, pela utilização de duas soluções diferentes. Na primeira solução, constituída por EDTA (0,7 g), tartarato de sódio e potássio (8 g), tartarato de sódio (0,14 g), ácido clorídrico (120 mL) e água destilada (900 mL) os ossos permaneceram por 24h. Posteriormente, os ossos foram colocados na segunda solução de EDTA a 10% dissolvido em água destilada, com troca da solução uma vez por semana, até completa descalcificação (Pitol *et al.*, 2007) (Anexo 3), ou seja, por 3 dias para os ossos dos neonatos e por 15 dias para os ossos dos ratos com 20 dias de idade. Completada a descalcificação, os ossos foram seccionados longitudinalmente, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (Anexo 4) e submetidos à microtomia para obtenção de secções histológicas de 4µm. Para análise histomorfométrica, as secções histológicas foram coradas pela técnica da HE (Anexo 5).

No fêmur dos neonatos de ambos os grupos, foi mensurada a porcentagem de tecido ósseo trabecular na metáfise distal, em um campo que englobou toda a extensão da secção histológica. A porcentagem foi determinada com auxílio de uma grátula de 121 pontos acoplada a ocular de um microscópio óptico na objetiva de 10x. Na região metafisária foi medida a espessura de 10 trabéculas ósseas em três pontos equidistantes de cada trabécula, com o auxílio de uma ocular com régua, acoplada ao microscópio, em dois campos na objetiva de 40x. Nos neonatos, devido a presença de uma epífise totalmente cartilaginosa sem distinção do limite com a placa epifisária, foi realizada a mensuração da espessura de toda a epífise cartilaginosa e a espessura apenas da zona hipertrófica da placa epifisária, facilmente distinta e individualizada das demais zonas da placa. Os valores obtidos foram posteriormente transformados em micrômetros utilizando-se a escala de uma lâmina micrométrica.

Nos ratos com 20 dias de idade, foi determinada a porcentagem de tecido ósseo trabecular tanto na epífise quanto na metáfise distal do fêmur em três campos na objetiva de 20x. Estas avaliações foram realizadas com auxílio de uma grátula com 121 pontos acoplada a ocular do microscópio óptico. A espessura de 20 trabéculas ósseas em quatro campos da regiões

epifisárias e metafisárias, abaixo da placa epifisária, foi medida em três pontos equidistantes de cada trabécula, na objetiva de 40x. As espessuras das cartilagens articulares e das placas epifisárias, bem como das zonas de repouso, proliferativa e hipertrófica da placa epifisária foram determinadas pela média das espessuras tomadas em 15 pontos equidistantes na objetiva de 10x. Estas avaliações foram realizadas com o auxílio de uma ocular com régua, acoplada ao microscópio. Os valores obtidos foram transformados em micrômetros utilizando-se a escala de uma lâmina milimétrica.

Análise imunoistoquímica das cartilagens de crescimento

Secções histológicas da epífise e metáfise distais dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade foram colocadas sob lâminas gelatinizadas (Bloise *et al.*, 2009) (Anexo 6). As secções histológicas foram submetidas à imunoistoquímica. Analisou-se a atividade proliferativa com o anticorpo anti-CDC-47 (47DC14; Neomarkers, Fremont, CA, USA, diluição 1:100 nos ossos dos neonatos e 1:50 nos ossos de ratos com 20 dias). O perfil angiogênico foi estudado com o uso dos anticorpos anti-VEGF (sc-152; Santa Cruz, CA, USA, diluição 1:50), anti-Flk-1 (sc-6251; Santa Cruz, CA, USA, diluição 1:50), anti-Ang2 (sc-14403; Santa Cruz, CA, USA diluição 1:50) e anti-Tie2 (sc-31268; Santa Cruz, CA, USA, diluição 1:50).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Dako, St Louis, MO, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C. As secções histológicas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos em cada uma das etapas seguintes, bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Dako, St Louis, MO, USA) e estreptavidina peroxidase, sendo a incubação com anticorpo secundário por 45 minutos (Dako, St Louis, MO, USA). O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (Dako, St Louis, MO, USA). As secções foram contra-coradas com *methy green* para o CDC-47 e com hematoxilina de Harris para os demais anticorpos (Anexo 7). O controle negativo para todos os anticorpos foi obtido pela substituição do anticorpo primário por IgG de rato. Secções histológicas de baço de rato foram utilizadas como controle positivo para o CDC-47 e para os fatores angiogênicos, com exceção da angiopoetina, para a qual foi utilizado ovário de peixe (Santos *et al.*, 2015).

As análises imunoistoquímicas foram realizadas em toda a extensão das cartilagens de crescimento do fêmur dos grupos controle e tratado, sendo ainda avaliada isoladamente na zona hipertrófica da placa epifisária. As células imunomarcadas foram avaliadas em 10 campos/secção histológica em objetiva de 40x por meio de imagens capturadas pelo microscópio Leica DM 4000B com câmera digital acoplada. A porcentagem de células CDC-47 positivas foi determinada considerando o número total de células por campo, usando o *software* Image Pro-plus (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA). Para os fatores angiogênicos, determinou-se a área e a intensidade de imunomarcagem em *pixels* usando o *software* WCIF Image J® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA). A avaliação foi realizada tanto na cartilagem articular quanto na placa epifisária do fêmur, obtendo-se a média em três secções histológicas por animal. Cada um dos fatores foi avaliado na zona superficial, média e profunda da cartilagem articular e também nas zonas de repouso, proliferativa e hipertrófica da placa epifisária.

Expressão de transcritos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento

A quantificação relativa da expressão de VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2 foi realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real em toda a epífise cartilaginosa do fêmur esquerdo dos neonatos e fragmentos da cartilagem articular do fêmur esquerdo dos ratos com 20 dias de idade. Essas cartilagens foram coletadas em trizol, congelados imediatamente em nitrogênio líquido por 2h e posteriormente armazenadas a -80°C. A extração do mRNA da cartilagem foi realizada pelo uso do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância

por espectrofotometria a 260/280nm (Anexo 8). Para as reações de transcrição reversa foi utilizado Kit comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis Super Mix qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sendo utilizados 10µL de 2x RT reaction MIX, 2µL de RT enzyme MIX, 6µL de água DEPC livre de RNase e 2µL de RNA contendo 0,5µg de RNA/µL para um volume final de 20µL. A transcrição reversa foi realizada em um termociclador com a programação de 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1µL de RNase H por microtubo e novamente colocado no termociclador por 20 minutos a 37°C (Anexo 9). Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 2,5 µL de cDNA, 1,0 µL de cada iniciador, 1,0 µL de ROX, 7 µL de água DEPC livre de RNase e 12,5µL do reagente Sybr Green em um volume final de 25 µL de reação no aparelho *7500 Real-Time PCR System*. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos (Anexo 10). Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de beta actina (*Actina-β*) *Rattus norvegicus*.

Tabela 1. Iniciadores dos transcritos gênicos delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus*

Transcritos gênicos	Iniciadores	Nº de acesso
VEGF	Forward primer GCCCAGACGGGGTGGAGAGT Reverse primer AGGGTTGGCCAGGCTGGGAA	NM_001110336.1
Flk-1	Forward primer GTCCGCCGACACTGCTGCAA Reverse primer CTCGCGCTGGCACAGATGCT	NM_013062.1
Ang1	Forward primer GTCAGCCTTTGCACAAAAGAAGTTT Reverse primer TCCAGCCCCTGTGGAAATCT	NM_053546.1
Ang2	Foward: TGCCTGCAAGTTTGCTGAAC Reverse: GGCTGAGCCAAGACAAGAT	NM_134454.1
Tie2	Foward: CGGCTTAGTTCTCTGTGGAGTC Reverse: GGCATCAGACACAAGAGGTAGG	NM_001105737.1
Actina-β	Forward primer TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT Reverse primer CGACGAGCGCAGCGATATCGT	NM_031144.2

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada a comparação das médias pelo teste t de *student* pelo pacote computacional GraphPad Prism 6. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$ (Sampaio, 2002).

Resultados

Concentração plasmática de tiroxina e histomorfometria da tireoide

O tratamento com tiroxina elevou significativamente as concentrações plasmáticas de T_4 livre nas ratas com 20 dias de lactação quando comparadas com as ratas do grupo controle. Além disso, as ratas tratadas com L-tiroxina exibiram sinais clínicos caracterizados por hiperatividade

e agressividade. Nos ratos com 20 dias de idade, não foi observada diferença significativa entre os grupos com relação às concentrações plasmáticas de T₄ livre (Figura 7).

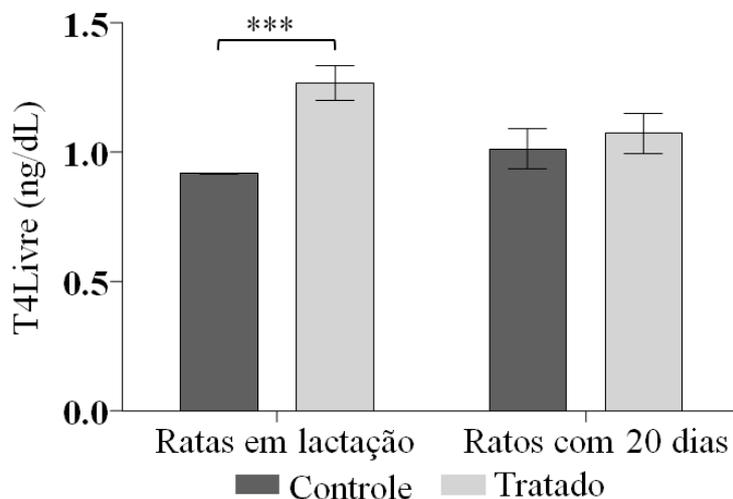


Figura 7. Concentrações plasmáticas de T₄ livre (média±SD) de ratas em lactação controle e tratada com L-tiroxina e de ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratada com L-tiroxina. Concentração plasmática de T₄ livre elevada nas ratas tratadas com tiroxina em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$) e semelhantes entre ratos com 20 dias de idade de ratas controle e tratadas com L-tiroxina ($p > 0,05$).

As tireoides dos neonatos e dos ratos com 20 dias de todos os grupos apresentaram folicúlos variando de redondos a ovais e com diâmetros variados. Nos grupos controle, os folicúlos eram revestidos por epitélio predominantemente cuboidal e preenchidos por coloide denso e por vezes vacuolizado, enquanto que nos filhotes das ratas tratadas com L-tiroxina, foram observados diversos folicúlos revestidos predominantemente por epitélio achatado. Pela morfometria, não foram observadas diferenças significativas no diâmetro dos folicúlos entre os grupos tratados e controle (Figura 8). No entanto, os neonatos e os ratos com 20 dias de idade dos grupos tratados, apresentaram redução significativa da altura do epitélio folicular quando comparados com o grupo controle da mesma idade (Figura 8).

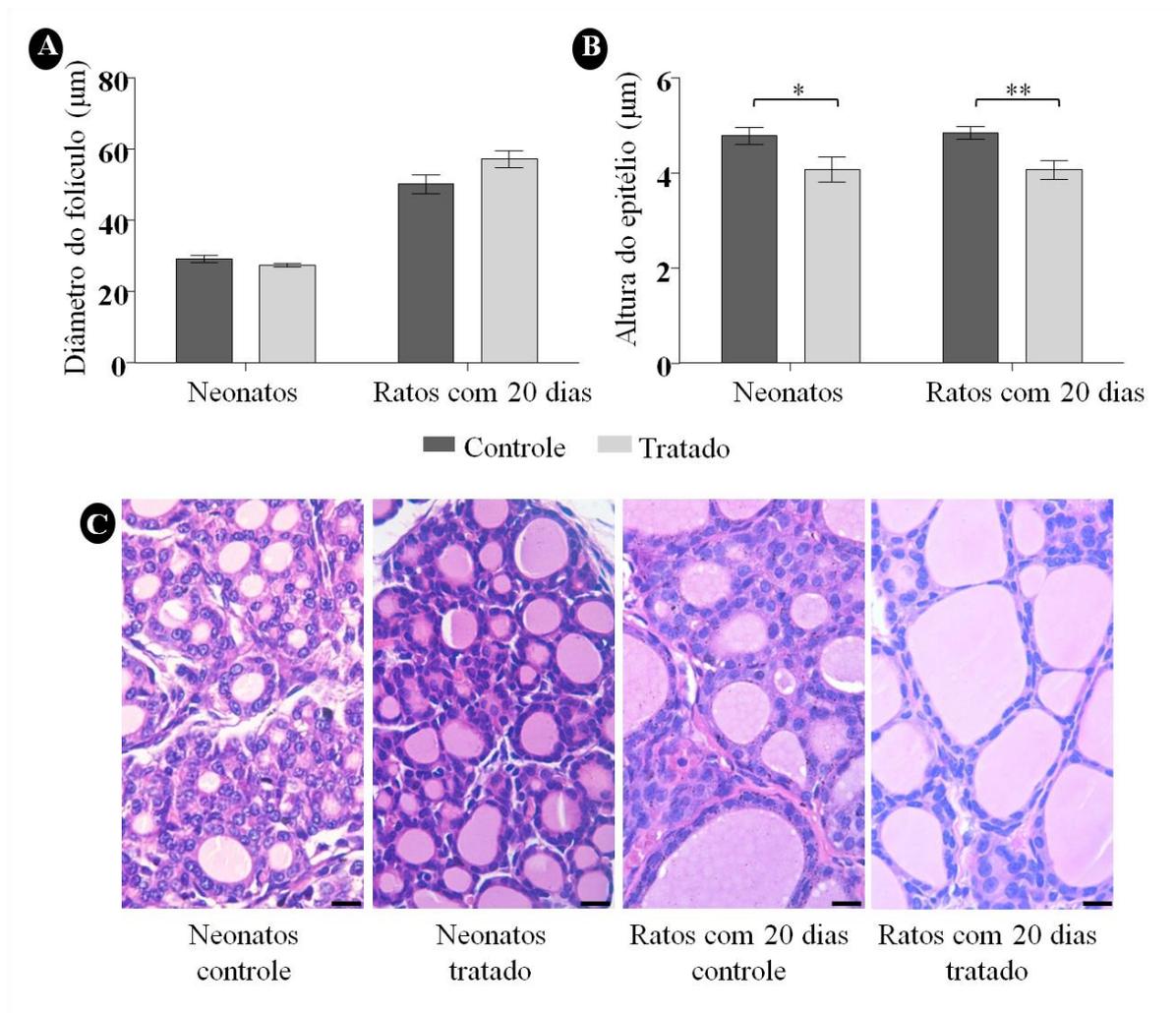


Figura 8. Histomorfometria da tireoide (média±SD) dos neonatos e ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Diâmetro folicular (µm) semelhante entre grupos ($p>0,05$). B e C) Redução da altura do epitélio folicular (µm) da tireoide dos neonatos ($P<0,05$) e dos ratos com 20 dias de idade do grupo tratado em comparação ao controle ($P<0,01$). HE, barra:13,8 µm.

Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur

Os filhotes das ratas tratadas com tiroxina, ao nascimento e aos 20 dias de idade, apresentaram redução significativa do peso corporal (Figura 9A) e do comprimento do fêmur (Figura 9B) quando comparados ao grupo controle. Entretanto, a largura do fêmur não diferiu significativamente entre grupos (Figura 9C).

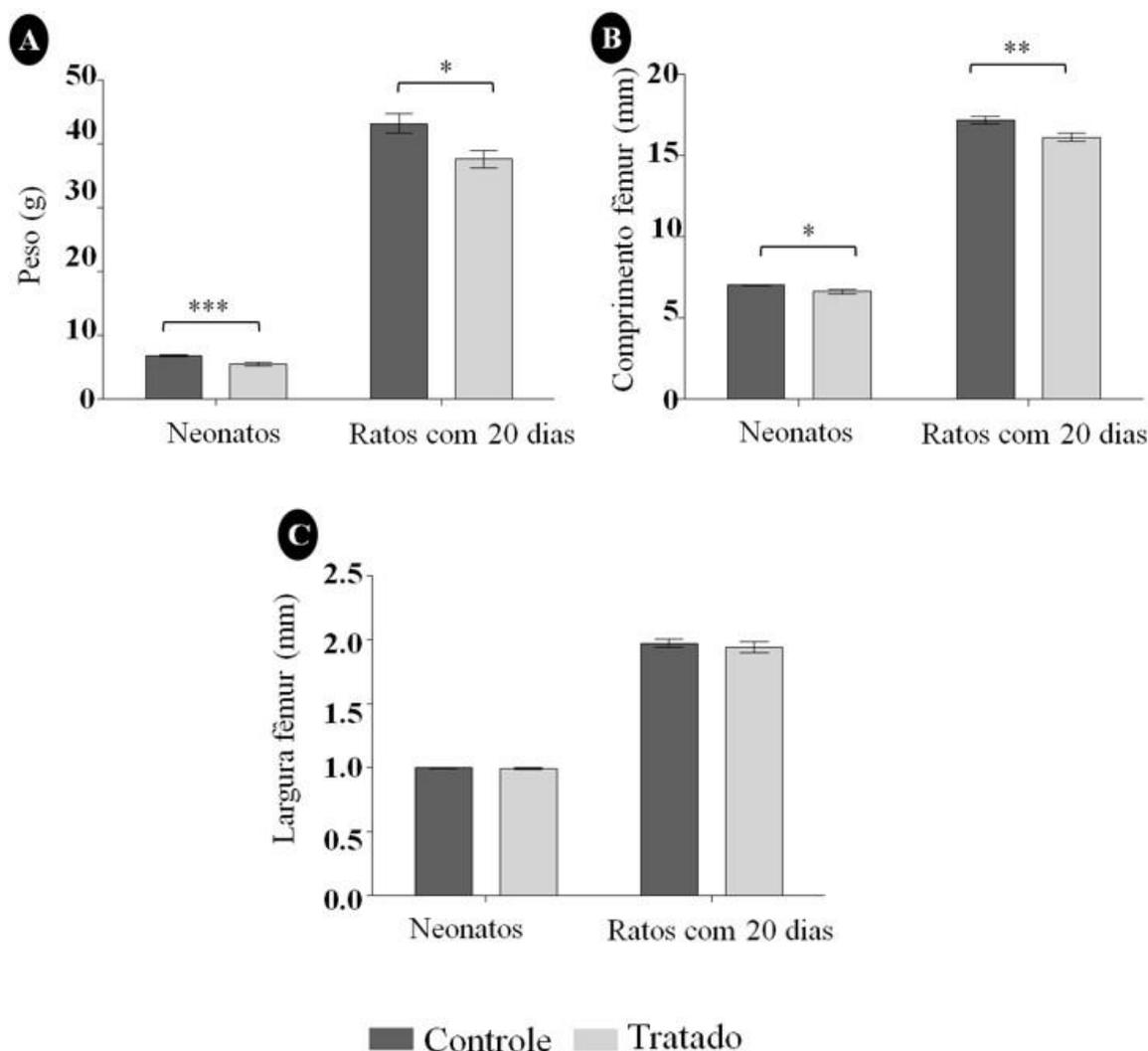


Figura 9. Peso corporal (g) e comprimento e largura (mm) do fêmur dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Redução do peso dos neonatos ($P < 0,001$) e dos ratos com 20 dias ($P < 0,05$) do grupo tratado em comparação ao controle. B) Redução do comprimento do fêmur dos neonatos ($P < 0,05$) e dos ratos com 20 dias ($P < 0,01$) do grupo tratado em comparação ao controle. C) Largura semelhante do fêmur dos neonatos e dos ratos com 20 dias dos grupos controle e tratado ($p > 0,05$).

Histomorfometria óssea

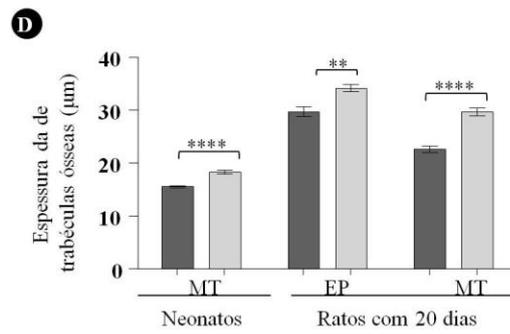
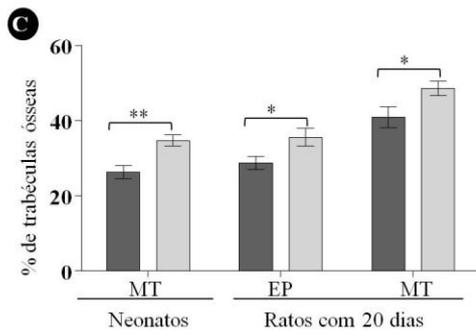
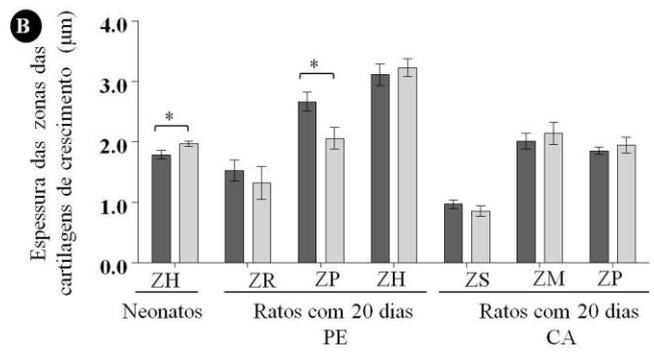
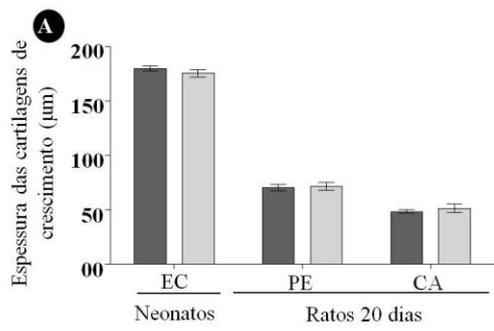
Nos neonatos, independentemente do grupo, a epífise distal do fêmur ainda se apresentava totalmente cartilaginosa, com ausência dos centros de ossificação secundários e sem distinção dos limites entre a cartilagem articular e a placa epifisária. Desta forma, optou-se por realizar a mensuração da espessura de toda a epífise cartilaginosa e isoladamente da zona hipertrófica da placa epifisária. Não foi observada diferença significativa na espessura da epífise cartilaginosa entre grupos, entretanto a espessura da zona hipertrófica foi significativamente maior nos animais do grupo tratado em comparação ao grupo controle (Figura 10 A, B e E).

Nos animais com 20 dias de idade não foi observada diferença significativa na espessura da cartilagem articular e da placa epifisária, bem como das zonas de repouso e hipertrófica da

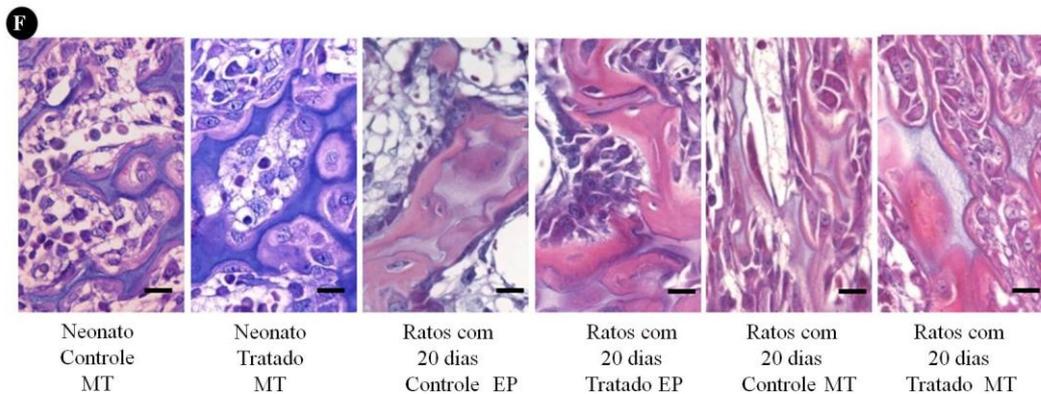
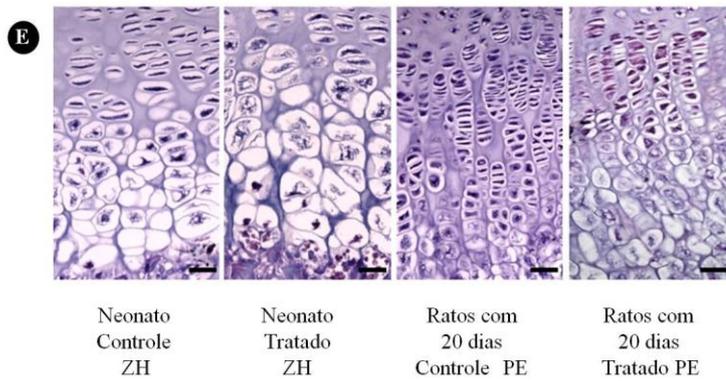
placa. No entanto, a espessura da zona proliferativa da placa epifisária foi significativamente menor nos animais do grupo tratado comparada a do grupo controle (Figura 10 A, B e E).

Nos neonatos e nos ratos com 20 dias do grupo tratado, as trabéculas ósseas do fêmur apresentavam-se mais espessas e confluentes. Os osteoblastos eram predominantemente volumosos, cuboidais e com núcleos grandes. Ao redor das trabéculas ósseas havia uma ou várias camadas de osteoblastos (focos de hiperplasia osteoblástica). Os osteócitos, em sua maioria, mostravam-se ativos, com núcleos grandes e lacunas alargadas. Confirmando a análise morfológica, a espessura das trabéculas ósseas e a porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífise e metáfise do fêmur dos animais com 20 dias, e na metáfise dos neonatos foram maiores no grupo tratado, quando comparadas aos mesmos parâmetros do grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 10 C, D e F).

Figura 10. Histomorfometria óssea da região distal dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Espessura semelhante das cartilagens de crescimento dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias dos grupos controle e tratado ($p>0,05$). B) Aumento da zona hipertrófica da placa epifisária dos neonatos ($P<0,05$) e redução da zona proliferativa da placa epifisária dos ratos com 20 dias do grupo tratado em comparação ao controle ($P<0,05$). C) Aumento da porcentagem de trabéculas ósseas metafisárias dos fêmures de neonatos ($P<0,01$) e de trabéculas ósseas epifisárias e metafisárias dos fêmures dos ratos com 20 dias do grupo tratado em comparação ao controle ($P<0,05$). D) Aumento na espessura das trabéculas ósseas metafisárias dos fêmures dos neonatos ($P<0,0001$) e das trabéculas ósseas epifisárias ($P<0,01$) e metafisárias ($P<0,0001$) dos fêmures dos ratos com 20 dias de idade. E) Fotomicroscopia demonstrando aumento da espessura da zona hipertrófica e redução da zona proliferativa da placa epifisária nos neonatos e ratos com 20 dias, respectivamente, dos grupos tratados em comparação ao controle. HE, barra: 30 μm . F) Fotomicroscopia das trabéculas ósseas femorais na metáfise dos neonatos e epífise e metáfise dos ratos com 20 dias de idade com trabéculas ósseas revestidas por uma camada de osteoblastos cuboidais no grupo tratado em comparação ao controle, que apresenta menor espessura da zona hipertrófica e das trabéculas ósseas revestidas por uma camada de osteoblastos achatados. HE, barra: 13.8 μm . CA: cartilagem articular; EC: epífise cartilaginosa; EP: epífise; PE: placa epifisária; MT: metáfise; ZR: zona de repouso; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; ZS: zona superficial; ZM: zona média; ZP: zona profunda.



■ Controle ■ Tratado



Expressão imunoistoquímica de CDC-47, VEGF, Flk-1, Ang2 e Tie2.

A taxa de proliferação, caracterizada pela expressão de CDC-47, foi significativamente menor tanto nos condrócitos da epífise cartilaginosa dos fêmures dos neonatos, quanto na cartilagem articular e na placa epifisária dos fêmures dos ratos com 20 dias de idade, quando comparados aos respectivos controles ($p < 0,05$; Figura 11A e B).

A análise imunoistoquímica da expressão dos fatores angiogênicos revelou que os neonatos das ratas tratadas com tiroxina apresentaram significativa redução na área e na intensidade de expressão do VEGF na epífise cartilaginosa e na zona hipertrófica da placa epifisária, em comparação ao controle. Nos ratos com 20 dias de idade do grupo tratado, foi observada redução apenas na área de marcação do VEGF em toda a placa epifisária e na zona hipertrófica. Não houve diferença significativa entre grupos com relação à expressão do VEGF na cartilagem articular (Figura 12A e B).

A expressão de Flk-1 foi similar em ambos os grupos ao nascimento (Figura 13A e B). Nos ratos com 20 dias, não houve imunoexpressão de Flk-1 tanto na cartilagem articular quanto na placa epifisária do fêmur distal (dados não demonstrados).

Não foi observada imunoexpressão de Ang1 nas cartilagens de crescimento dos grupos tratado e controle tanto nos neonatos quanto nos animais com 20 dias (dados não demonstrados). No entanto, houve expressão do receptor da angiopoetina, Tie2, apenas nos neonatos. Os neonatos do grupo tratado apresentaram epífises cartilaginosas do fêmur com menor área de imunoexpressão e com menor intensidade de Tie2 em comparação ao controle (Figura 14A e B).

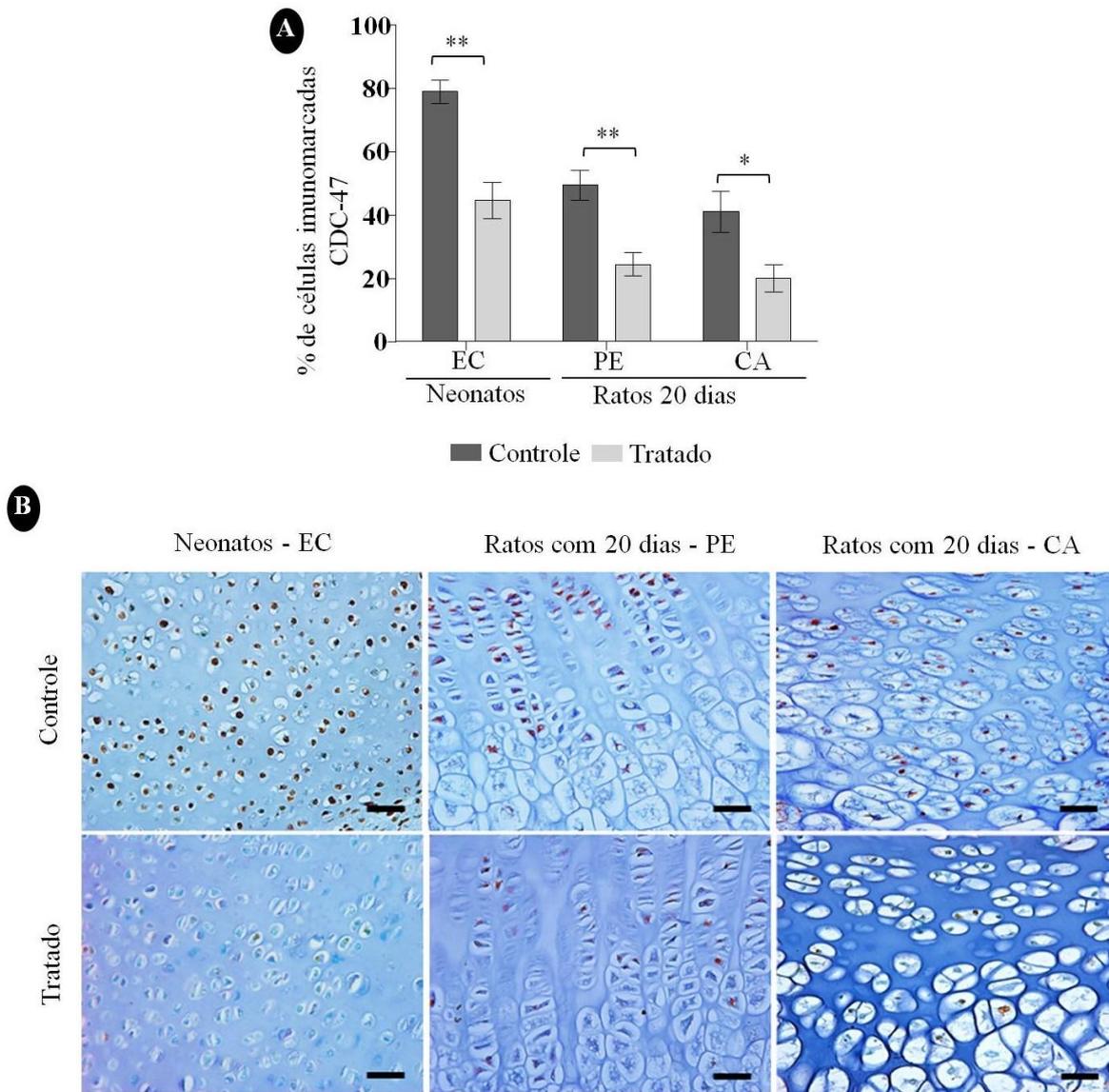
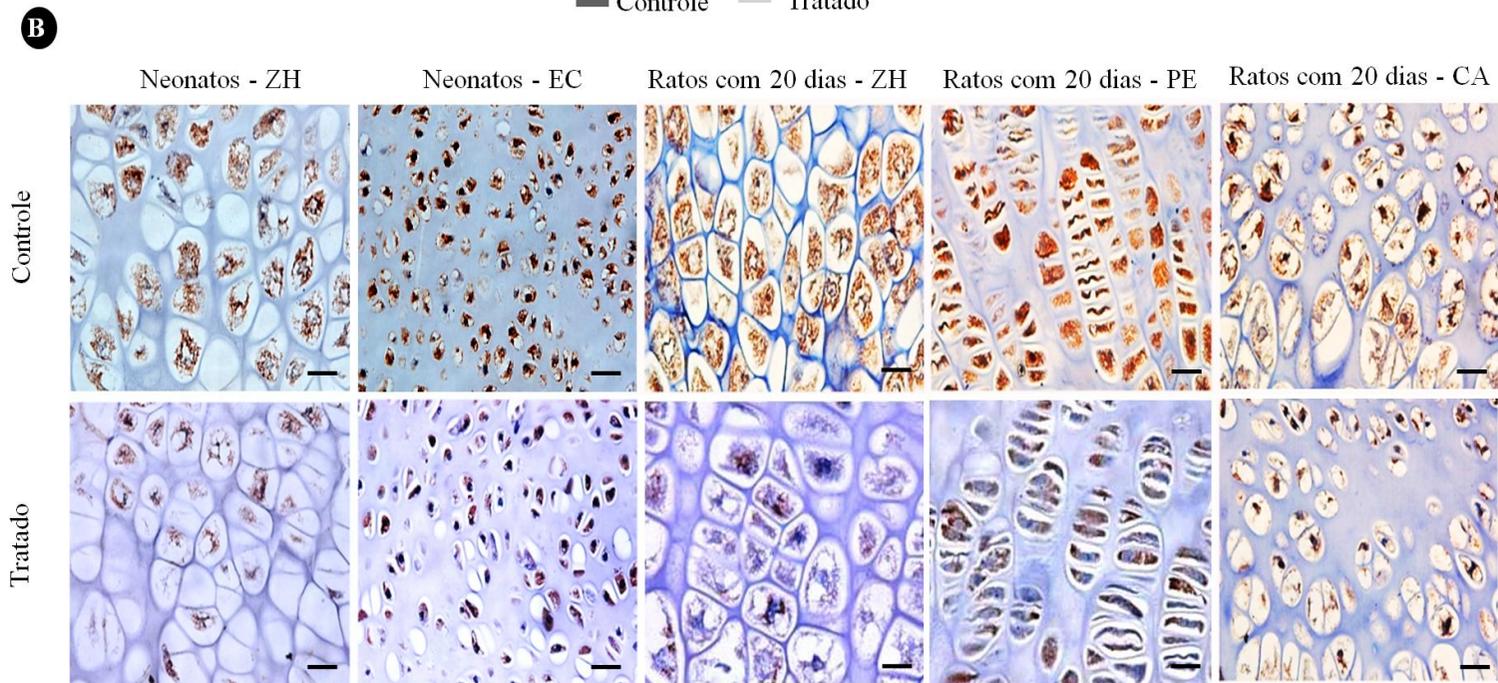
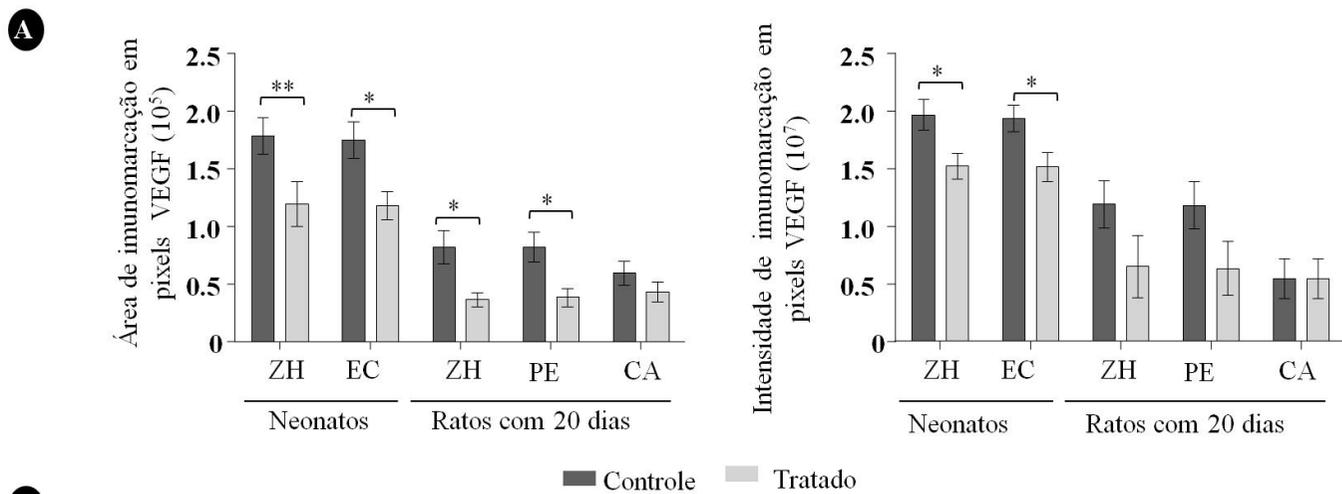


Figura 11. Expressão imunistoquímica de CDC-47 nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Redução da porcentagem de células imunomarcadas na epífise cartilaginosa dos fêmures de neonatos ($P < 0,001$) e na placa epifisária ($P < 0,001$) e cartilagem articular ($P < 0,05$) dos fêmures dos ratos com 20 dias de idade do grupo tratado em comparação ao controle. B) Fotomicroscopia da epífise cartilaginosa dos fêmures de neonatos e da placa epifisária e cartilagem articular dos fêmures de ratos com 20 dias dos grupos controle e tratado, demonstrando maior número de células positivas para CDC-47, com núcleo corado de marrom, em todas as regiões examinadas tanto nos neonatos quanto nos ratos com 20 dias de idade do grupo tratados em comparação ao controle (estreptavidina-biotina-peroxidase, *metyl green*, barra: 40µm). EC: epífise cartilaginosa; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular.

Figura 12. Expressão imunoistoquímica de VEGF nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos neonatos e dos ratos com 20 dias de idade, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Redução da área e intensidade de expressão do VEGF na epífise cartilaginosa e na zona hipertrófica da placa epifisária dos neonatos ($P < 0,001$) e redução da área de expressão do VEGF na placa epifisária e respectiva zona hipertrófica de ratos com 20 dias do grupo tratado em comparação ao controle ($P < 0,05$). B) Fotomicroscopia da epífise cartilaginosa dos fêmures de neonatos e da placa epifisária e cartilagem articular dos fêmures de ratos com 20 dias dos grupos controle e tratado, demonstrando imunoexpressão citoplasmática de VEGF, em marrom, ilustrando os resultados evidenciados na letra A. (estreptavidina-biotina-peroxidase, hematoxilina de Harris, barra: $30\mu\text{m}$. EC: epífise cartilaginosa; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular; ZH: zona hipertrófica.



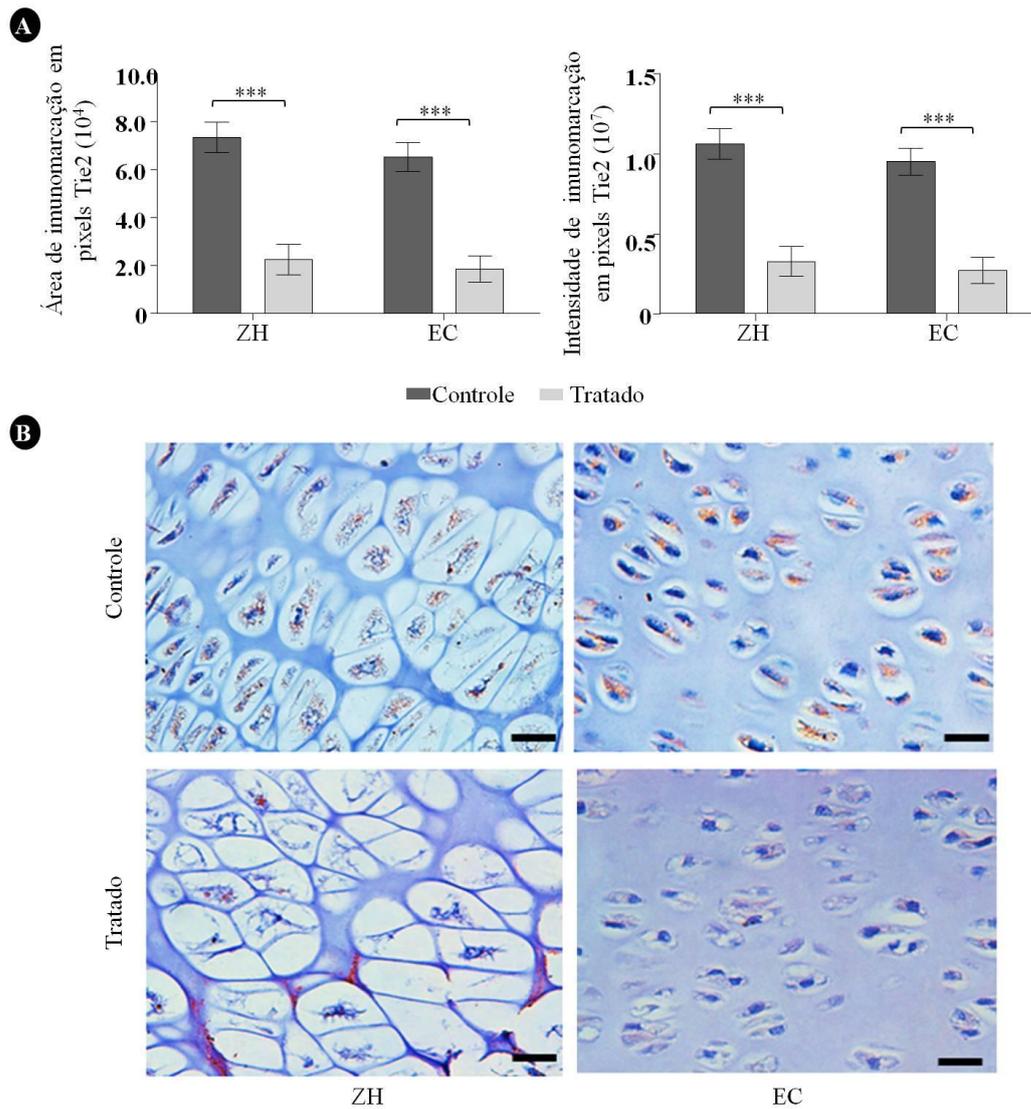


Figura 14. Expressão imunoistoquímica de Tie2 nas epífises cartilaginosas da porção distal do fêmur dos neonatos, filhos de mães controle e tratadas com L-tiroxina. A) Redução intensa da área e da intensidade de expressão de Tie2 na zona hipertrófica da placa epifisária e na epífise cartilaginosa da dos fêmures de neonatos do grupo tratado em comparação ao grupo controle ($P < 0.0001$). B) Fotomicroscopia da zona hipertrófica da placa epifisária e na epífise cartilaginosa dos fêmures de neonatos com imunoexpressão citoplasmática de Tie2, em marrom, ilustrando os resultados apresentados na letra A. (estreptavidina-biotina-peroxidase, hematoxilina de Harris, barra: $40\mu\text{m}$). EC: epífise cartilaginosa; ZH: zona hipertrófica.

Expressão dos transcritos gênicos para VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2

Os neonatos do grupo tratado apresentaram redução significativa da expressão de mRNA para VEGF (Figura 15) e os ratos com 20 dias do grupo tratado apresentaram redução significativa da expressão de mRNA para VEGF e FLK-1. Não foi observada diferença significativa entre grupos com relação à expressão gênica dos transcritos para Ang1, Ang2 e Tie2 (Figura 15).

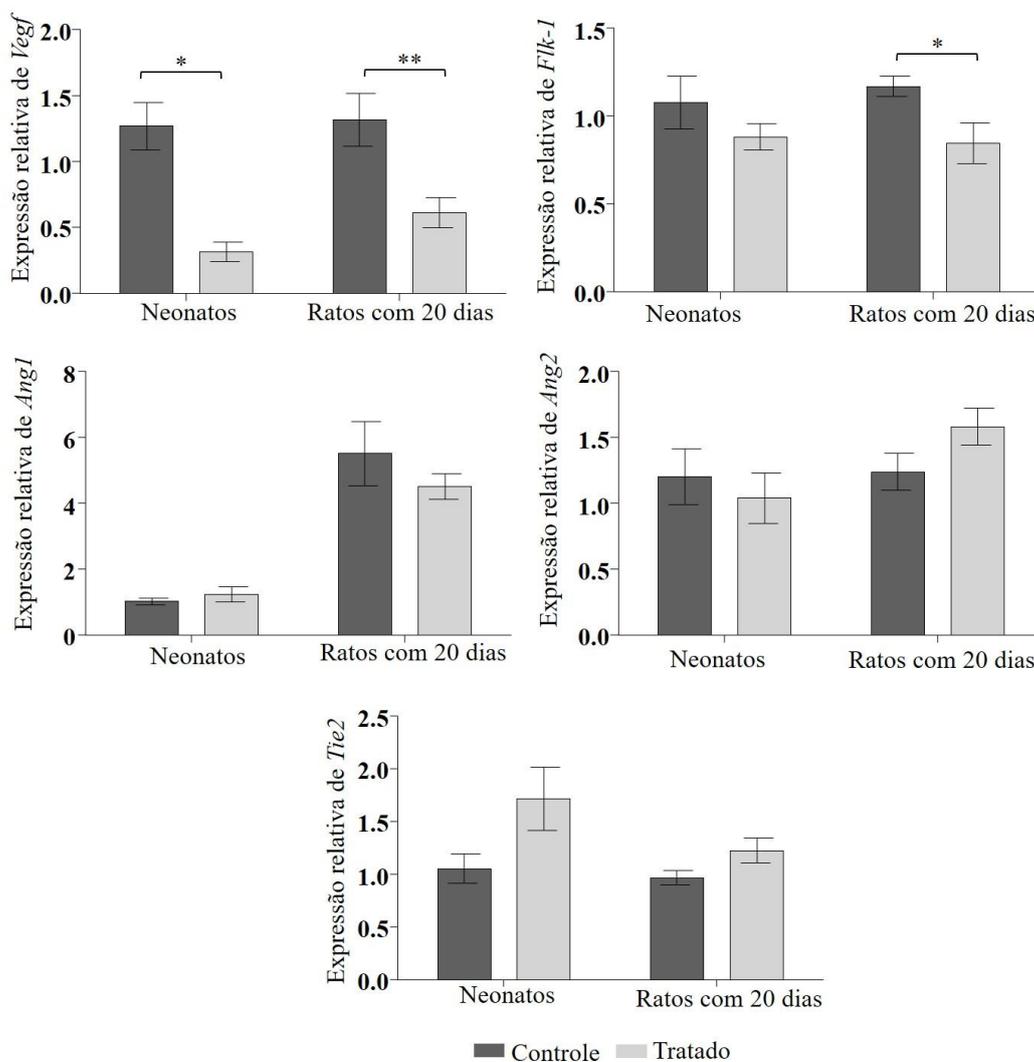


Figura 15. Expressão dos transcritos gênicos para *Vegf*, *Flk-1*, *Ang1*, *Ang2* e *Tie2* pela técnica de RT-PCR em tempo real da epífise cartilaginosa de neonatos e na cartilagem articular da região distal dos fêmures de ratos de 20 dias de ratas controle e tratadas com L-tiroxina. Redução da expressão de mRNA de *Vegf* na epífise cartilaginosa de neonatos ($P < 0,05$) e na cartilagem articular de ratos com 20 dias de idade ($P < 0,001$) e redução de *Flk-1* na cartilagem articular dos ratos com 20 dias de idade ($P < 0,05$).

Em resumo, o excesso de tiroxina materna durante a gestação e lactação pode resultar em diversas alterações na prole em comparação ao grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos do excesso de T₄ na prole de ratas em relação ao grupo controle.

		Neonatos	Ratos com 20 dias	
Dosagem T4 Livre		-	-	
Histomorfometria tireoide	Diâmetro folículo	-	-	
	Altura epitélio	↓	↓	
Peso (g)		↓	↓	
Comprimento do fêmur		↓	↓	
Largura do fêmur		-	-	
Espessura das cartilagens de crescimento	EC	Total	-	
		ZH	↑	
	PE	Total		-
		ZR		-
		ZP		↓
		ZH		-
	CA	Total		-
		ZS		-
		ZM		-
		ZP		-
	% Trabéculas ósseas	MT	↑	↑
		EP		↑
Espessura Trabéculas ósseas	MT	↑	↑	
	EP		↑	
Imunoistoquímica	% CDC-47	↓	↓	
	VEGF	↓	↓	
	FLK-1	-		
	Tie2	-		
RT-PCR	VEGF	↓	↓	
	FLK-1	-	↓	
	Ang1	-	-	
	Ang2	-	-	
	Tie2	-	-	

EC: epífise cartilaginosa; EP: epífise; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular; MT: metáfise; ZR: zona de repouso; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; ZS: zona superficial; ZM: zona média; ZP: zona profunda.

Discussão

A administração de tiroxina em doses elevadas pode promover um status de hipertireoidismo iatrogênico (Kobayashi *et al.*, 2000; Serakides *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2007). Neste estudo, observou-se aumento significativo da concentração plasmática de T₄ livre nas mães tratadas com L-tiroxina. Nos ratos com 20 dias de idade, não houve diferença significativa na concentração plasmática de tiroxina entre os grupos. A dosagem hormonal foi realizada somente nas ratas em lactação e nos ratos com 20 dias, pois devido o pequeno volume sanguíneo passível de ser colhido nos neonatos, não foi realizado o exame por quimioluminescência. Mas, a despeito da dosagem hormonal de T₄, o excesso de tiroxina materna teve efeito sobre o epitélio da tireoide dos neonatos e dos ratos com 20 dias, uma vez que esses animais apresentaram folículos com epitélio significativamente mais baixo em comparação ao controle.

Sabe-se que a aparência morfológica dos folículos da tireoide está intimamente relacionada à sua atividade funcional (Delverdier *et al.*, 1991). Por esta razão, a análise histomorfométrica da tireoide é importante na interpretação das variações morfológicas, sendo a altura do epitélio folicular uma característica sensível para avaliar as alterações da função glandular (Serakides *et al.*, 1999; Serakides *et al.*, 2000). O excesso de tiroxina materna pode resultar em hipertireoidismo neonatal dependendo da dose, com conseqüente atrofia da tireoide e diminuição do tamanho e número de folículos e achatamento do epitélio folicular (Ahmed *et al.*, 2010). O hipertireoidismo fetal como conseqüência do hipertireoidismo materno é pouco frequente (Ogilvy-Stuart, 2002; Péter e Muzsnai, 2011) e pode provocar alterações morfológicas na tireoide fetal pela redução de TSH na prole, com conseqüente perda do efeito estimulador deste hormônio na tireoide (Ahmed *et al.*, 2010).

Além disso, a exposição do sistema hipotálamo-hipófise-tireoide fetal às concentrações elevadas de tiroxina materna, mesmo na ausência de hipertireoidismo no feto, pode prejudicar a maturação fisiológica da glândula fetal, porque há contínua diminuição da relação T₄ e TSH durante o desenvolvimento (Fisher *et al.*, 2000). No presente estudo, não se pode confirmar que houve hipertireoidismo na prole, mas com base na morfometria das tireoides, pode-se atestar o efeito do excesso de tiroxina materna sobre a tireoide dos neonatos e dos ratos com 20 dias decorrente da transferência passiva de tiroxina materna através da placenta e do leite.

Neste estudo, os neonatos e ratos com 20 dias de idade, filhos de ratas com hipertireoidismo apresentaram redução do peso corporal. Aparentemente a associação entre tireotoxicose e o maior risco de baixo peso fetal, ao nascimento e na infância, pode ser similar ao observado em adultos, devido ao aumento no metabolismo em conseqüência do excesso de hormônios da tireoide (Anselmo *et al.*, 2004; Mestman, 2004). Sabe-se ainda que em humanos, durante o período gestacional, o feto apresenta ganho de peso gradual durante o primeiro e segundo trimestres e posteriormente este valor duplica. Portanto, o hipertireoidismo durante a gravidez, em particular no último trimestre, pode ter mais influência sobre o peso ao nascimento, principalmente dependendo do grau da doença, sugerindo que os hormônios tireoidianos em excesso podem interferir na transferência materna de nutrientes (Phoojaroenchanachai *et al.*, 2001).

O excesso de hormônio tireoidiano materno, mesmo que não seja acompanhado de hipertireoidismo na prole, apresenta efeito prejudicial sobre o crescimento fetal (Anselmo *et al.*, 2004; Männistö *et al.*, 2013). Já foram relatadas diversas alterações metabólicas induzidas pelas disfunções tireoidianas maternas durante a gestação e lactação (Millar *et al.*, 1994; Phoojaroenchanachai *et al.*, 2001; Mestman, 2004; Andersen *et al.*, 2013; Medici *et al.*, 2013). Similar aos resultados observados neste estudo, alguns autores já relataram, em seres humanos, retardo no crescimento fetal e baixo peso ao nascimento associados ao hipertireoidismo materno, mas sem especificar fatores que poderiam estar envolvidos na gênese dessas alterações (Millar *et al.*, 1994; Phoojaroenchanachai *et al.*, 2001; Mestman, 2004; Medici *et al.*, 2013).

Como evidenciado na avaliação morfométrica do fêmur, os neonatos das ratas tratadas com tiroxina apresentaram aumento significativo da espessura da zona hipertrófica e aos 20 dias de idade, houve redução da zona proliferativa da placa epifisária. Fisiologicamente, a ação dos hormônios tireoidianos pode ocorrer em diferentes zonas da cartilagem de crescimento, estimulando a expansão clonal dos condrócitos em repouso e a subsequente diferenciação dos condrócitos na zona hipertrófica (Robson *et al.*, 2000). Desta forma, fica evidente a ação do excesso de tiroxina materna na maturação da cartilagem, o que pode justificar o aumento da zona hipertrófica da placa epifisária dos neonatos de ratas tratadas com tiroxina. De forma contrária, ratos com mutações que expressam função negativa dominante do receptor TR α 1 (TR α 1^{L400R}) em condrócitos, cujo fenótipo ósseo é semelhante ao hipotireoidismo, apresentam desorganização e redução da placa epifisária, particularmente da zona proliferativa e hipertrófica, provavelmente pela menor expansão clonal das células progenitoras (Desjardin *et al.*, 2014).

O excesso de tiroxina materna resultou em redução significativa da taxa de proliferação dos condrócitos da epífise cartilaginosa dos neonatos bem como, redução da espessura da placa epifisária e da cartilagem articular dos ratos com 20 dias de idade associadas à redução da zona proliferativa. *In vitro*, T₃ diminui o crescimento de colônias de condrócitos e inibe a proliferação celular (Böhme *et al.*, 1992; Ohlsson *et al.*, 1992; Robson *et al.*, 2000; Okubo e Reddi, 2003). Acredita-se que ao T₃ estimular a expansão clonal das células progenitoras de condrócitos, ele inibe a proliferação celular para promover simultaneamente a diferenciação dos condrócitos e a expansão do volume celular (Robson *et al.*, 2000; Williams, 2013). Entretanto, os mecanismos responsáveis por estes efeitos ainda são pouco compreendidos, devido a complexa interação dos condrócitos com outras células, bem como devido à interação dos hormônios tireoidianos com outras moléculas de ação autócrina e parácrina (Rabier *et al.*, 2006), como o *indian hedgehog* (*ihh*), o peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP), as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Wang *et al.*, 2010). Desta forma, sugere-se que a inibição da proliferação dos condrócitos nas cartilagens de crescimento seja uma das causas da redução do comprimento do fêmur da prole de ratas tratadas com tiroxina.

O excesso de tiroxina materna apresentou efeitos antagônicos sobre o tecido ósseo e cartilaginoso da prole. Sob o tecido ósseo, foi observado aumento na porcentagem e na espessura das trabéculas ósseas dos filhotes das ratas tratadas. Semelhante aos resultados deste estudo, o hipertireoidismo em crianças está associado à maior aposição óssea e à inibição da proliferação dos condrócitos com fechamento precoce das placas epifisárias, resultando em menor estatura (Williams *et al.*, 1998). Já está bem estabelecido que no esqueleto adulto, o excesso de hormônios tireoidianos tem como consequência o aumento da remodelação óssea, estimulando tanto a aposição quanto a reabsorção ósseas, com supremacia do processo catabólico (Mosekilde *et al.*, 1990; Freitas *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2014). Entretanto, o estado fisiológico, a idade e a concentração plasmática do hormônio podem alterar esta resposta, como observado em experimentos *in vivo*, nos quais a administração de tiroxina reverteu, em ratas, a osteopenia decorrente da castração ou da lactação, com ativação dos osteoblastos e aumento da porcentagem de tecido ósseo trabecular (Serakides *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2008).

Os efeitos *in vitro* de T₃ nos osteoblastos também podem ser variáveis entre as espécies, estágio de diferenciação celular, grau de confluência, número de passagens e tipo de célula utilizada, bem como, conforme a concentração do hormônio e duração do tratamento (Harvey *et al.*, 2002). Em excesso, os hormônios tireoidianos podem provocar efeitos prejudiciais e distintos no esqueleto de indivíduos jovens e adultos (Nicholls *et al.*, 2012). É provável que o aumento da espessura das trabéculas ósseas e da porcentagem de tecido ósseo trabecular, evidenciado na prole das ratas tratadas com tiroxina, possa ser decorrente do aumento da diferenciação osteogênica das células tronco promovido pelos hormônios tireoidianos, como demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Boeloni *et al.*, 2009; Hell *et al.*, 2011; Boeloni *et al.*, 2013a).

A adição de T₃ no meio de cultivo aumenta a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratos jovens, caracterizada pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno I e dos nódulos de mineralização (Boeloni *et al.*, 2009) e da expressão de osteocalcina (Hell *et al.*, 2011). Além disso, células tronco de ratas adultas hipertireoideas apresentam maior diferenciação osteogênica, representada por aumento na atividade de conversão de MTT em cristais de formazan, maior atividade da fosfatase alcalina, aumento dos nódulos de mineralização e elevação na expressão gênica de osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea. O aumento da aposição óssea pode ainda ser justificado pela influencia direta de T₃ e T₄ sobre os osteoblastos, estimulando a expressão de fatores que são importantes para a aposição óssea, como colágeno, fosfatase alcalina (Pepene *et al.*, 2003), osteocalcina (Asai *et al.*, 2009) e IGF (Huang *et al.*, 2000).

Neste estudo, com base nas análises imunoistoquímicas e moleculares, o excesso de hormônio tireoidiano materno, durante a gestação e lactação, reduziu a expressão de VEGF nos condrócitos. Esse resultado difere do que tem sido comprovado em outros tecidos, onde os efeitos pró-angiogênicos dos hormônios tireoidianos têm sido observados, como coração (Chilian *et al.*, 1985), corpo lúteo (Silva *et al.*, 2013), placenta (Silva *et al.*, 2015) e em tumores (Lin *et al.*, 2013). Entretanto, os mecanismos pelos quais os hormônios tireoidianos atuam no processo de angiogênese ainda não são completamente compreendidos (Luidens *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstram que a redução da expressão de VEGF nos condrócitos pode ser um dos mecanismos envolvidos na gênese da redução do comprimento do fêmur do grupo tratado. O excesso de tiroxina materna afetou também a expressão gênica do receptor de VEGF, o Flk-1, apenas nos animais com 20 dias de idade. Uma das hipóteses para tentar explicar esse resultado é que o maior tempo de exposição ao excesso de hormônios tireoidianos maternos possa reduzir a expressão do receptor do VEGF. No entanto, os neonatos do grupo tratado apresentaram menor crescimento mesmo não apresentando alterações na expressão do Flk-1.

A relação entre redução do VEGF, menor comprimento ósseo e aumento da zona hipertrófica da placa epifisária já foi relatada por outros pesquisadores. Ratos com lesão traumática induzida na placa epifisária da tíbia e administração local de inibidores de VEGF apresentam redução do crescimento ósseo longitudinal e aumento na zona hipertrófica, sem alteração no tamanho das zonas de repouso e proliferativa. Foi comprovado ainda, que camundongos *knockout* para VEGF-A ou com inibição do VEGF também apresentam atraso no crescimento ósseo endocondral, com redução da proliferação e expansão da zona hipertrófica (Chung *et al.*, 2014), semelhante às alterações observadas neste estudo.

O VEGF é fundamental para a angiogênese, aumento da permeabilidade capilar e consequente diferenciação dos condrócitos durante a formação óssea endocondral (Carlevaro *et al.*, 2000; Bluteau *et al.*, 2007; Murata *et al.*, 2008), promovendo o aporte de oxigênio e auxiliando no transporte de nutrientes (Tang *et al.*, 2012). Sendo assim, é possível que a inibição da expressão de VEGF nos condrócitos possa, em associação com excesso de tiroxina materna, contribuir para a redução da proliferação celular, pela menor expressão de CDC-47, observada no grupo tratado. Diversas outras moléculas também têm sido implicadas como reguladores positivos da angiogênese, como a BMP2 (Peng *et al.*, 2005), a MMP9 (Kojima *et al.*, 2013), o FGF, o TGF, o TNF e as Ang, dentre outras (Dai e Rabie, 2007). Mais estudos são necessários para verificar a participação desses fatores na gênese da redução do crescimento causada pelo hipertireoidismo materno.

Com relação aos outros fatores angiogênicos estudados, apesar de ter sido observada expressão do transcrito gênico para Ang2 nas cartilagens dos ratos, não foi observada imunomarcagem deste fator nas cartilagens de crescimento. Em fetos de suínos, a imunomarcagem para Ang2 no rádio é fracamente expressa nas regiões de ossificação endocondral, enquanto a Ang1 não é detectada (Spiegelaere *et al.*, 2010). A partir de imunofluorescência indireta, Horner e colaboradores (2001) detectaram expressão de Ang1 e Ang2 na placa epifisária de neonatos humanos, sendo a expressão ausente na zona de repouso e maior com a diferenciação de

condrócitos, particularmente quando adjacentes a vasos sanguíneos. A Ang2 apresenta maior intensidade de expressão, principalmente nas zonas de proliferação e hipertrófica. Entretanto, a expressão de Ang nas cartilagens de crescimento de ratos não tem sido estudada.

Apesar de o VEGF apresentar maior expressão durante o crescimento do osso humano, tanto a Ang1 quanto a Ang2 são co-expressos com o VEGF, a partir das análises de imunofluorescência indireta, em locais de ossificação endocondral em áreas de remodelamento ósseo (Horner *et al.*, 2001). Sabe-se que a Ang1 se liga e ativa o Tie2 enquanto a Ang2 bloqueia a ligação e a ação da Ang1 (Asahara *et al.*, 1998). Foi observada expressão dos transcritos gênicos para Ang1 e Ang2, e para o seu receptor Tie2, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado. Entretanto, foi constatada ausência de imunexpressão de Ang2 nas cartilagens de crescimento. Contudo, os níveis de mRNA nem sempre coincidem com os níveis de expressão proteica. Isso é justificado porque a quantidade de proteína presente numa célula depende não somente da quantidade e frequência da transcrição e translação, mas também da degradação proteica e da frequência do transporte para fora da célula (Lester, 2008).

Nos neonatos filhos de ratas tratadas com tiroxina, foi observada redução da imunexpressão de Tie2. Apesar da especificidade entre o receptor Tie2 e as Angs, foi constatado em células endoteliais da veia umbilical humana que o VEGF através da clivagem proteolítica do Tie1, pode ativar o receptor Tie2 por fosforilação independente da ligação de Tie2 com seus ligantes (Singh *et al.*, 2009). Já foi demonstrado que Ang1 e Ang2 podem modular a neovascularização pós-natal induzida pelo VEGF (Asahara *et al.*, 1998). Entretanto, vale ressaltar que as sinalizações de VEGF-VEGFR e Ang-Tie regulam diferentes aspectos da angiogênese (Saharinen, *et al.*, 2010). Tie2 auxilia na manutenção da integridade de vasos maduros. Assim a perda de sinalização de Tie2 pode levar a desestabilização de vasos sanguíneos (Augustin *et al.*, 2009). Dessa forma, pode-se sugerir que a menor expressão de VEGF e Tie2 nas cartilagens de crescimento esteja associada à redução na angiogênese. Estudos em modelo experimental de *zebrafish* demonstraram a ação sinérgica entre Tie2 e VEGF no controle da angiogênese e a importância da expressão de Tie2 para a expressão de Flk-1 induzida por VEGF (Li *et al.*, 2014). Todavia, esta relação ainda é pouco esclarecida quando relacionada ao crescimento ósseo, sendo necessários estudos da sinalização angiopoietina/Tie nas cartilagens de crescimento e sua influência sob a ação do VEGF.

Portanto, o excesso de tiroxina materna durante a gestação e lactação reduz o crescimento ósseo endocondral da prole por reduzir a taxa de proliferação e a expressão de VEGF e dos receptores Flk-1 e Tie2 nas cartilagens de ratos em crescimento sem, no entanto, alterar a expressão dos transcritos gênicos para as Angs 1 e 2.

CAPÍTULO 3

Efeito do excesso de tiroxina materna associado ao hipertireoidismo pós-natal sobre o crescimento ósseo endocondral e perfil proliferativo e angiogênico das cartilagens de crescimento de ratos

Resumo

Grande parte da evidência de que os hormônios tireoidianos têm influência sobre o crescimento ósseo baseou-se em pesquisas com hipotireoidismo. Apesar do hipertireoidismo também estar associado à redução do crescimento em crianças, a gênese da baixa estatura ainda é desconhecida. Uma das nossas hipóteses é que a redução do crescimento no hipertireoidismo ocorra por redução da proliferação celular e da angiogênese. O objetivo deste estudo foi elucidar os efeitos do excesso da tiroxina materna e pós-natal sob o perfil proliferativo e angiogênico das cartilagens de crescimento de ratos com 40 dias de idade. Foram utilizadas 16 ratas *Wistar* adultas distribuídas em dois grupos. O grupo tratado (n=8) recebeu L-tiroxina e o controle (n=8) água destilada, diariamente durante a gestação e a lactação. Do desmame até os 40 dias de idade, a prole do grupo tratado (n=8) recebeu L-tiroxina e do grupo controle recebeu placebo (n=8). Ao desmame, foi realizada dosagem plasmática de T₄ livre nas mães. Na prole com 40 dias de idade, foram realizados: dosagem plasmática de T₃ total e T₄ livre, histomorfometria das tireoides, mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur. Nas cartilagens do fêmur, foram avaliados o perfil proliferativo, baseado na expressão de CDC-47 e o perfil angiogênico, pela expressão de VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2, por imunistoquímica e/ou RT-PCR tempo real. As médias entre grupos foram comparadas pelo teste T de *Student*. As concentrações plasmáticas de T₄ livre das mães tratadas e de T₃ total e T₄ livre da prole aos 40 dias foram significativamente mais elevadas. Além disso, a tireoide dos filhotes que receberam tiroxina apresentou folículos com diâmetro significativamente maior e epitélio significativamente mais baixo. A largura do fêmur foi significativamente menor nos animais tratados com redução significativa da espessura da zona proliferativa da placa epifisária e da cartilagem articular. Além disso, houve redução da proliferação celular pela menor imunexpressão de CDC-47 e do perfil angiogênico pela menor imunexpressão de VEGF e dos transcritos gênicos para VEGF e Ang1 nas cartilagens de crescimento dos ratos com hipertireoidismo. Conclui-se que o excesso de tiroxina materna associado ao hipertireoidismo pós-natal reduz a largura da diáfise do fêmur e a proliferação celular e a expressão gênica e protéica de VEGF e Ang1 nas cartilagens de crescimento.

Palavras chave: tiroxina, hipertireoidismo congênito, cartilagem de crescimento, osso, angiogênese, rato.

Introdução

Os hormônios tireoidianos maternos têm ação crítica em todos os sistemas da prole durante a gestação e lactação (Millar *et al.*, 1994; Phoojaroenchanachai *et al.*, 2001; Mestman, 2004; Andersen *et al.*, 2013; Medici *et al.*, 2013). O hipertireoidismo materno pode estar associado ao hipertireoidismo transitório fetal e neonatal, que é causado pela passagem de anticorpos tireoestimulantes da mãe com doença de Graves para o feto. Essa alteração geralmente ocorre em 1% dos neonatos de mães com hipertireoidismo (Péter e Muzsnai, 2011). Embora raros, os casos de hipertireoidismo congênito persistente também têm sido descritos por alterações genéticas e hereditárias do receptor para tireotropina (Polak *et al.*, 2006).

Já está bem estabelecido que os hormônios tireoidianos apresentam grande influência sobre o crescimento e maturação óssea (Serakides *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2008; Bassett e William, 2009; Nicholls *et al.*, 2012). Entretanto, grande parte desta evidência baseou-se nas observações em indivíduos com hipotireoidismo (Buckler *et al.*, 1986). Embora menos frequente que a hipofunção tireoidiana, o hipertireoidismo congênito se não reconhecido e tratado também pode ter efeitos graves sobre o crescimento ósseo, particularmente nos primeiros dois anos de vida (Segni *et al.*, 2001). A tireotoxicose juvenil pode estar associada ao crescimento acelerado e à idade óssea avançada. No entanto, há relatos de redução da estatura devido à fusão prematura das placas de crescimento (Segni *et al.*, 1999; Bassett *et al.*, 2007).

A formação e o crescimento ósseos são controlados principalmente pelas taxas de proliferação, síntese de matriz extracelular e hipertrofia dos condrócitos da placa epifisária (Hunziker, 1994; Ballock e O'Keefe, 2003). A elevada atividade mitótica dos condrócitos é controlada por inúmeros fatores, incluindo regulação endócrina, autócrina, ritmo circadiano e idade (Farnum *et al.*, 2002), o que é fundamental para criar as proporções funcionais do esqueleto (Staines *et al.*, 2013). Com a maturidade, os condrócitos adquirem um estado de senescência e conseqüente declive do potencial proliferativo e o crescimento longitudinal é cessado (Weise *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2005; Mackie *et al.*, 2011).

As células que participam do processo de formação e crescimento ósseos, como os condroblastos, osteoblastos e osteoclastos devem apresentar interação funcional com o sistema vascular, sendo inclusive reguladas por moléculas pró e anti-angiogênicas (Carrington e Reddi, 1991; Maes, 2013). O VEGF é o principal regulador da angiogênese durante o desenvolvimento embrionário, fetal e pós-natal e da sobrevivência e atividade das células das linhagens condrogênica e osteoblástica (Ferrara *et al.*, 2003). É também o responsável pela sinalização que coordena a invasão de vasos sanguíneos na zona hipertrófica das cartilagens de crescimento e a substituição progressiva da cartilagem em osso, com conseqüente promoção do crescimento (Maes, 2013). Além do VEGF, as angiopoetinas (Ang) e seus receptores tirosina quinase (Tie2) também são importantes para angiogênese e em humanos já foram identificadas em locais de ossificação endocondral em coexpressão com VEGF (Horner *et al.*, 2001).

Apesar dos hormônios, fatores de crescimento, genes e vias de sinalização que controlam o crescimento ósseo serem amplamente estudados, o mecanismo pelo qual ocorre redução do crescimento ósseo induzido pelo excesso de tiroxina materna associado ao hipertireoidismo pós-natal permanece desconhecido. Pesquisas desenvolvidas por nossa equipe demonstraram, por histomorfometria óssea, que o hipertireoidismo materno em ratas resulta em redução significativa da formação e do crescimento ósseo endocondral na prole ao nascimento e ao desmame, caracterizado por redução do comprimento dos membros, aumento da espessura da placa epifisária e aumento da porcentagem de osso trabecular. Mas, estas alterações podem ser reversíveis 20 dias após o desmame se for cessado o contato do filhote com o excesso de tiroxina materna. No entanto, neste estudo prévio foi avaliado apenas as alterações, sem investigar a gênese (Maia *et al.*, 2016). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do excesso de tiroxina materna associado ao hipertireoidismo pós-natal nas cartilagens de crescimento da prole, a partir da avaliação do perfil proliferativo, baseado na expressão de CDC-47 e do perfil angiogênico, pela expressão imunistoquímica e/ou de transcritos gênicos para VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2.

Material e métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo nº. 47/2014) (Anexo 1).

Acasalamento e administração de tiroxina

Foram utilizadas 16 ratas *Wistar* com dois meses de idade (Figura 16), alojadas em caixas plásticas (quatro ratas/caixa) e recebendo ração comercial e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após adaptação de duas semanas, as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para determinar a fase do ciclo estral (Marcondes *et al.*, 2002). As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de duas fêmeas para cada macho. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal e esse dia foi considerado dia 0 de gestação (Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Após a cópula, as fêmeas foram mantidas individualmente em caixas plásticas.

A partir do primeiro dia de gestação, as ratas foram distribuídas em dois grupos distintos, cada um com oito animais. O grupo tratado recebeu a administração diária de L-tiroxina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 5 mL de água destilada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Serakides *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2013) (Anexo 2), por todo período da gestação e lactação. Nas fêmeas do grupo controle, foi fornecido como placebo 5 mL de água destilada, por sonda oro-gástrica, durante todo o período experimental.

De cada rata dos grupos controle e tratado com L-tiroxina, foi separado um filhote no desmame, ou seja, aos 20 dias de idade. Os filhotes das ratas do grupo tratado receberam L-tiroxina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 1 mL de água destilada. Sendo assim, estes animais foram submetidos ao excesso de tiroxina materna durante a gestação e lactação e após o desmame continuaram recebendo tiroxina por mais 20 dias. Os filhotes do grupo controle receberam 1 mL de água destilada como placebo também por sonda oro-gástrica.

Dessa forma, foram constituídos dois grupos: 1) Filhos hipertireoideos de ratas tratadas com L-tiroxina (n=8) e 2) Filhos eutireoideos de ratas controle. A eutanásia foi realizada por punção cardíaca precedida por anestesia com xilazina (40 mg/Kg/IP; Vetnil, Brasil) e quetamina (10 mg/Kg/IP; König, Brasil).

Dosagem plasmática de T₃ total e T₄ livre

O sangue das ratas aos 20 dias de lactação e da prole aos 40 dias foi colhido por punção cardíaca em tubos contendo heparina seguido de centrifugação para obtenção do plasma e armazenado a -20°C para dosagem de T₄ livre nas mães e T₃ total e T₄ livre na prole. A dosagem foi realizada usando a técnica de ELISA de quimioluminescência (IMMULITE, *Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA*) (sensibilidade: 0,4 ng/dl) em sistema totalmente automático (Serakides *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2008).

Processamento e análise histomorfométrica da tireoide

As tireoides da prole dos grupos hipertireoideo e controle foram dissecadas, fixadas em formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico e processadas de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4µm foram coradas pela técnica de HE para avaliação morfológica. Foram mensurados, ao acaso, em cada tireoide, os diâmetros maior e menor de 30 folículos, obtendo-se a média destas medidas.

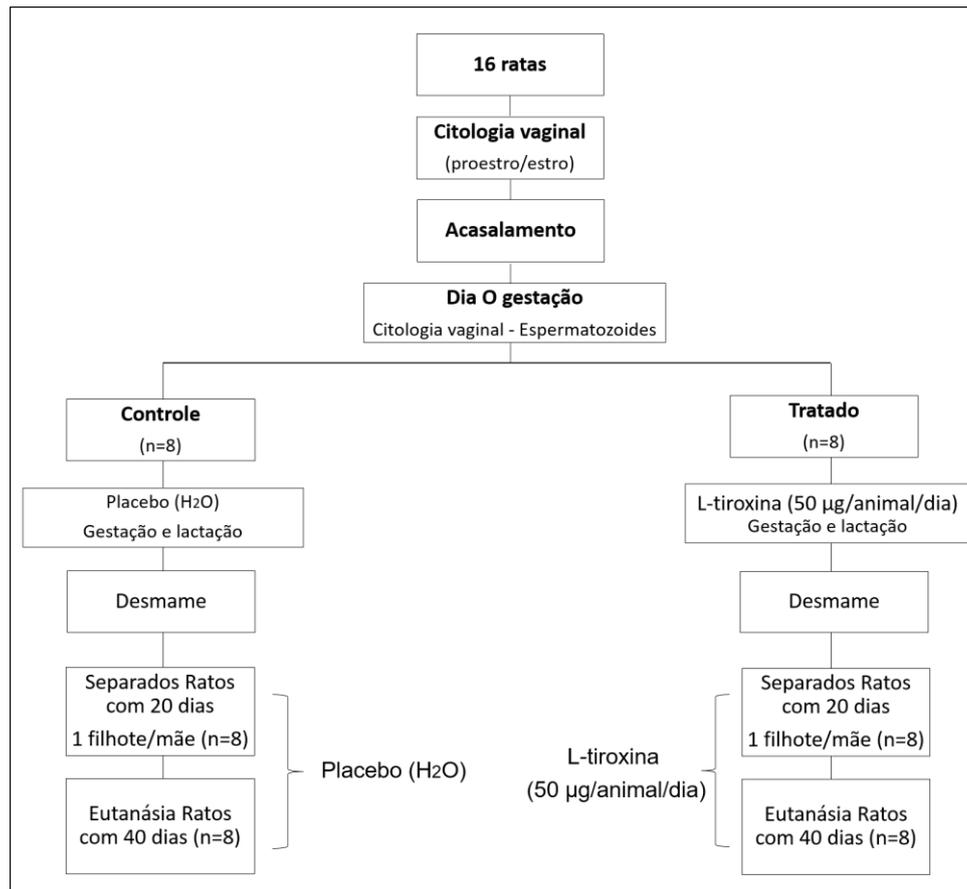


Figura 16. Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo nas ratas mães e prole com 40 dias nos grupos controle e tratado com L-tiroxina.

Esta mensuração foi realizada em uma secção histológica por animal com auxílio de uma ocular micrométrica com régua acoplada ao microscópio em objetiva de 40x.

A altura do epitélio foi mensurada em 20 folículos. Em cada folículo, foram mensurados quatro pontos distintos e equidistantes, obtendo-se o valor médio das quatro medidas. Esta mensuração foi realizada com auxílio de uma ocular micrométrica com régua acoplada ao microscópio em objetiva de 100x. Os valores obtidos para o diâmetro e altura do epitélio foram transformados em micrômetro utilizando-se a escala de uma lâmina micrométrica (Serakides *et al.*, 2000).

Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur

Aos 40 dias de idade dos grupos hipertireoide e controle foram obtidas as médias do peso corporal individual (g). A mensuração do fêmur direito foi realizada com auxílio de régua milimetrada (paquímetro), sendo o comprimento medido da epífise proximal até a epífise distal, enquanto a largura foi medida no meio da diáfise do osso.

Processamento histológico e análise histomorfométrica dos ossos

De todos os animais dos dois grupos experimentais, foram dissecados e colhidos o fêmur direito para processamento histológico. As amostras foram fixadas em formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico por no máximo 48 horas. As amostras foram submetidas à descalcificação, pela utilização de duas soluções diferentes. Na primeira solução, os ossos permaneceram por 24h e foi constituída por EDTA (0,7g), tartarato de sódio e

potássio (8g), tartarato de sódio (0,14g), ácido clorídrico (120mL) e água destilada (900mL). Posteriormente, os ossos foram colocados na segunda solução de EDTA a 10% dissolvido em água destilada com troca da solução uma vez por semana, até completa descalcificação (Pitol *et al.*, 2007) por 20 dias (Anexo 3). Em seguida, os ossos foram seccionados longitudinalmente, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (Anexo 4) e submetidos à microtomia para obtenção de secções histológicas de 4µm. Para análise histomorfométrica, as secções histológicas foram coradas pela técnica da HE (Anexo 5).

A porcentagem de tecido ósseo trabecular foi determinada tanto na epífise quanto na metáfise distal do fêmur em três campos em objetiva de 20x com auxílio de uma gráticula com 121 pontos acoplada a ocular do microscópio óptico. A espessura das trabéculas foi determinada a partir da média tomada de três pontos equidistantes por trabécula, em um total de 20 trabéculas ósseas da região metafisária, abaixo da placa epifisária, em objetiva de 10x. As espessuras das cartilagens articulares e das placas epifisárias, bem como das suas zonas foram determinadas pela média das espessuras tomadas em 15 pontos equidistantes em objetiva de 10x. Estas avaliações foram realizadas com o auxílio de uma ocular com régua. Os valores obtidos foram transformados em micrômetros utilizando-se a escala de uma lâmina micrométrica.

Análise imunoistoquímica das cartilagens de crescimento

Secções histológicas da epífise e metáfise distais dos fêmures dos grupos hipertireoideo e controle foram colocadas sob lâminas gelatinizadas (Bloise *et al.*, 2009) (Anexo 6). As secções histológicas foram submetidas à imunoistoquímica. Analisou-se a atividade proliferativa com o anticorpo anti-CDC-47 (47DC14; Neomarkers, Fremont, CA, USA, diluição 1:50) e perfil angiogênico com o uso do anticorpo anti-VEGF (sc-152; Santa Cruz, CA, USA, diluição 1:50).

Foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Dako, St Louis, MO, USA) e a recuperação antigênica foi realizada pelo calor em banho-maria a 98°C com solução de Trilogy[®]. As secções histológicas foram incubadas em câmara úmida *overnight* com o anticorpo primário e por 30 minutos em cada uma das etapas seguintes, bloqueio da peroxidase endógena, soro de bloqueio (Dako, St Louis, MO, USA) e estreptavidina peroxidase, e por 45 min a incubação com anticorpo secundário (Dako, St Louis, MO, USA). O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (Dako, St Louis, MO, USA). As secções foram contra-coradas com *methy green* para o CDC-47 e com hematoxilina de Harris para o VEGF (Anexo 7). O controle negativo para todos os anticorpos foi obtido pela substituição do anticorpo primário por soro bloqueio e como controle positivo secções histológicas de baço de rato.

As análises imunoistoquímicas foram realizadas em toda a extensão das cartilagens de crescimento do fêmur dos grupos tratado e controle, sendo ainda avaliada isoladamente na zona hipertrófica da placa epifisária. As células imunomarcadas foram avaliadas em 10 campos/secção histológica em objetiva de 40x por meio de imagens capturadas pelo microscópio Leica DM 4000B com câmera digital acoplada. A porcentagem de células CDC-47 positivas foi determinada considerando o número total de células por campo, usando o *software* ImagePro-plus (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA). Para o anti-VEGF, determinou-se a área e a intensidade de imunomarcção em *pixels* usando o *software* WCIF Image J[®] (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA). A avaliação foi realizada tanto na cartilagem articular quanto na placa epifisária do fêmur. Cada um dos fatores foi avaliado na zona superficial, média e profunda da cartilagem articular e também nas zonas de repouso, proliferativa e hipertrófica da placa epifisária.

Expressão de transcriptos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento

A quantificação relativa da expressão de VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2 foi realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real em fragmentos da cartilagem articular do fêmur esquerdo dos ratos hipertireoideos e controle. Essas cartilagens foram coletadas em trizol, congeladas

imediatamente em nitrogênio líquido por 2h e posteriormente armazenadas a -80°C. A extração do mRNA da cartilagem foi realizada pelo uso do TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância por espectrofotometria a 260/280nm (Anexo 8). Para as reações de transcrição reversa foi utilizado Kit comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis Super Mix qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sendo utilizados 10µL de 2x RT reaction MIX, 2µL de RT enzyme MIX, 6µL de água DEPC e 2µL de RNA contendo 0,5µg de RNA/µL para um volume final de 20µL. A transcrição reversa foi realizada em um termociclador com a programação de 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1µL de RNase H por microtubo e novamente colocado no termociclador por 20 minutos a 37°C (Anexo 9). Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 2,5 µL de cDNA, 1,0 µL de cada iniciador, 1,0 µL de ROX, 7 µL de água DEPC livre de RNase e 12,5µL do reagente SYBR Green em um volume final de 25 µL de reação no aparelho 7500 Real-Time PCR System. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos (Anexo 10). Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 3). A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de beta actina (*Actina-β*) *Rattus norvegicus*.

Tabela 3. Iniciadores dos transcritos gênicos delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus*

Transcritos gênicos	Iniciadores	Nº de acesso
VEGF	Forward: GCCCAGACGGGGTGGAGAGT Reverse: AGGGTTGGCCAGGCTGGGAA	NM_001110336.1
<i>Flk-1</i>	Forward: GTCCGCCGACACTGCTGCAA Reverse: CTCGCGCTGGCACAGATGCT	NM_013062.1
Ang1	Forward: GTCAGCCTTTGCACAAAAGAAGTTT Reverse: TCCAGCCCCTCTGGAAATCT	NM_053546.1
Ang2	Foward: TGCCTGCAAGTTTGCTGAAC Reverse: GGCTGAGCCAAGACAAGAT	NM_134454.1
Tie2	Foward: CGGCTTAGTTCTCTGTGGAGTC Reverse: GGCATCAGACACAAGAGGTAGG	NM_001105737.1
Actina-β	Forward: TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT Reverse: CGACGAGCGCAGCGATATCGT	NM_031144.2

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada a comparação das médias pelo teste t de *student* pelo pacote computacional GraphPad Prism 6. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$ (Sampaio, 2002).

Resultados

Concentração plasmática dos hormônios tireoidianos e histomorfometria da tireoide

O tratamento com tiroxina aumentou a concentração plasmática de T₄ livre nas ratas com 20 dias de lactação quando comparadas com as ratas do grupo controle ($P < 0,05$). Na prole com 40 dias, o hipertireoidismo foi confirmado nos animais tratados pelo aumento significativo da concentração plasmática de T₃ total e T₄ livre comparados com o grupo controle (Figura 17).

Além disso, todos os animais tratados com L-tiroxina exibiram sinais clínicos caracterizados por hiperatividade e agressividade.

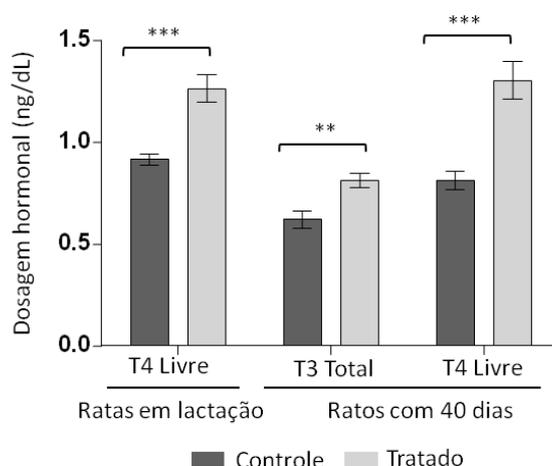


Figura 17. Níveis de hormônios da tireoide (média±SD) no plasma das ratas mães controle e tratadas com L-tiroxina, ao final da lactação e da prole dos grupos controle e que recebeu tiroxina materna associada à tiroxina administrada do desmame aos 40 dias de idade. Aumento nas concentrações plasmáticas de T₄ livre (P<0.001) nas ratas tratadas e aumento de T₃ total (P<0.01) e de T₄ livre (P<0.001) nos ratos com 40 dias de idade que receberam tiroxina.

As tireoides, independente do grupo experimental, apresentaram folículos variando de redondos a ovais e com diâmetros variados. No grupo controle, os folículos eram revestidos por epitélio predominantemente cuboidal e preenchidos por coloide denso e por vezes vacuolizado, enquanto que nos ratos hipertireoideos, foi observada predominância de folículos com diâmetro grande e uniforme e revestidos por epitélio achatado. A morfometria confirmou a diferença entre grupos. Foi observado, no grupo hipertireoideo, aumento significativo do diâmetro dos folículos e redução significativa da altura do epitélio folicular em comparação aos do grupo controle (Figura 18).

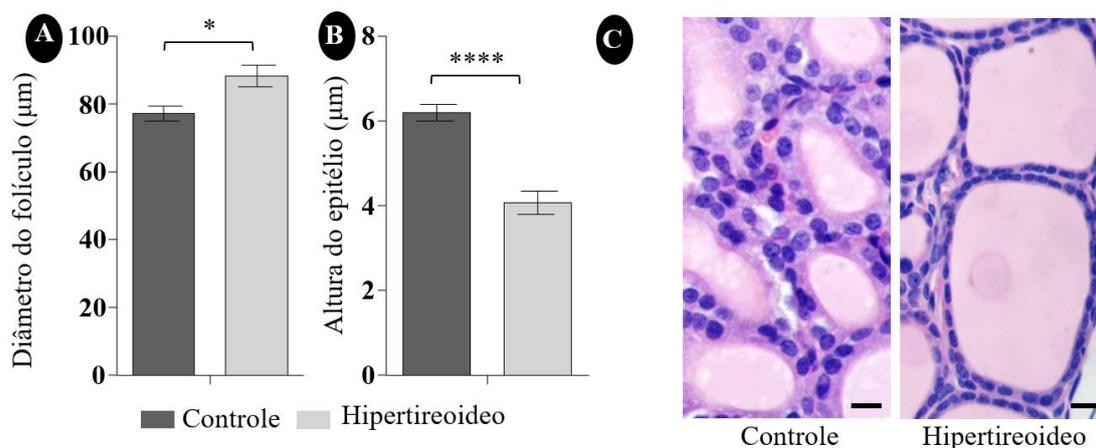


Figura 18. Histomorfometria da tireoide (média±SD) de ratos controle e hipertireoideos. A) Aumento no diâmetro folicular (µm) no grupo hipertireoideo (p>0,05). B) Redução da altura do epitélio folicular (µm) da tireoide nos ratos hipertireoideos (P<0,0001). C) Fotomicroscopia da tireoide evidenciando as alterações descritas nos gráficos. HE, barra: 18,5 µm.

Mensuração do peso corporal e do comprimento e largura do fêmur

Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal (Figura 19A) e no comprimento do fêmur (Figura 19B) entre grupos. No entanto, a largura do fêmur foi significativamente menor nos animais hipertireoideos (Figura 19C).

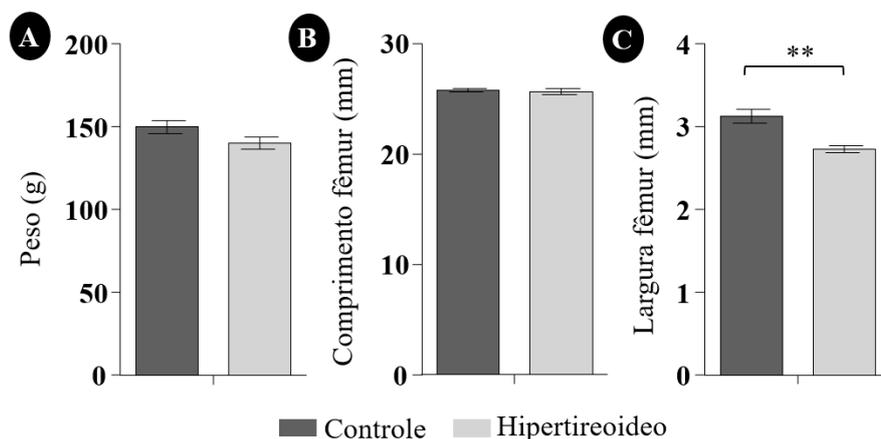


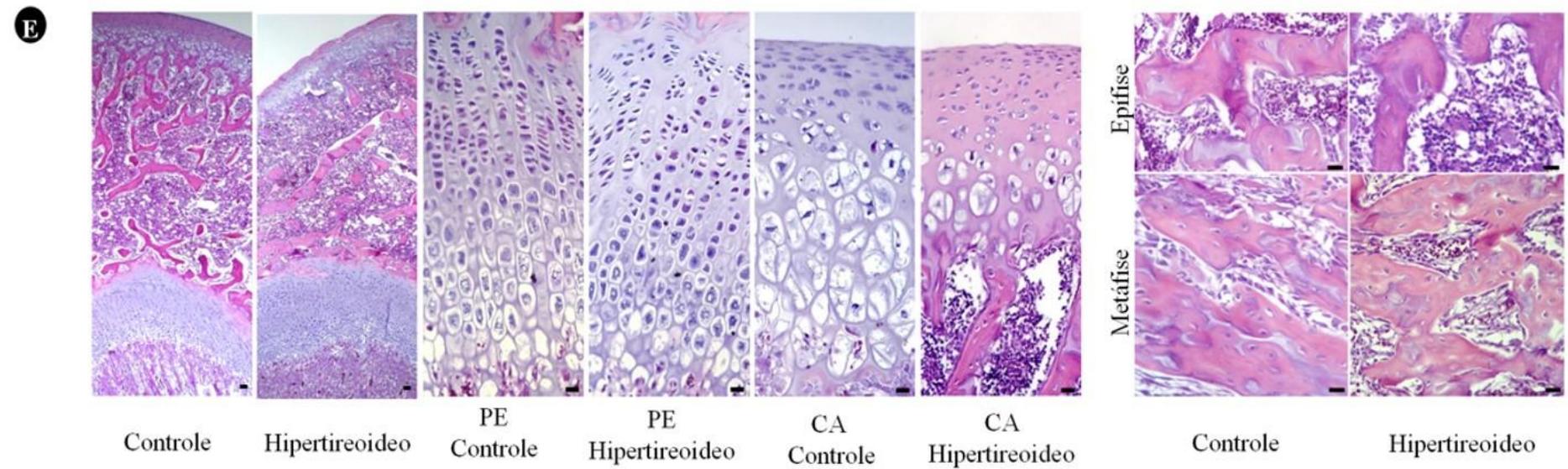
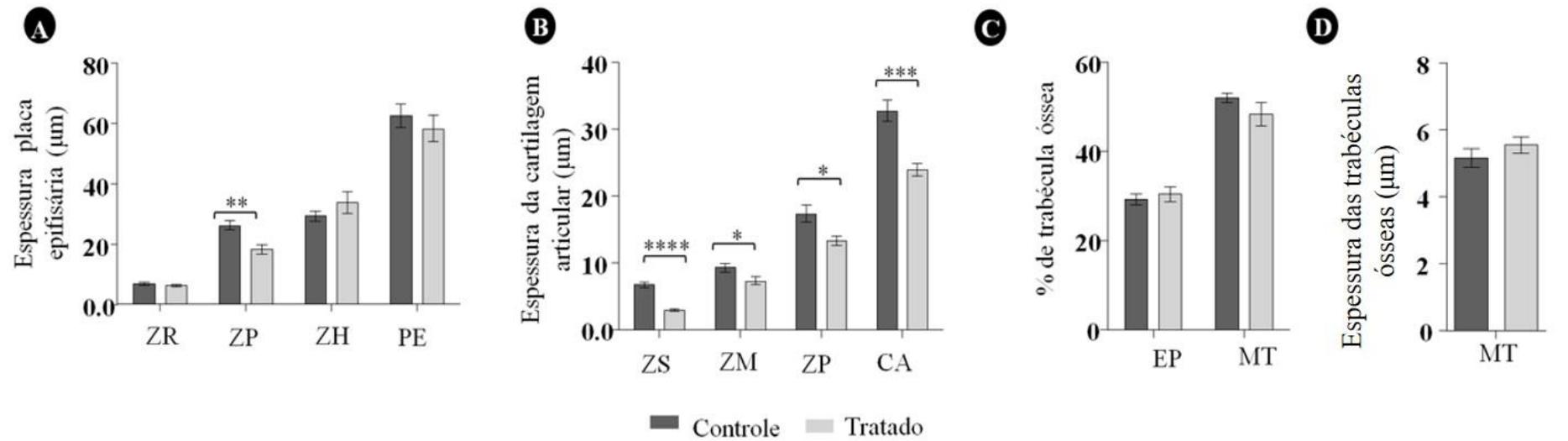
Figura 19. Peso corporal (g), comprimento (mm) e espessura (mm) do fêmur de ratos controle e hipertireoideos ($p > 0,05$). A e B) Não foram observadas diferenças significativas no peso ou comprimento do fêmur entre os grupos. C) Ratos hipertireoideos com menor espessura do fêmur.

Histomorfometria das cartilagens de crescimento e do tecido ósseo

Em ambos os grupos, a placa epifisária apresentava espessura compatível com a idade dos animais. Entretanto, em alguns animais do grupo tratado foi observada desorganização das zonas da placa epifisária. No grupo hipertireoideo não foi observada diferença significativa na espessura total da placa epifisária e das zonas de repouso e hipertrófica em relação ao controle. No entanto, a espessura da zona proliferativa foi significativamente menor comparada a do grupo controle (Figura 20A e E). Já a espessura da cartilagem articular e de todas as suas zonas foi significativamente menor no grupo hipertireoideo comparada a do controle (Figura 20B e E).

Nos grupos controle e hipertireoideo o tecido ósseo trabecular apresentava características semelhantes. As trabéculas epifisárias e metafisárias do fêmur eram numerosas, espessas e confluentes. Os osteoblastos recobriam toda a superfície das trabéculas e apresentavam-se ora cuboidais e com núcleo volumoso e oval, ora achatados com núcleo fusiforme e intensamente basofílico. Os osteócitos apresentavam-se por vezes com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas e pouco basofílicas ou com núcleos volumosos alojados em lacunas largas com bordas basofílicas. Confirmando a análise morfológica, não foi observada diferença entre grupos com relação à espessura das trabéculas ósseas e à porcentagem de tecido ósseo trabecular na epífise e metafise do fêmur (Figura 20C, D e E).

Figura 20. Histomorfometria óssea da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideo. A) Espessura da placa epifisária e suas zonas, com redução da zona proliferativa da placa epifisária dos ratos hipertireoideos em comparação ao controle ($P < 0,01$). B) Redução da espessura da cartilagem articular ($P < 0,001$) e suas zonas superficial ($P < 0,0001$), média ($p > 0,05$) e profunda ($p > 0,05$) nos ratos hipertireoideos em comparação ao controle. C) Porcentagem de trabéculas ósseas metafisárias e epifisárias ($p > 0,05$). D) Espessura das trabéculas ósseas metafisárias ($p > 0,05$). E) Fotomicroscopia da epífise e placa epifisária demonstrando desorganização e redução da espessura da zona proliferativa. Cartilagem articular com menor espessura total e de suas zonas nos animais do grupo tratado. Trabéculas ósseas da epífise e metafise sem diferenças entre os grupos; HE, barra: 18,5 μm . CA: cartilagem articular; EP: epífise; PE: placa epifisária; MT: metafise; ZR: zona de repouso; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; ZS: zona superficial; ZM: zona média; ZP: zona profunda.



Expressão imunoistoquímica de CDC-47 e VEGF

Nos dois grupos, a taxa de proliferação, caracterizada pela expressão de CDC-47, foi representada pela marcação positiva nuclear, principalmente nas zonas proliferativa e média, em menor quantidade nas zonas de repouso e rara nas zonas hipertróficas da placa epifisária, com padrão similar nas zonas da cartilagem articular. Nos ratos hipertireoideos, a imunoexpressão do CDC-47 foi significativamente menor nos condrócitos da cartilagem articular e da placa epifisária dos fêmures em comparação ao controle (Figura 21).

A análise imunoistoquímica da expressão de VEGF revelou imunomarcção citoplasmática e nuclear em todas as zonas da placa epifisária e da cartilagem articular de ambos os grupos. Contudo, nos ratos hipertireoideos houve significativa redução na área e na intensidade de imunomarcção em toda a placa epifisária e cartilagem articular e especificamente na zona hipertrófica da placa epifisária, em comparação ao controle (Figura 22).

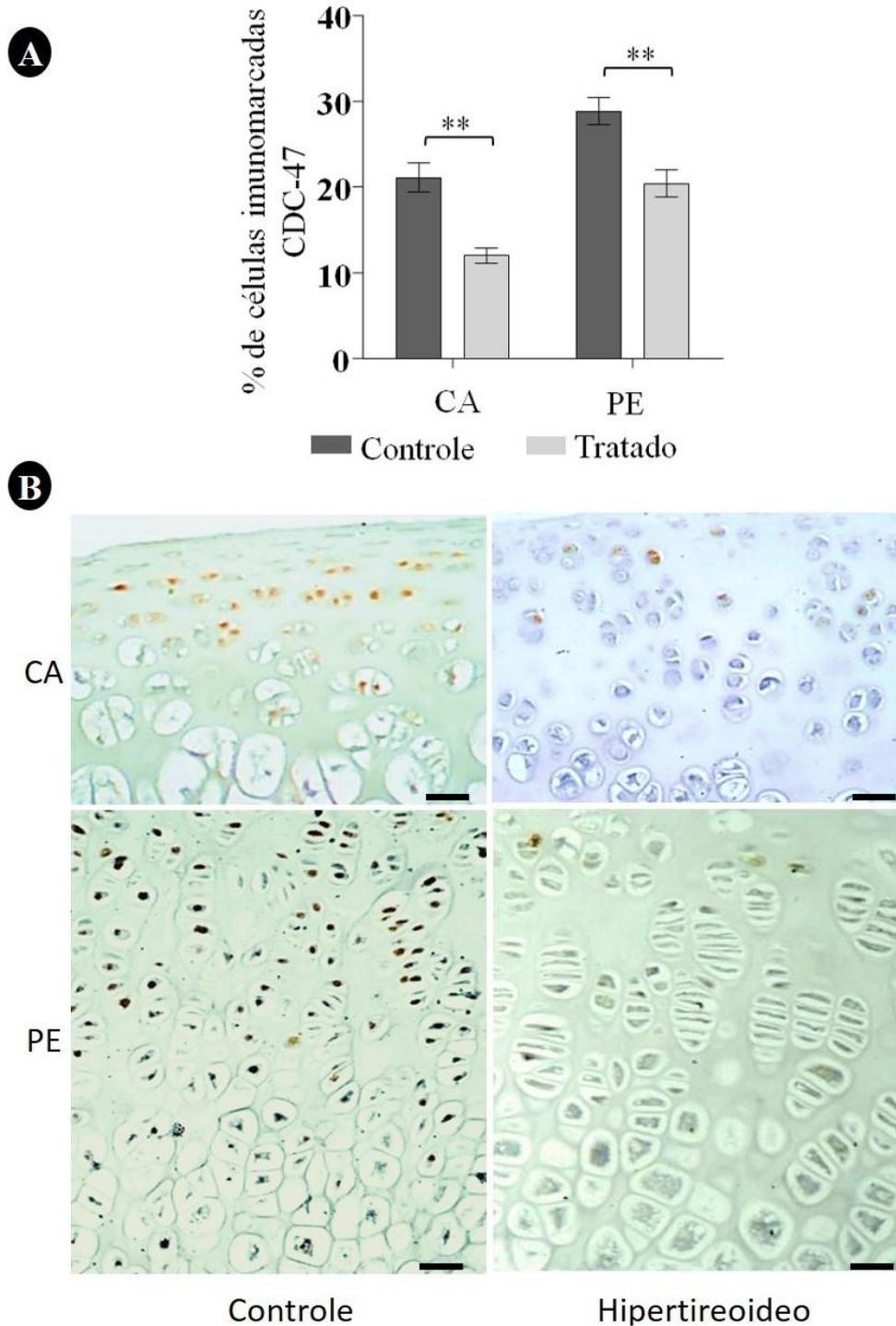


Figura 21. Expressão imunoistoquímica de CDC-47 nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideo. A) Redução da porcentagem de células imunomarcadas na cartilagem articular ($P < 0,001$) e na placa epifisária ($P < 0,001$). B) Fotomicroscopia da cartilagem articular e placa epifisária dos fêmures de ratos com 40 dias controle e hipertireoideo, demonstrando redução no número de células positivas para CDC-47 com núcleo corado de marrom no grupo tratado em comparação ao controle (estreptavidina-biotina-peroxidase, *metyl green*, barra: 18,5 μm . CA: cartilagem articular; PE: placa epifisária.

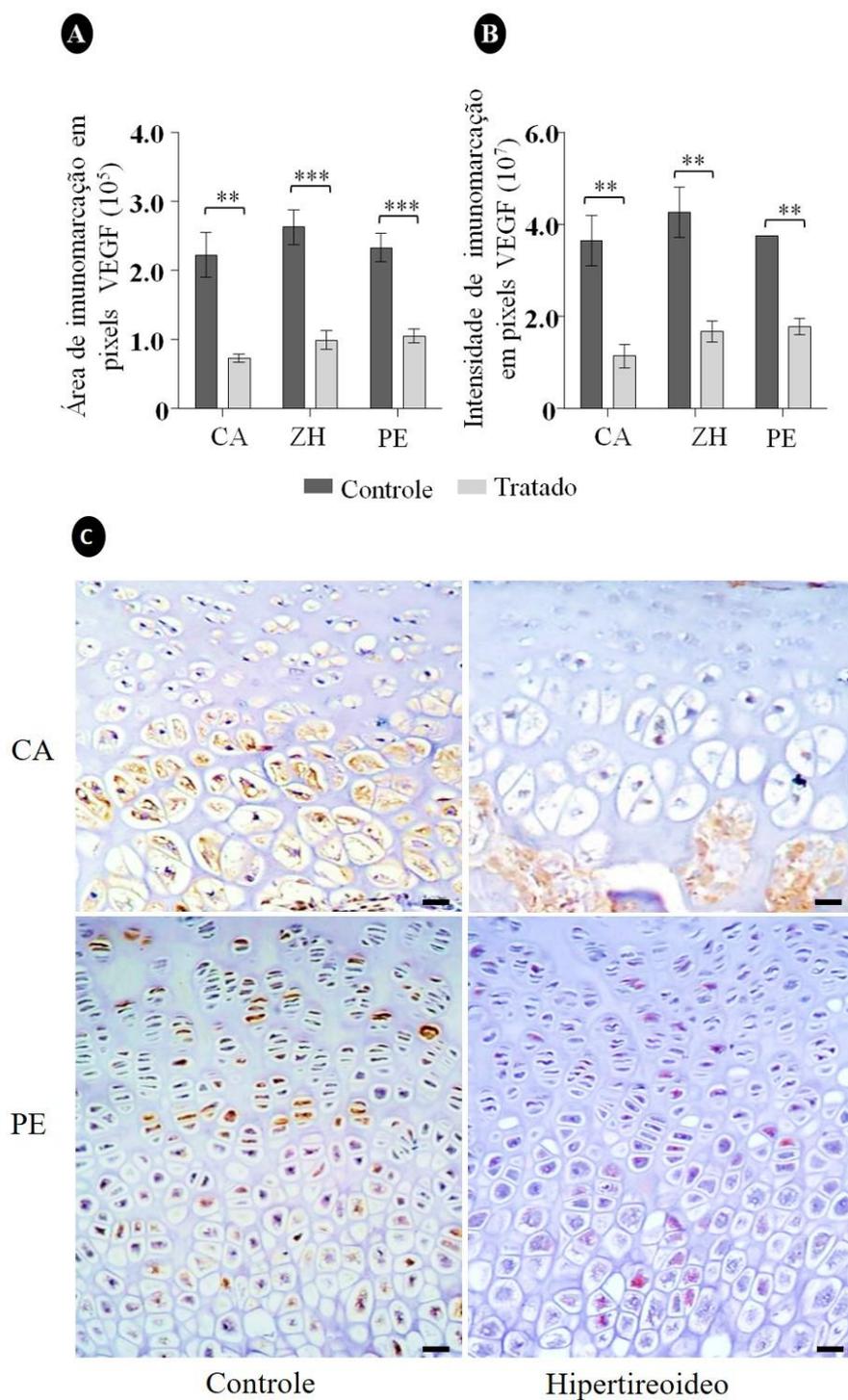


Figura 22. Expressão imunistoquímica de VEGF nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideos. A) Redução da área de expressão do VEGF na cartilagem articular ($P < 0,01$) e zona hipertrófica ($P < 0,01$) e placa epifisária ($P < 0,001$) do grupo tratado em comparação ao controle. B) Redução da intensidade de expressão do VEGF na cartilagem articular ($P < 0,01$) e zona hipertrófica ($P < 0,01$) e placa epifisária ($P < 0,001$) do grupo tratado em comparação ao controle. C) Fotomicroscopia da cartilagem articular e placa epifisária dos fêmures de ratos hipertireoideos e controle, demonstrando imunoexpressão citoplasmática de VEGF em marrom, ilustrando os resultados evidenciados nos gráficos (estreptavidina-biotina-peroxidase, hematoxilina de Harris, barra: 18,5 μm). CA: cartilagem articular; PE: placa epifisária; ZH: zona hipertrófica.

Expressão dos transcritos gênicos para VEGF, Flk-1, Ang1, Ang2 e Tie2

Os ratos hipertireoideos apresentaram redução significativa da expressão de transcritos gênicos para VEGF e Ang1 (Figura 23). Contudo, não foi observada diferença significativa entre grupos com relação à expressão dos demais transcritos, Flk-1, Ang2 e Tie2 (Figura 23).

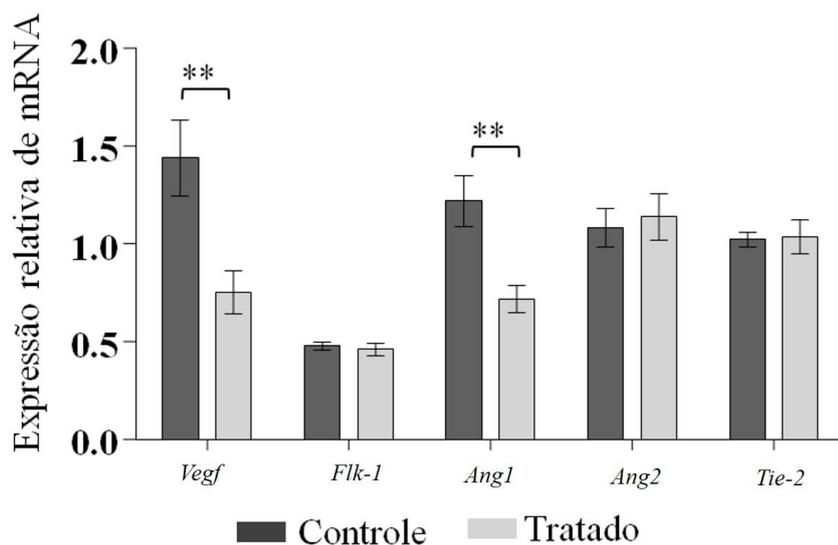


Figura 23. Expressão dos transcritos gênicos para *Vegf*, *Flk-1*, *Ang1*, *Ang2* e *Tie-2* pela técnica de RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideos. Redução da expressão de mRNA para *Vegf* ($p < 0,01$) e *Ang1* ($p < 0,01$) nos ratos hipertireoideos comparados ao grupo controle.

Em resumo, o excesso de tiroxina materna associada ao hipertireoidismo pós-natal pode resultar em diversas alterações na prole em comparação ao grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Efeitos do excesso de T4 na prole com 40 dias em relação ao grupo controle.

		Ratos com 40 dias
Dosagens de T3 total e T4 livre		↑
Histomorfometria tireoide	Diâmetro folículo	↑
	Altura epitélio	↓
Peso (g)		-
Comprimento do fêmur		-
Largura do fêmur		↓
Espessura das cartilagens de crescimento	PE	Total ZR ZP ZH
	CA	Total ZS ZM ZP
		MT
		EP
Imunoistoquímica	% CDC-47	↓
	VEGF	↓
RT-PCR	VEGF	↓
	FLK-1	-
	Ang1	↓
	Ang2	-
	Tie2	-

PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular; MT: metáfise; ZR: zona de repouso; ZP: zona proliferativa; ZH: zona hipertrófica; ZS: zona superficial; ZM: zona média; ZP: zona profunda.

Discussão

No presente estudo, os animais que tiveram contato com o excesso de tiroxina materna, via placenta e leite, e que receberam tiroxina no período do desmame até os 40 dias de idade, apresentaram redução do crescimento em espessura do osso e alteração da espessura das cartilagens de crescimento, associados à redução da proliferação celular e da expressão imunoistoquímica e/ou do transcrito gênico para VEGF e Ang1. Sendo assim, este modelo permitiu esclarecer os efeitos da associação da tiroxina materna com o hipertireoidismo pós-natal no crescimento ósseo de ratos, bem como a gênese dessas alterações no que concerne ao perfil proliferativo e angiogênico.

A eficácia do tratamento com L-tiroxina foi atestada pela determinação da concentração plasmática elevada de T₄ livre nas ratas aos 20 dias de lactação e de T₃ total e T₄ livre na prole tratada com 40 dias de idade. Adicionalmente, as avaliações morfológicas e morfométricas da tireoide da prole também endossou as alterações plasmáticas. O aumento do diâmetro folicular associado à redução do epitélio da tireoide do grupo hipertireoideo são achados similares aos observados em pesquisas que induziram hipertireoidismo em ratos e camundongos adultos (Serakides *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2007). Essas alterações morfológicas são decorrentes do *feedback* negativo exercido pelo excesso de hormônios tireoidianos sobre a glândula (Fisher *et al.*, 2000; Higuchi *et al.*, 2005).

Estudos anteriores demonstraram que as disfunções tireoidianas afetam o crescimento e o desenvolvimento de diversos órgãos (Cooper, 2003). Todavia, não foi observada diferença no peso corporal entre os ratos hipertireoideos e controle. A associação entre baixo peso fetal, ao nascimento e na infância em pacientes com tireotoxicose tem sido relatada (Polak *et al.*, 2006; Männistö *et al.*, 2013), semelhante ao observado em adultos. Sugere-se que esse baixo peso seja devido ao aumento do catabolismo corporal causado pelo excesso de hormônios tireoidianos (Anselmo *et al.*, 2004; Mestman, 1998). Apesar desta associação, nem todos os indivíduos com hipertireoidismo apresentam redução do peso corporal (Männistö *et al.*, 2013). Em alguns casos, as características clínicas da tireotoxicose são discretas e o estado hipertireoideo é evidenciado a partir de exames bioquímicos (Bursell e Warner, 2007).

Resultados do capítulo anterior demonstraram que a prole de ratas hipertireoideas, ao nascimento e ao desmame, apresenta redução do crescimento longitudinal do fêmur. Ao contrário, neste estudo, a largura óssea reduziu, sem alteração do crescimento longitudinal. Em camundongos machos adultos com hipertireoidismo, foi descrito redução na espessura da cortical femoral em decorrência da supremacia do processo de reabsorção frente à aposição óssea (Tsourdi, *et al.*, 2015). Embora não tenha sido escopo deste estudo avaliar a reabsorção óssea, pode-se sugerir que no tecido ósseo trabecular não houve supremacia de nenhum destes dois processos, uma vez que a quantidade de tecido ósseo trabecular foi semelhante entre grupos. No entanto, existe divergência com relação à altura. A taxa de crescimento pode ser variável, havendo aceleração do crescimento nos estágios iniciais, seguido por desaceleração e interrupção final do crescimento, fazendo com que alguns indivíduos apresentem estatura final menor (Bursell e Warner, 2007). Mas, uma avaliação retrospectiva do padrão de crescimento em crianças com tireotoxicose diagnosticadas na fase pré-púbere ou no início da puberdade, concluiu que a curva de crescimento destes pacientes não difere do padrão de crescimento geral da população (Jaruratanasirikul e Sriplung, 2006).

A partir da avaliação histomorfométrica, não houve diferença entre grupos com relação à espessura da placa epifisária e das suas zonas, com exceção da zona proliferativa que apresentou espessura significativamente menor em comparação ao controle. A cartilagem articular dos ratos hipertireoideos também apresentou menor espessura total e de cada uma das suas zonas, quando comparados ao controle. As ações dos hormônios tireoidianos no osso são mediadas pelos receptores dos hormônios tireoidianos, os receptores nucleares TR, os quais são expressos em condrócitos e osteoblastos (Bassett e William, 2003) e osteoclastos (Bassett *et al.*, 2007). Sabe-

se que *in vitro*, há redução na proliferação de condrócitos cultivados em meio com excesso de tiroxina (Böhme *et al.*, 1992; Ohlsson *et al.*, 1992; Robson *et al.*, 2000; Okubo e Reddi, 2003).

Como já era esperado diante da redução da espessura da zona proliferativa das cartilagens de crescimento, a taxa de proliferação dos condrócitos avaliada pela imunoexpressão de CDC-47 foi menor nos animais hipertireoideos, em comparação ao controle. Este resultado pode justificar, pelo menos em parte, o menor tamanho da zona proliferativa nos animais tratados, uma vez que fisiologicamente esta zona é a que apresenta maior proliferação celular na placa epifisária (Romereim *et al.*, 2014). A alteração na estrutura das zonas da placa epifisária também já foi descrita em indivíduos com disfunções tireoidianas (Stevens *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2005; Desjardin *et al.*, 2014), pois T3 é um regulador fundamental para a maturação da cartilagem e expansão clonal da zona de repouso e subsequente diferenciação (Rabier *et al.*, 2006; Bassett *et al.*, 2007). Os condrócitos apresentam comportamentos específicos para regular sua própria morfogênese, exemplificado pela orientação do plano de divisão mitótica e formação da coluna de condrócitos na zona proliferativa. Esta sinalização ocorre através da via Wnt β -catenina, que é crucial para alinhar os planos de divisão e promover a formação das colunas dos condrócitos da zona de proliferação (Topczewski *et al.*, 2001; Li e Dudley, 2009). Já foi descrito que os hormônios da tireoide ativam a via de sinalização Wnt β -catenina em cultivos de condrócitos da placa epifisária de ratos e regulam em parte a diferenciação terminal de condrócitos da placa epifisária (Wang *et al.*, 2007). Desta forma, as alterações na via de sinalização Wnt β -catenina pelos hormônios tireoidianos é uma das hipóteses para explicar a alteração na morfologia da placa epifisária observada nos animais submetidos ao excesso de tiroxina materna e pós-natal.

Ao contrário dos resultados do capítulo anterior no que concerne ao aumento da espessura das trabéculas ósseas e da porcentagem de tecido ósseo trabecular em ratos neonatos e com 20 dias de idade, o excesso de tiroxina não induziu alterações no tecido ósseo trabecular dos ratos com 40 dias de idade. É fato que o hipertireoidismo pode aumentar a quantidade de tecido ósseo quando há supremacia da deposição em relação à reabsorção óssea. No entanto, as consequências desta disfunção sobre o tecido ósseo são variáveis e dependentes de fatores como dose de tiroxina administrada, perfil sérico dos hormônios sexuais, curso da doença (Serakides *et al.*, 2004), sítio ósseo (Suwanwalaikorn *et al.*, 1996; Milne *et al.*, 1998) e idade (Nicholls *et al.*, 2012). Sendo assim, no hipertireoidismo a massa óssea pode estar aumentada, normal ou reduzida (Mundy *et al.*, 1976; Allain *et al.*, 1995; Karga *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2004; Desjardin *et al.*, 2014). Similar aos achados deste estudo, Allain e colaboradores (1995) também não encontraram alteração no volume de osso trabecular em ratos hipertireoideos com seis semanas de idade.

Semelhante ao observado nos animais neonatos e com 20 dias de idade, o excesso de tiroxina reduziu a expressão imunoistoquímica e do transcrito gênico para VEGF nas cartilagens de crescimento dos ratos com 40 dias de idade. Alguns estudos têm demonstrado que o VEGF pode atuar como mediador essencial durante o processo de formação e crescimento ósseos endocondrais, pois apresenta múltiplas funções, não apenas na angiogênese do molde cartilaginoso, mas também em diferentes aspectos do crescimento ósseo (Zelzer e Olsen, 2005; Dai e Rabie, 2007; Berendsen e Olsen, 2014; Liu e Olsen, 2014). Ao contrário do observado na cartilagem, muitas pesquisas correlacionam o hipertireoidismo ao aumento na vascularização em alguns tecidos, como é o caso da adrenal de fetos submetidos ao hipertireoidismo na gestação (Karaca *et al.*, 2015) e tecidos como corpo lúteo (Silva *et al.*, 2013) e placenta (Silva *et al.*, 2015). Durante o crescimento ósseo endocondral, a angiogênese mediada pelo VEGF é importante para a formação e reabsorção da cartilagem, assim como para a mineralização (Carlevaro *et al.*, 2000; Maes *et al.*, 2002). A inativação do VEGF nas cartilagens de crescimento reduz quase que completamente a invasão dos vasos sanguíneos na cartilagem hipertrófica e compromete a formação de osso trabecular, com inibição do crescimento (Gerber *et al.*, 1999).

Não foi observada alteração na expressão gênica de Flk-1, mesmo na presença de menor expressão de VEGF nas cartilagens de crescimento de ratos de 40 dias submetidos ao excesso de tiroxina. Sabe-se que o VEGF atua a partir da ligação com seus receptores de tirosina quinase, VEGFR-1 (Flt1) e VEGFR-2 (Flk-1/KDR) (Ferrara *et al.*, 2003; Dai e Rabie, 2007) e a expressão destes receptores é auto-regulada e estimulada pelo próprio VEGF (Andraweera *et al.*, 2012). Foi constatado que em linhagens de células pré-osteoblásticas, a inibição da ligação entre VEGF-A e B ao VEGFR-1 por tratamento com um bloqueador pode ser compensada pela ligação de VEGF-A, -C e -D ao VEGFR-2, sugerindo o possível envolvimento deste outro receptor na regulação da diferenciação osteogênica (Deckers *et al.*, 2000).

Associada à menor expressão gênica de VEGF houve redução da expressão de Ang1 nos animais tratados. Apesar do VEGF apresentar maior expressão durante o crescimento de osso humano, tanto a Ang1 quanto a Ang2 são coexpressas com o VEGF em locais de ossificação endocondral e de remodelamento ósseo. Na cartilagem, tanto as proteínas quanto a expressão de mRNA para Ang1 e Ang2 aumentam com a diferenciação dos condrócitos. No entanto a Ang2 apresenta maior intensidade de expressão, principalmente nas zonas de proliferação e hipertrófica próximo de vasos sanguíneos (Horner *et al.*, 2001). Durante a vida embrionária e fetal e durante o crescimento pós-natal, a angiogênese ocorre concomitante ao processo de proliferação celular. A vasculatura fornece oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento às células e tecidos (Karaca *et al.*, 2015). Para que isso ocorra, a matriz extracelular das cartilagens de crescimento desempenha função importante na difusão de substâncias, particularmente das moléculas de sinalização e dos fatores de crescimento (Cortes *et al.*, 2009). Desta forma, é possível que a redução dos fatores pró-angiogênicos observados nas cartilagens de crescimento de ratos hipertireoideos possa impedir a difusão de moléculas pela matriz extracelular, alterando a composição da matriz cartilaginosa, como será demonstrado no próximo capítulo.

Conclui-se que o excesso de tiroxina materna associado ao hipertireoidismo pós-natal reduz a largura da diáfise do fêmur e a proliferação celular e a expressão gênica e protéica de VEGF e Ang1 nas cartilagens de crescimento.

CAPÍTULO 4

Efeito do excesso de tiroxina materna e pós-natal na histoquímica, morfometria e expressão de transcritos gênicos da matriz condrogênica de ratos em crescimento

Resumo

O hipertireoidismo materno também pode estar associado ao hipertireoidismo transitório fetal e neonatal ou congênito persistente. T_3 e T_4 influenciam direta e indiretamente a formação, o crescimento e o desenvolvimento geral do esqueleto e podem alterar a composição da matriz extracelular (MEC) da cartilagem. O objetivo deste estudo foi elucidar os efeitos do excesso da tiroxina materna e pós-natal sob a composição da MEC das cartilagens de crescimento de neonatos e de ratos com 20 e 40 dias de idade. Foram utilizadas 16 ratas *Wistar* adultas distribuídas igualmente em dois grupos, tratado com tiroxina e controle. O grupo tratado recebeu diariamente L-tiroxina, por via oral, durante a gestação e a lactação e o grupo controle recebeu água destilada como placebo. Foram coletados aleatoriamente um rato de cada mãe, ao nascimento e aos 20 dias para análises. Outros 8 ratos do grupo de mães tratadas continuaram recebendo tiroxina por via oral e 8 ratos do grupo controle receberam placebo por mais 20 dias, ou seja, até os 40 dias de idade. Foi realizada dosagem plasmática de T_4 livre nas ratas em lactação e na prole com 20 e 40 dias de idade. As tireoides e os fêmures direitos da prole de todas as idades foram processados para análise histomorfométrica. Avaliações histoquímicas pelas colorações de safranina-O, *alcian blue* e PAS foram realizadas nas cartilagens de crescimento distal do fêmur direito. Dos fêmures esquerdos, foram removidos fragmentos da epífise cartilaginosa dos neonatos e da cartilagem articular dos ratos com 20 e 40 dias, para pesquisa da expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Runx2*, *agrecan*, *colágeno I*, *colágeno II*, *caspase 3*, *fostatase alcalina*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Bmp2* pela técnica de RT-PCR em tempo real. As médias entre grupos foram comparadas pelo teste T de *student*. As concentrações plasmáticas de T_4 livre foram significativamente mais elevadas nas ratas tratadas e na prole com 40 dias. A altura do epitélio folicular da tireoide foi significativamente menor nos grupos tratados de todas as idades. O diâmetro dos folículos foi significativamente maior somente nos ratos com 40 dias. A histomorfometria revelou maior porcentagem de matriz e menor porcentagem de condrocitos por área da epífise cartilaginosa dos neonatos e da cartilagem articular dos ratos com 40 dias de idade dos grupos tratados. O excesso de tiroxina materna e pós-natal esteve associado ainda à redução da intensidade de coloração e das áreas da cartilagem coradas pelo *alcian blue*, PAS e safranina O e à redução da expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Mmp2*, *Mmp9*, *colágeno II* e *Bmp2* nas cartilagens de crescimento da prole de todas as idades. Mas, o excesso de tiroxina alterou de forma diferenciada e dependente da idade, a expressão dos transcritos gênicos para *Runx2*, *agrecan*, *colágeno I* e *caspase 3*. Conclui-se que o excesso de tiroxina influencia a composição da MEC das cartilagens de crescimento, por reduzir a quantidade de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e dos transcritos gênicos para *Sox9*, *MMP9*, *colágeno II* e *BMP2* em todas as idades, e por alterar de forma diferenciada, de acordo com a idade, a expressão dos transcritos para *Runx2*, *agrecan*, *colágeno I*, *MMP2* e *caspase*.

Palavras-chave: hipertireoidismo, tiroxina, cartilagem de crescimento, matriz extracelular, rato.

Introdução

A prevalência das disfunções tireoidianas é elevada em mulheres, particularmente em idade fértil. Em gestantes, apesar de menos frequentes, as doenças da tireoide vêm sendo cada vez mais diagnosticadas (Fernández, 2013). O hipertireoidismo materno também pode estar associado ao hipertireoidismo transitório fetal e neonatal (Péter e Muzsnai, 2011) ou congênito persistente (Polak *et al.*, 2006). Este fato é de grande relevância, uma vez que os hormônios

tireoidianos maternos têm ação crítica sobre a formação e o crescimento ósseos. Assim, alterações na concentração hormonal materna podem refletir em anormalidades no feto (Medici *et al.*, 2013) e em alterações do crescimento ósseo, como demonstrado nos capítulos anteriores.

T₃ e T₄ influenciam direta e indiretamente o crescimento, a formação do centro de ossificação e o desenvolvimento geral do esqueleto (Burch e Lebovitz, 1982; Bassett e Williams, 2009; Nicholls *et al.*, 2012). Além disso, estes hormônios também atuam sob a composição e a estrutura da matriz extracelular (MEC) (Luegmayr *et al.*, 1996; Fratzl-Zelman *et al.*, 1997), importantes para a diferenciação das células (Streuli, 1999). Entretanto, os mecanismos pelos quais os hormônios tireoidianos atuam sob a MEC cartilaginosa ainda são pouco conhecidos (Burch e Lebovitz, 1982). Sabe-se que T₃ estimula a expansão clonal dos condrócitos em repouso e a subsequente diferenciação deles em condrócitos hipertróficos, os quais estão envolvidos na síntese de glicosaminoglicanos e de colágeno X (Miura *et al.*, 2002a).

A MEC do tecido cartilaginoso é composta por proteínas colágenas e não colágenas. Por meio dos proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteases e glicosidades, desempenha papel importante no controle da proliferação e da diferenciação celular (Roughley, 2006; Souza e Pinhal, 2011). Os proteoglicanos são compostos por um núcleo proteico no qual se liga uma ou mais cadeias de polissacarídeos altamente sulfatados, os glicosaminoglicanos (GAG). A proporção de proteoglicanos e GAG na MEC pode regular a distribuição e a capacidade de ligação de várias moléculas de sinalização (Esko e Selleck, 2002; Perrimon e Hacker, 2004).

Devido à característica avascular da cartilagem, a estrutura da MEC é importante para a difusão de substâncias (Cortes *et al.*, 2009), de forma que ela não representa uma estrutura passiva e sim uma zona dinâmica, com interação entre os condrócitos e diversas moléculas, como as proteínas da MEC. Estas são capazes de se ligar diretamente aos receptores da superfície celular e iniciar as vias de transdução de sinal para modular ou desencadear a ação dos fatores de crescimento e de diferenciação (Streuli, 1999).

Assim, uma das hipóteses é que o excesso de tiroxina possa interferir na composição da MEC cartilaginosa, sendo esse mais um dos mecanismos pelo qual ocorre redução do crescimento ósseo. Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do excesso de tiroxina materna e pós-natal nas atividades de síntese da matriz extracelular das cartilagens de crescimento de ratos neonatos, ao desmame e no pós-desmame, baseado na histoquímica e morfometria da matriz cartilaginosa e na expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Runx2*, *agrecan*, *colágeno I*, *colágeno II*, *caspase3*, *fostatase alcalina*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Bmp2*.

Material e métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo n.º. 47/2014) (Anexo 1).

Acasalamento e administração de tiroxina

Foram utilizadas 16 ratas *Wistar* com dois meses de idade (Figura 24), alojadas em caixas plásticas (quatro ratas/caixa) e recebendo ração comercial e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após adaptação de duas semanas, as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para determinar a fase do ciclo estral (Marcondes *et al.*, 2002). As ratas em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas, numa proporção de duas fêmeas para cada macho. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal e esse dia foi considerado dia 0 de gestação (Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Após a cópula, as fêmeas foram mantidas individualmente em caixas plásticas.

A partir do primeiro dia de gestação, as ratas foram distribuídas nos grupos tratado e controle, com oito animais cada. As ratas tratadas receberam diariamente L-tiroxina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 5 mL de água destilada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Serakides *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2013) (Anexo 2), por toda a gestação e lactação. Para as fêmeas controle, foi fornecido como placebo 5 mL de água destilada, por sonda oro-gástrica, durante todo o período experimental.

Da prole de cada rata, foram separados e eutanasiados três ratos, sendo um ao nascimento e o segundo filhote ao desmame, ou seja, aos 20 dias de idade. O terceiro filhote com 20 dias de idade foi desmamado e recebeu diariamente L-tiroxina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal/dia, diluída em 1 ml de água destilada, por mais 20 dias. O grupo controle recebeu apenas água destilada como placebo. Dessa forma foram constituídos seis grupos experimentais: 1) neonatos de ratas tratadas com L-tiroxina (n=8), 2) neonatos de ratas controle (n=8), 3) ratos com 20 dias, filhos de ratas tratadas com L-tiroxina (n=8) e 4) ratos com 20 dias, filhos de ratas controle (n=8), 5) ratos tratados com 40 dias (n=20) e 6) ratos controle com 40 dias de idade (n=20). A eutanásia foi realizada por punção cardíaca precedida por anestesia com xilazina (40 mg/Kg/IP) e quetamina (10 mg/Kg/ IP).

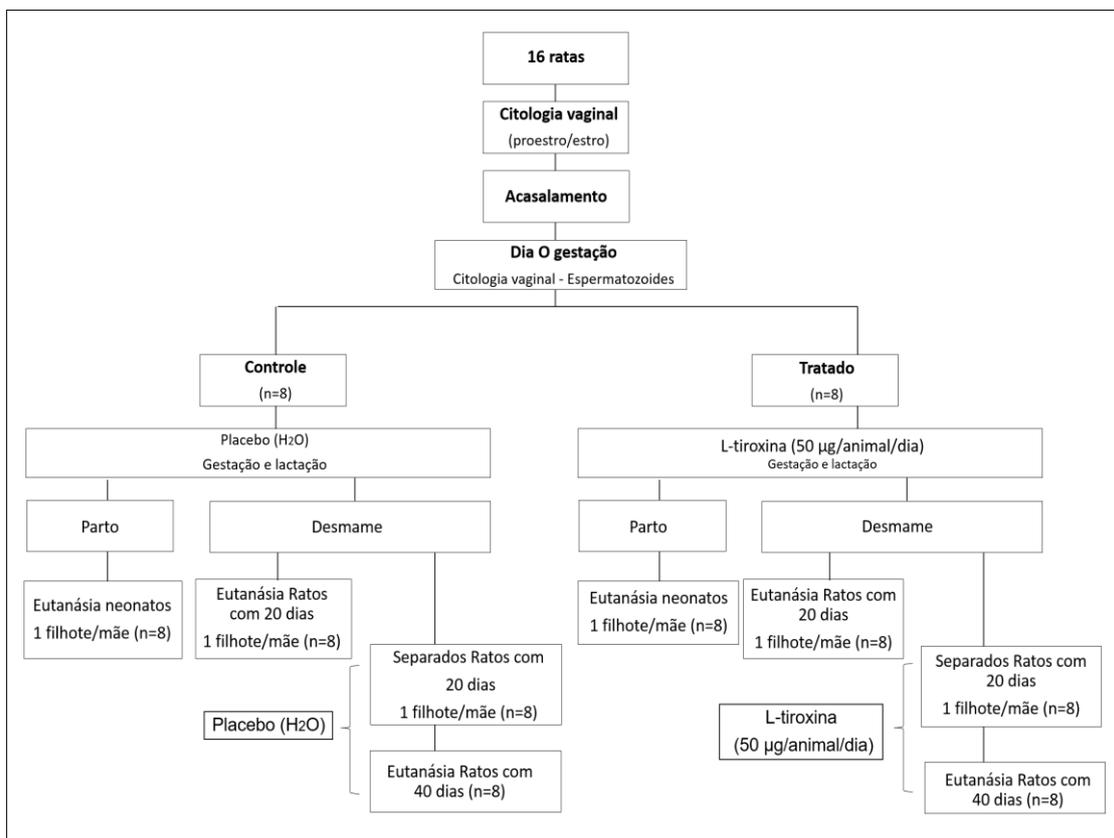


Figura 24. Organograma do manejo reprodutivo, indução do hipertireoidismo e seleção da prole nos grupos controle e tratado com L-tiroxina.

Dosagem plasmática de T₄ livre

Ao desmame, o sangue das ratas em lactação e dos ratos com 20 e 40 dias de idade foi colhido por punção cardíaca em tubos contendo heparina, seguido de centrifugação, para obtenção do plasma e armazenado a -20°C. A dosagem de T₄ livre foi realizada usando a técnica de ELISA de quimioluminescência (IMMULITE, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, PA, EUA) (sensibilidade: 0,4 ng/dl) em sistema totalmente automático (Serakides *et al.*, 2004; Serakides *et al.*, 2008).

Processamento e análise histomorfométrica da tireoide

As tireoides dos neonatos e dos ratos com 20 e 40 dias de idade foram dissecadas, fixadas em formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico e processadas de acordo com a técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4µm foram coradas pela técnica da HE para avaliação morfométrica.

Foram mensurados, ao acaso, em cada tireoide, os diâmetros maior e menor de 30 folículos, obtendo-se a média destas medidas. Esta mensuração foi realizada em uma secção histológica por animal com auxílio de uma ocular micrométrica com régua acoplada ao microscópio em objetiva de 40x. A altura do epitélio foi mensurada em 20 folículos. Em cada folículo, o epitélio foi mensurado em quatro pontos equidistantes, obtendo-se o valor médio das quatro medidas. Esta mensuração foi realizada com auxílio de uma ocular com régua, acoplada ao microscópio em objetiva de 100x. Os valores obtidos para o diâmetro e altura do epitélio, foram transformados em micrômetros utilizando-se a escala de uma lâmina micrométrica (Serakides *et al.*, 2000).

Processamento histológico, análise morfométrica e histoquímica das cartilagens de crescimento

De todos os ratos dos seis grupos experimentais, foram dissecados e colhidos o fêmur direito para processamento histológico. As amostras foram fixadas em formalina 10% neutra e tamponada com fosfato de sódio monobásico e dibásico por no máximo 48 horas. As amostras foram submetidas à descalcificação, pela utilização de duas soluções diferentes. Na primeira solução, constituída por EDTA (0,7g), tartarato de sódio e potássio (8g), tartarato de sódio (0,14g), ácido clorídrico (120mL) e água destilada (900mL), os ossos permaneceram por 24h. Posteriormente, os ossos foram colocados numa segunda solução de EDTA a 10% dissolvido em água destilada com troca da solução uma vez por semana, até completa descalcificação (Pitol *et al.*, 2007), ou seja, por 15 e 20 dias para os ossos dos ratos com 20 dias e ratos com 40 dias, respectivamente (Anexo 3). Completada a descalcificação, os ossos foram seccionados longitudinalmente, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (Anexo 4) e submetidos à microtomia para obtenção de secções histológicas de 4µm. Foram realizadas as colorações por HE (Anexo 5), safranina-O para marcação de proteoglicanos (Anexo 11), *alcian blue* para GAG sulfatados (Anexo 12) e ácido periódico de *Schiff* para glicogênio e mucosubstâncias (PAS) (Anexo 13).

Foi determinada a porcentagem de núcleo e de lacunas de condrócitos por área na epífise cartilaginosa distal do fêmur dos neonatos e na cartilagem articular e placa epifisária dos ratos de 20 e 40 dias. Essa análise foi realizada em secções histológicas coradas pela técnica de HE, com o auxílio de uma graticula com 121 pontos acoplada a ocular de um microscópio óptico com objetiva de 40x.

As análises histoquímicas foram realizadas em toda a extensão das cartilagens de crescimento do fêmur dos grupos tratados e controle dos ratos ao nascimento, aos 20 e 40 dias. Para as secções histológicas coradas pelo *alcian blue* e PAS, foram avaliados 10 campos/secção histológica em objetiva de 40x por meio de imagens capturadas pelo microscópio Leica DM

4000B com câmera digital acoplada. Determinou-se a área e a intensidade da coloração em *pixels* usando o software WCIF Image J® (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, EUA). A avaliação da safranina-O foi realizada a partir da análise qualitativa, pela intensidade da coloração vermelho alaranjada (discreto, moderado e intenso) na cartilagem articular e placa epifisária.

Expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento

A quantificação relativa da expressão de Sox9, Runx2, agrecan, colágeno I, colágeno II, caspase3, fostatase alcalina, MMP2, MMP9 e BMP2 foi realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real em toda a epífise cartilaginosa do fêmur esquerdo dos neonatos e fragmentos na cartilagem articular do fêmur esquerdo dos ratos com 20 e 40 dias de idade. Esses fragmentos foram coletados em trizol, congelados imediatamente em nitrogênio líquido por 2h e posteriormente armazenados a -80°C. A extração do mRNA da cartilagem foi realizada pelo uso do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância por espectrofotometria a 260/280nm (Anexo 8). Para as reações de transcrição reversa foi utilizado Kit comercial *SuperScript® III First-Strand Synthesis Super Mix* qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sendo utilizados 10µL de 2x RT reaction MIX, 2µL de RT enzyme MIX, 6µL de água DEPC livre de RNase e 2µL de RNA contendo 0,5µg de RNA/µL para um volume final de 20µL. A transcrição reversa foi realizada em um termociclador com a programação de 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1µL de RNase H por microtubo e novamente colocado no termociclador por 20 minutos a 37°C (Anexo 9). Para as reações de PCR em tempo real foram utilizados 2,5 µL de cDNA, 1,0 µL de cada iniciador, 1,0 µL de ROX, 7 µL de água DEPC livre de RNase e 12,5µL do reagente *Sybr Green* em um volume final de 25 µL de reação no aparelho *7500 Real-Time PCR System*. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos (Anexo 10). Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 5). A expressão gênica foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de beta actina (*Actina-β*) *Rattus norvegicus*.

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foi determinada a média e o desvio padrão. Foi realizada a comparação das médias pelo teste t de *student* pelo pacote computacional GraphPad Prism 6. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$ (Sampaio, 2002).

Tabela 5. Iniciadores dos transcritos gênicos delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus*

Transcritos gênicos	Iniciadores	Nº de acesso
Sox9	Forward primer CCGATCTGAAGAAGGAGAGC Reverse primer GTTCTTCACCGACTTCCTCCG	NW_0473432
Runx2	Forward primer GCGTCAACACCATCATTCTG Reverse primer CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348
Agrecan	Forward primer CACACGCTACACACTGGACT Reverse primer TCACACTGGTGGGAAGCCATC	NM_022190.1
Col I	Forward primer GCAAGGTGTTGTGCGATGACG Reverse primer GGGAGACCACGAGGACCAGAG	NM_000088
Col II	Forward primer GTTCACGTACACTGCCCTGA Reverse primer AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	NM_012929.1
Caspase3	Forward primer TGGAGGAGGCTGACCGCAA Reverse primer CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT	NM_012922.2
Fostatase alcalina	Forward primer CTAGTTCCTGGGAGATGGTA Reverse primer GTGTTGTACGTCTTGGAGAGA	AC_000073.1
MMP2	Forward primer TGGGCCCTCCCCTGATGCTG Reverse primer AGCAGCCCAGCCAGTCCGAT	NM_031054.2
MMP9	Forward primer TGCACCACCTTACCGGCCCT Reverse primer CAGCGCCCCGACGCACAGTAA	NM_031055.1
BMP2	Forward primer TAGTGACTTTTGGCC ACGACG Reverse primer GCTCCGCTGTTTGTGTTTG	NM_017178
Actina- β	Forward primer TCCACCCGCGAGTACAACCTTCTT Reverse primer CGACGAGCGCAGCGATATCGT	NM_031144.2

Resultados

Concentrações plasmáticas de tiroxina e histomorfometria da tireoide

O tratamento com L-tiroxina elevou significativamente as concentrações plasmáticas de T₄ livre nas ratas mães com 20 dias de lactação e na prole com 40 dias de idade, comparados aos respectivos grupos controle. Nos ratos com 20 dias de idade, não houve diferença significativa nas concentrações de T₄ entre os grupos (Figura 25A). Sinais de hiperatividade e agressividade foram evidenciados em todos os ratos do grupo tratado com 20 e 40 dias de idade.

As tireoides dos neonatos e dos ratos com 20 dias de todos os grupos apresentaram folículos redondos ou ovais e com diâmetros variados. Nos ratos com 40 dias tratados, a maioria dos folículos apresentava diâmetro grande e diferenças significativas no diâmetro foram observadas apenas nos ratos tratados com 40 dias que apresentaram tireoides com diâmetro folicular significativamente maior em comparação ao controle (Figura 25B). Independente da idade, todos os grupos tratados apresentavam tireoides com folículos revestidos predominantemente por epitélio achatado e significativamente mais baixo em comparação ao controle da mesma idade (Figura 25C).

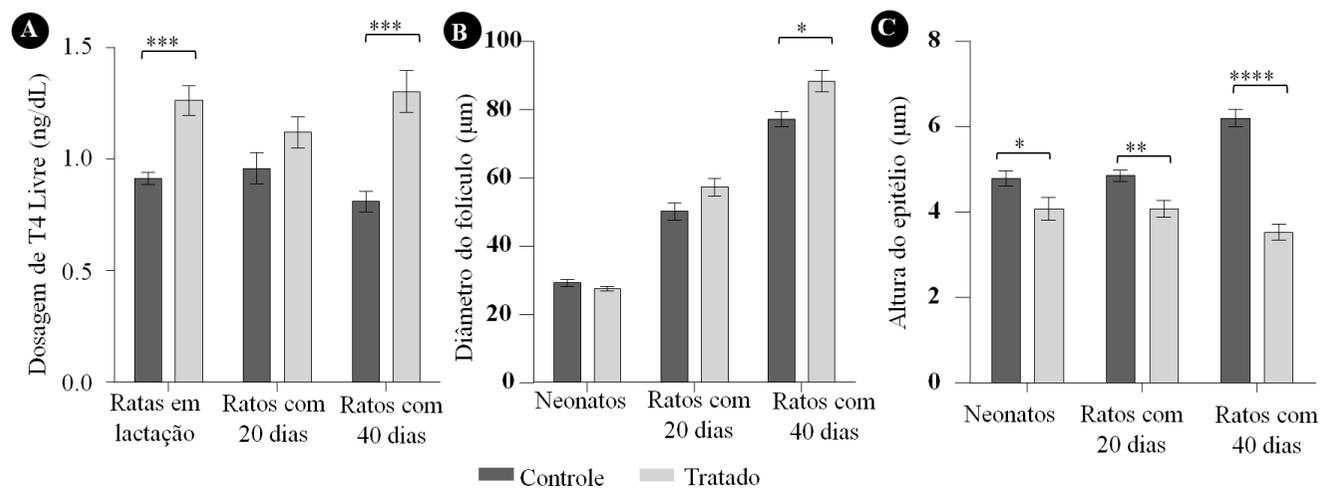


Figura 25. A) Concentrações plasmáticas de T₄ livre (média±SD) ao final da lactação das ratas controle e tratadas com L-tiroxina e da prole com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado. Aumento nas concentrações plasmáticas de T₄ livre (P<0,001) nas ratas tratadas e nos ratos com 40 dias de idade que receberam tiroxina (P<0,001). B) Aumento do diâmetro folicular nos ratos tratados com 40 dias (p>0,05). C) Redução da altura do epitélio folicular da tireoide nos ratos tratados de todas as idades (P<0,0001).

Análise histomorfométrica e histoquímica das cartilagens de crescimento

A porcentagem de condrócitos por área foi significativamente menor na epífise cartilaginosa do fêmur dos neonatos e na cartilagem articular dos ratos tratados com 40 dias de idade dos grupos tratados, em comparação com os respectivos grupos controle (Figura 26).

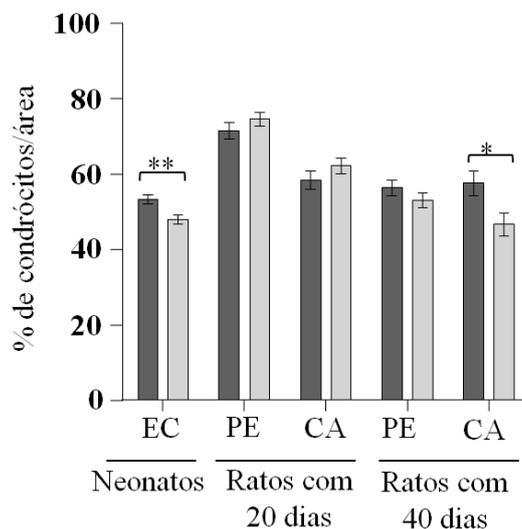
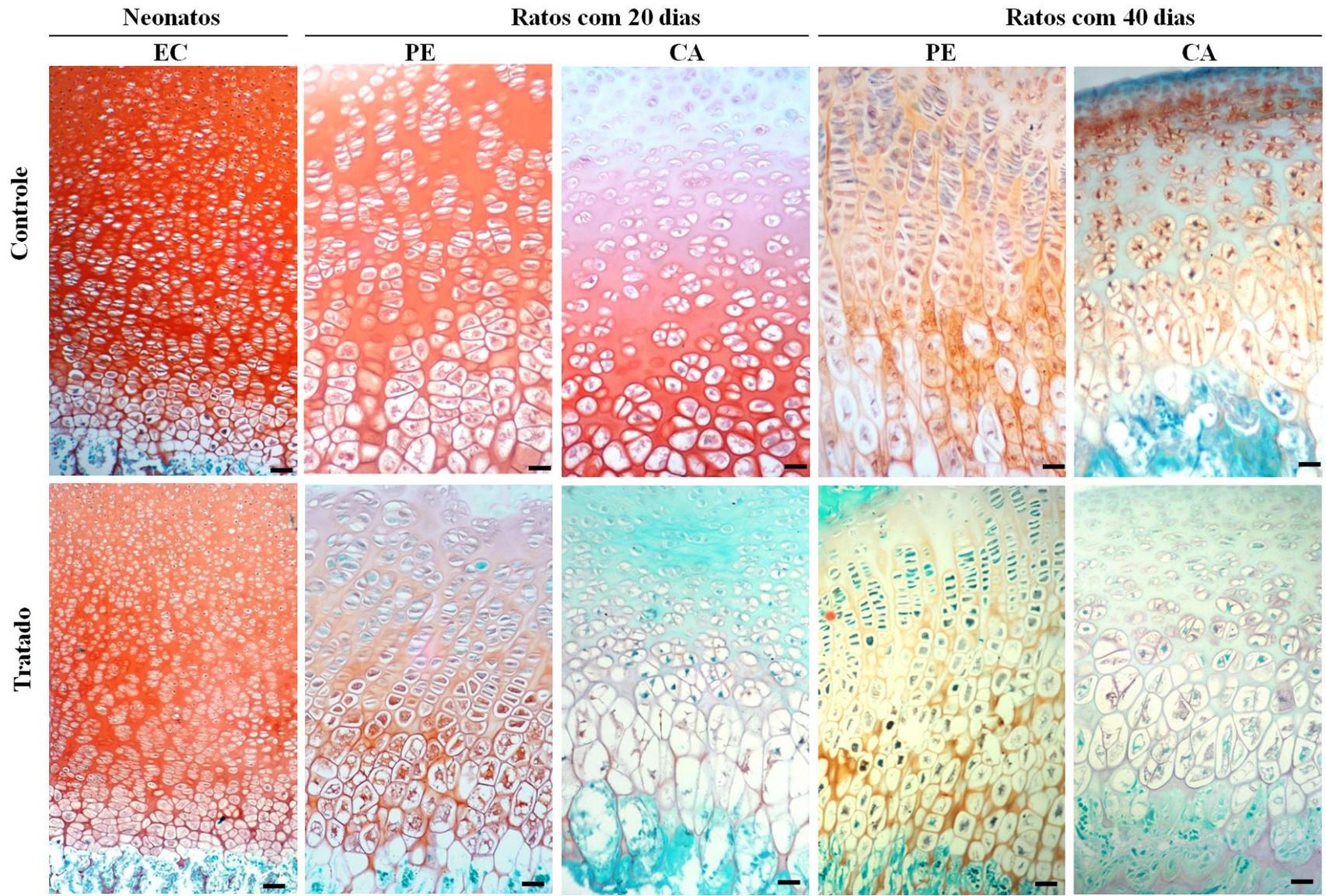


Figura 26. Histomorfometria das cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina. Redução na porcentagem de condrócitos por área na epífise cartilaginosa dos neonatos ($P < 0,01$) e na cartilagem articular dos ratos com 40 dias de idade dos grupos tratados ($P < 0,05$). EC: epífise cartilaginosa; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular.

Na avaliação qualitativa pela safranina-O, a coloração vermelha alaranjada foi intensa na epífise cartilaginosa dos neonatos do grupo controle e moderada no grupo tratado. Na cartilagem articular e na placa epifisária dos ratos com 20 e 40 dias de idade, a coloração vermelha alaranjada variou de discreta a moderada no grupo controle. Já nos grupos tratados, a intensidade da coloração vermelho alaranjada era predominantemente discreta. Havia ainda áreas multifocais coradas de verde na placa epifisária de dois ratos com 20 dias e de três ratos com 40 dias e na cartilagem articular de todos os animais do grupo tratado com 20 e 40 dias (Figura 27). Estes resultados indicam redução no teor de glicosaminoglicanos nas cartilagens de crescimento dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle de mesma idade.

Figura 27. Histoquímica pela coloração de safranina-O das cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina. Intensidade da coloração vermelho alaranjado reduzida nos animais dos grupos tratados independente da idade. barra: 40 µm. EC: epífise cartilaginosa; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular; ZH: zona hipertrófica.



A coloração pelo *alcian blue* revelou epífises cartilaginosas dos neonatos de ambos os grupos com matriz extracelular corada em azul claro e bordas lacunares dos condrócitos coradas de azul mais escuro com relação à matriz. No entanto, os ratos neonatos do grupo tratado apresentaram redução significativa da intensidade de coloração da matriz, com áreas coradas em azul-claro intercaladas com áreas desprovidas de coloração. Nos ratos com 20 e 40 dias de idades, independente do grupo, a cartilagem articular apresentava matriz extracelular azul clara e azul mais intenso na borda lacunar e no citoplasma dos condrócitos. Na placa epifisária, a matriz extracelular corou-se de forma homogênea e mais intensa na zona proliferativa, onde a intensidade de coloração era maior na borda lacunar e no citoplasma dos condrócitos. A avaliação morfométrica em todas as idades, revelou redução significativa da área e da intensidade da coloração pelo *alcian blue* nos grupos tratado quando comparados aos grupos controle da mesma idade (Figura 28).

Pela coloração de PAS, as epífises cartilaginosas dos neonatos do grupo controle apresentavam citoplasma, lacunas de condrócitos e algumas regiões da matriz coradas fortemente pelo PAS. Nos ratos com 20 e 40 dias do grupo controle, na cartilagem articular e na placa epifisária, a coloração PAS positiva foi fortemente observada no citoplasma dos condrócitos e em áreas multifocais da matriz. Os locais corados pelo PAS foram semelhantes entre grupos. No entanto, pela avaliação morfométrica, foi observada significativa redução da intensidade de coloração e da área PAS positiva na epífise cartilaginosa dos neonatos e na placa epifisária e cartilagem articular dos ratos com 20 e 40 dias de idade dos grupos tratados, em comparação ao controle da mesma idade (Figura 29).

Expressão dos transcritos gênicos por RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento

Os neonatos do grupo tratado apresentaram redução significativa da expressão de mRNA para *Sox9*, *fosfatase alcalina*, *Mmp2*, *Mmp9*, *colágeno II* e *Bmp2*, além de aumento de *Runx2* e *colágeno I* na epífise cartilaginosa, quando comparados ao controle. Não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica para *agrecan* e *caspase3* (Figura 30A).

A cartilagem articular dos ratos com 20 dias de idade apresentou redução significativa da expressão de mRNA para *Runx2*, *Sox9*, *caspase3*, *fosfatase alcalina*, *Mmp9*, *colágeno I*, *colágeno II* e *Bmp2* em comparação ao controle. Não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica de *agrecan* e *Mmp2* (Figura 30B).

Nos ratos com 40 dias de idade houve redução significativa da expressão de mRNA para *Runx2*, *Sox9*, *agrecan*, *caspase3*, *fosfatase alcalina*, *Mmp9*, *colágeno II* e *Bmp2*. Não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica de colágeno I e MMP2 (Figura 30C).

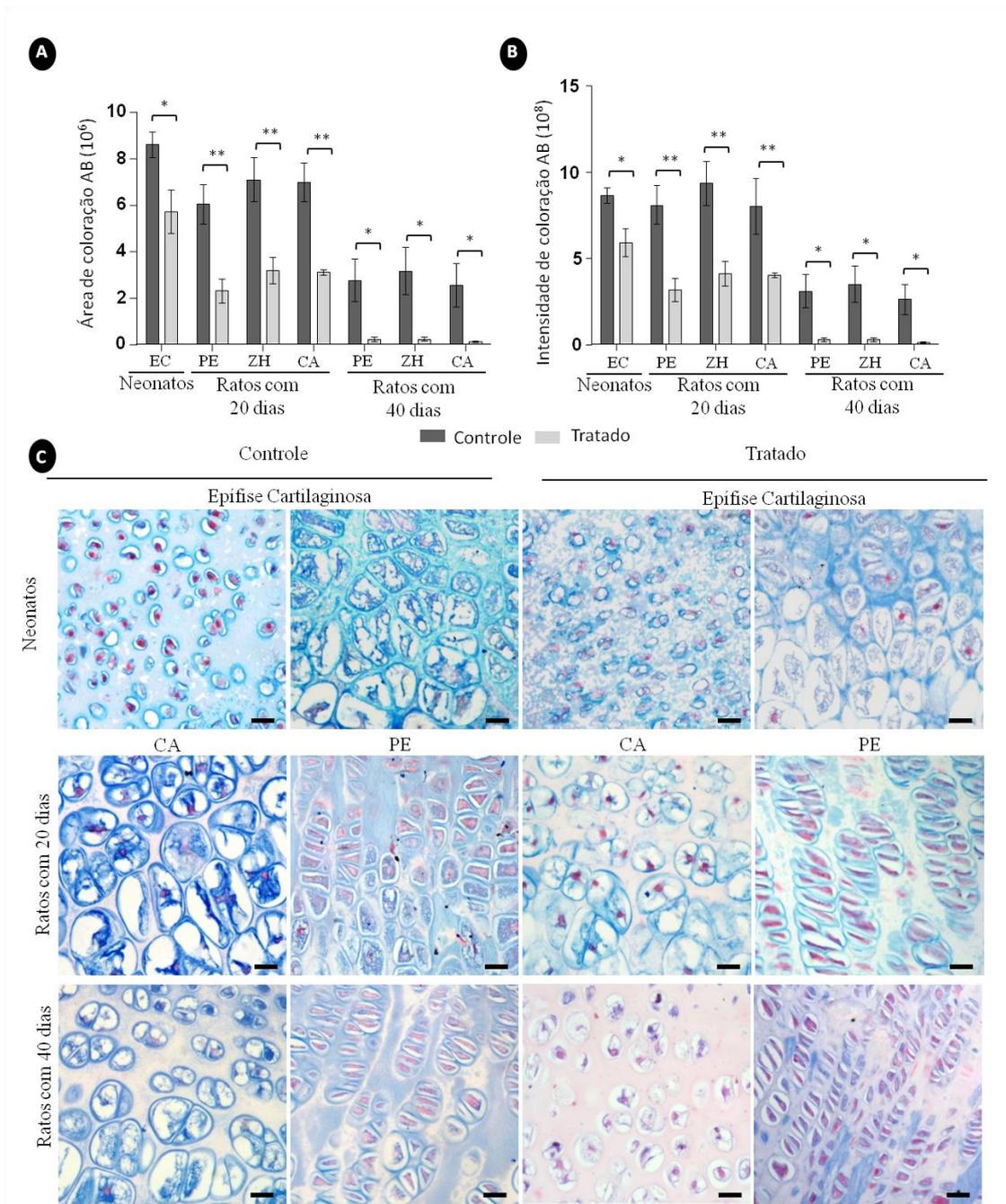


Figura 28. Histoquímica pela coloração de *alcian blue* nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina. A) Grupos tratados com redução da área de coloração na epífise dos neonatos ($p > 0,05$), na cartilagem articular, placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 20 dias ($P < 0,001$) e na cartilagem articular, placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 40 dias ($p > 0,05$). B) Grupos tratados com redução da intensidade de coloração na epífise cartilaginosa dos neonatos ($p > 0,05$), na cartilagem articular, placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 20 dias ($P < 0,001$) e na cartilagem articular, placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 40 dias ($p > 0,05$). C) Fotomicroscopia demonstrando as alterações observadas nos gráficos. barra: 30 μ m. EC: epífise cartilaginosa; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular; ZH: zona hipertrófica.

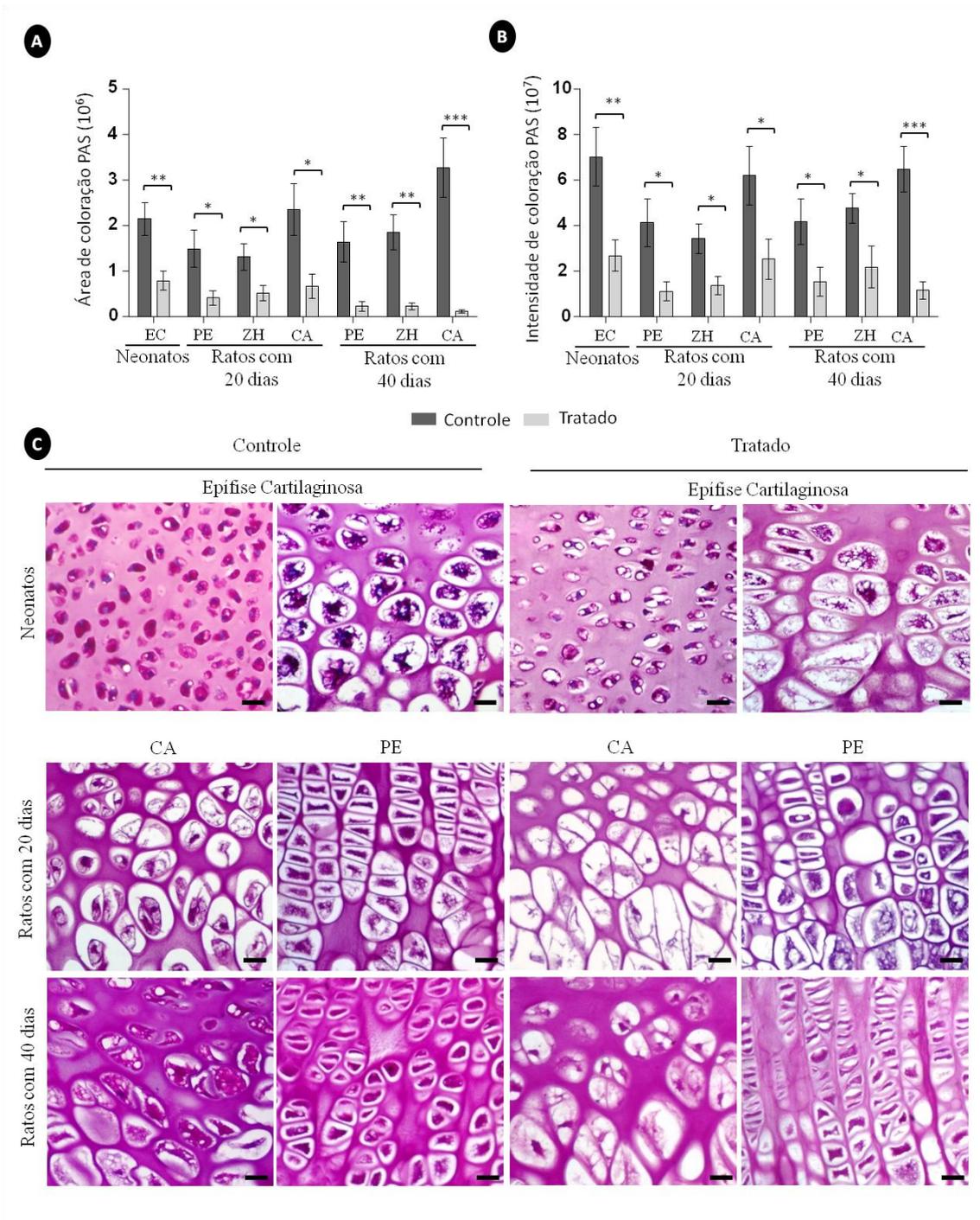


Figura 29. Histoquímica pela coloração de PAS das cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures dos ratos neonatos e com 20 e 40 dias de idade dos grupos controle e tratado com L-tiroxina. A) Grupos tratados com redução da área de coloração na epífise dos neonatos ($P < 0,001$), na cartilagem articular, placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 20 dias ($p > 0,05$) e na cartilagem articular ($P < 0,0001$), placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 40 dias ($P < 0,001$). B) Grupos tratados com redução da intensidade de coloração na epífise cartilaginosa dos neonatos ($P < 0,001$), na cartilagem articular, placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 20 dias ($p > 0,05$) e na cartilagem articular ($P < 0,0001$), placa epifisária e zona hipertrófica dos ratos com 40 dias ($p > 0,05$). C) Fotomicroscopia demonstrando as alterações observadas nos gráficos. barra: $30\mu\text{m}$. EC: epífise cartilaginosa; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular; ZH: zona hipertrófica.

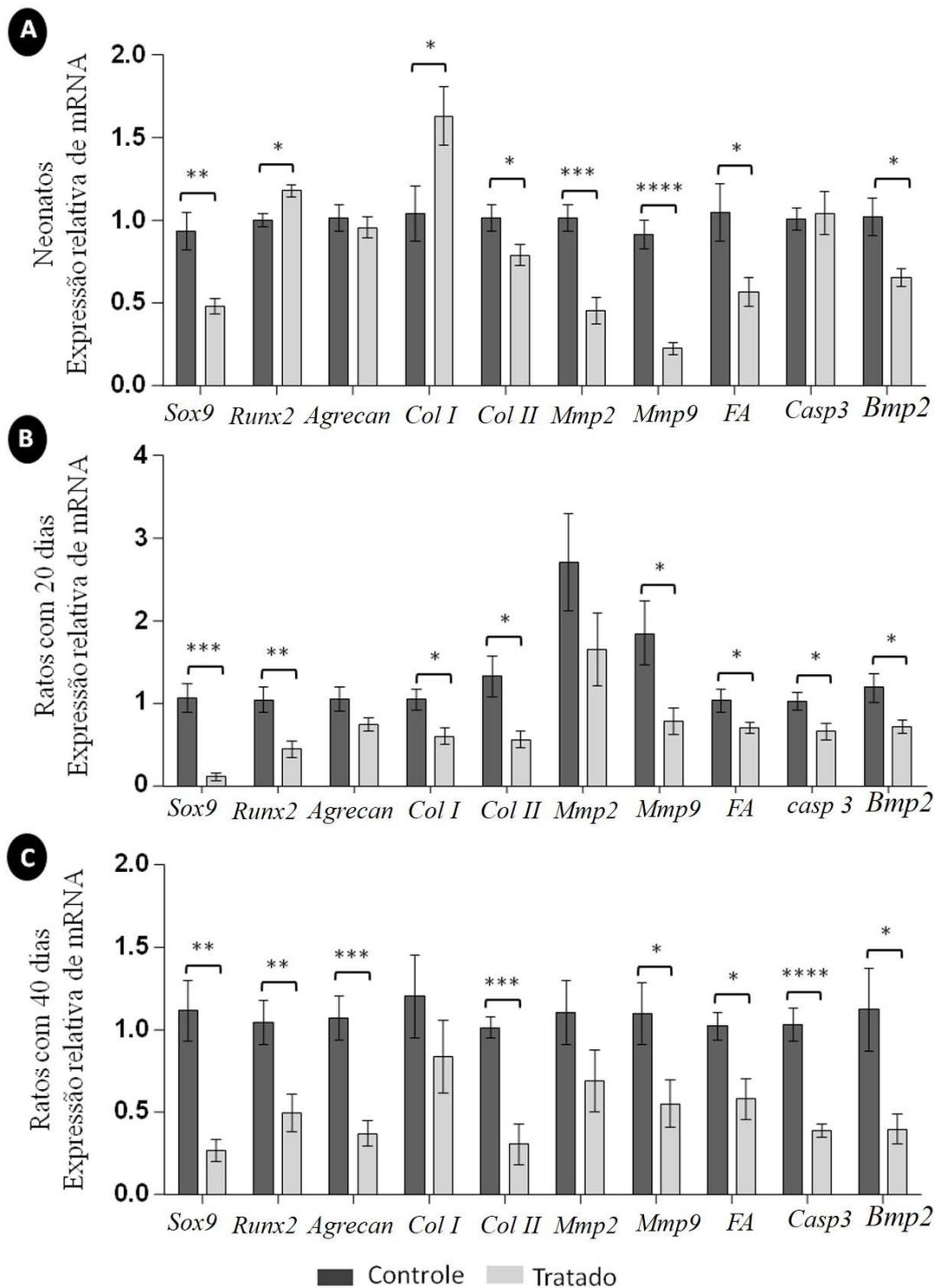


Figura 30. Expressão dos transcritos gênicos para *Sox9*, *Runx2*, *Agrecan*, colágeno I, colágeno II, *caspase3*, *Fostatase alcalina*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Bmp2* pela técnica de RT-PCR em tempo real nas cartilagens de crescimento da região distal dos fêmures de ratos controle e hipertireoideos. A) Neonatos tratados com redução da expressão de mRNA para *Sox9*, *Fosfatase alcalina*, *MMP2*, *MMP9*, colágeno II e *BMP2*, e aumento de *Runx2* e colágeno I na epífise cartilaginosa. B) Ratos com 20 dias tratados com redução da expressão de mRNA para *Sox9*, *caspase3*, *fosfatase alcalina*, *Mmp9*, colágeno I, colágeno II e *Bmp2* na cartilagem articular. C) Ratos com 40 dias tratados com redução da expressão de mRNA para *Runx2*, *Sox9*, *agrecan*, *caspase3*, *fosfatase alcalina*, *Mmp9*, colágeno II e *Bmp2*

Em resumo, o excesso de tiroxina materna durante a gestação e lactação ou associado ao hipertireoidismo pós-natal pode resultar em diversas alterações na prole em comparação ao grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 6. Efeitos do excesso de T₄ na prole ao nascimento, aos 20 e 40 dias em relação ao grupo controle.

		Neonatos	Ratos com 20 dias	Ratos com 40 dias
Dosagem T4 Livre		-	-	↑
Histomorfometria tireoide	Diâmetro folículo	-	-	↑
	Altura epitélio	↓	↓	↓
% de condrócitos/área	EC	↓		
	PE		-	-
	CA		-	↓
Histoquímica	Safranina-O	↓	↓	↓
	<i>Alcian blue</i>	↓	↓	↓
	PAS	↓	↓	↓
RT-PCR	Sox9	↓	↓	↓
	MMP9	↓	↓	↓
	Fostatase alcalina	↓	↓	↓
	BMP2	↓	↓	↓
	Colágeno II	↓	↓	↓
	MMP2	↓	-	-
	Caspase 3	-	↓	↓
	Agrecan	-	-	↓
	Runx2	↑	↓	↓
	Colágeno I	↑	↓	-

EC: epífise cartilaginosa; PE: placa epifisária; CA: cartilagem articular.

Discussão

Os resultados apresentados demonstram a influência do excesso de tiroxina materna e pós-natal na composição da MEC cartilaginosa. O excesso de tiroxina materna e pós-natal foi confirmado pela dosagem hormonal nas mães e na prole com 40 dias de idade, com consequente redução do epitélio dos folículos da tireoide em toda a prole de todas as idades. As consequências do excesso de tiroxina materna sob a tireoide da prole de ratos resultando em achatamento do epitélio folicular já foi relatada, possivelmente em decorrência da transferência passiva de T₄ materna, através da placenta ou do leite, e da redução de TSH que pode indiretamente reduzir a altura do epitélio folicular devido à perda do efeito estimulador do hormônio da tireoide (Ahmed *et al.*, 2010).

A histomorfometria das cartilagens de crescimento revelou menor porcentagem de células por área na epífise cartilaginosa dos neonatos e na cartilagem articular dos ratos com 40 dias dos grupos tratados. Acredita-se que esta redução da celularidade pode ter ocorrido pela menor proliferação celular decorrente da ação dos hormônios tireoidianos (Stevens *et al.*, 2000; Okubo e Reddi, 2003; Staines *et al.*, 2013), uma vez que nos capítulos anteriores, a partir da imunoistoquímica, foi observada menor taxa de proliferação na cartilagem dos animais de todas as idades dos grupos tratados com L-tiroxina.

A alteração na MEC foi comprovada por todas as colorações especiais realizadas. A redução na intensidade de coloração pela safranina-O nas cartilagens de crescimentos dos grupos tratados foi observada em todas as idades. A composição da MEC é importante para determinar o comportamento celular, porque regula a adesão, migração, proliferação e a diferenciação celular (Bissell *et al.*, 1982; Park *et al.*, 2015). A MEC secretada pelos condrócitos compreende uma mistura complexa de proteínas e proteoglicanos. Estes últimos são glicoproteínas com grandes cadeias de carboidratos, os quais podem ser avaliados pela safranina-O, de forma que a intensidade de coloração é diretamente proporcional ao conteúdo de proteoglicanos (Lee *et al.*, 2015). Assim, pode-se afirmar que o excesso de tiroxina materna e pós-natal está associado à redução do conteúdo de proteoglicanos nas cartilagens de crescimento da prole de todas as idades estudadas.

Já foram relatadas algumas ações *in vitro* dos hormônios tireoidianos sobre a composição e a estrutura da MEC. Em cultivos de explantes de condrócitos do esterno de embriões de aves, a adição de T₃ ou T₄, em concentrações fisiológicas, ao meio de cultura estimula a sulfatação da matriz, além de aumentar a síntese de proteoglicanos e o peso da cartilagem (Audhya, 1976). Em culturas primárias de condrócitos da cartilagem articular de coelhos jovens, T₃ foi capaz de estimular a síntese de proteoglicanos, de forma bifásica, dependendo da concentração. A associação de doses fisiológicas de insulina, T₃ e T₄, isolados ou combinados, ao meio de cultivo, estimulou a produção de matriz extracelular com aumento da síntese de proteoglicanos ricos em sulfato de condroitina e colágeno II (Glade *et al.*, 1994). Algumas pesquisas demonstram os efeitos positivos dos hormônios tireoidianos na MEC da cartilagem em concentrações fisiológicas, contudo nossos resultados demonstraram redução do conteúdo de glicosaminoglicanos e proteoglicanos decorrentes do excesso de tiroxina materna e pós-natal. Este fato pode ser justificado pelo aumento na degradação destes componentes por ação da L-tiroxina. Makihira e colaboradores (2003) sugeriram que os hormônios da tireoide são essenciais para a degradação de proteoglicanos durante o desenvolvimento dos membros de ratos. Isso ocorre porque estes hormônios modulam a ação dos condrócitos, particularmente os hipertróficos, influenciando a síntese de enzimas que degradam os proteoglicanos e o agrecan, este último pela indução de agrecanase 2.

Os resultados deste estudo sugerem fortemente que os hormônios tireoidianos em excesso também possam interferir nos proteoglicanos sulfatados, já que houve redução da área e intensidade de coloração da cartilagem pelo *alcian blue* nos animais tratados. O principal GAG presente na cartilagem é o sulfato de condroitina, sendo denominado posteriormente de agrecan,

que apresenta como particularidade a função de interagir com outros GAG como o ácido hialurônico, *biglican* e *glipican*, os quais necessitam de grupos de sulfatos livres para ativação e ligação na MEC (Knudson e Knudson, 2001; Settembre *et al.*, 2008). A deficiência de GAG na matriz pode resultar em diminuição da diferenciação celular e, conseqüentemente, do crescimento ósseo (Roughley, 2006). Sugere-se que este pode ser mais um fator, associado à menor proliferação celular das cartilagens de crescimento, que participa da gênese da redução do crescimento endocondral causada pelo excesso de tiroxina materna e pós-natal. Adicionalmente, foi encontrada redução significativa na expressão gênica do transcrito gênico para *agrecan* somente nos ratos com 40 dias do grupo tratado, sugerindo que a exposição prolongada pode culminar também na redução da expressão gênica de *agrecan*. Numerosos GAGs sulfatados ligam-se à proteína do núcleo de *agrecan* e formam proteoglicanos, que são moléculas grandes, altamente carregadas negativamente que permitem a hidratação do tecido cartilaginoso (Ruoslahti e Yamaguchi, 1991; Cortes *et al.*, 2009). Os proteoglicanos possuem alta afinidade com diversos fatores de crescimento, moléculas de adesão, componentes da matriz, enzimas e inibidores, de forma que para exercer estas funções é necessária a ligação com as cadeias laterais de GAG (Souza e Pinhal, 2011). Foi constatado que os padrões de sulfatação adequados das cadeias GAG ligados ao *agrecan* são essenciais para a formação do gradiente de sinalização pós-natal na placa epifisária, enfatizando ainda mais o papel dos proteoglicanos no controle do crescimento ósseo normal (Cortes *et al.*, 2009). Assim, é necessário entender melhor a ação dos hormônios tireoidianos no metabolismo dos GAGs, para esclarecer se a redução dos GAGs é decorrente de alterações na síntese, na dessulfatação ou na degradação lisossomal. Os GAGs dependem do grau de sulfatação para exercer suas funções (Esko e Selleck, 2002; Perrimon e Hacker, 2004). Já foi relatada redução na intensidade de coloração pelo *alcian blue*, coloração para proteoglicanos sulfatados, em cartilagens de crescimento de camundongos com inativação de *Sumf1*, que é um inibidor da dessulfatação de proteoglicano. Houve alterações mais graves na condrogênese do que na osteogênese, inclusive com desorganização das colunas da zona proliferativa da epífise cartilaginosa e menor expressão de colágeno II, indicando que a regulação da dessulfatação dos proteoglicanos pode estar associada à sobrevivência e proliferação de condrócitos durante a ossificação endocondral (Settembre *et al.*, 2008).

O excesso de hormônios tireoidianos materno e pós-natal também reduziu, nas cartilagens de crescimento, a intensidade e a área corada pelo PAS. Sabe-se que no decorrer dos processos metabólicos, o glicogênio presente nas células da linhagem condrogênica fornece tanto energia quanto matéria-prima necessária para a síntese de mucopolissacarídeos e de proteína (Kobayashi, 1971). As cartilagens possuem taxa glicolítica similar à das células de tecidos vascularizados, de forma que o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de golgi são as principais organelas dos condrócitos e estão associadas com a síntese e a secreção de colágenos e proteoglicanos da MEC (Stockwell, 1978). Assim, pode-se sugerir que a menor quantidade de glicogênio nos condrócitos da prole submetida ao excesso de hormônios tireoidianos materno e pós-natal, possa indiretamente estar associada com a redução de energia e substrato para a síntese de proteoglicanos e GAG. Os hormônios tireoidianos são reconhecidos como importantes reguladores do metabolismo oxidativo de energia das mitocôndrias (Short *et al.*, 2007) e o hipertireoidismo está associado com redução dos níveis de glicogênio em alguns tecidos como adiposo, músculo e fígado (Bollen e Stalmans, 1988; Mitrou *et al.*, 2010).

De forma interessante, foi constatada redução na expressão gênica de Sox9 nas cartilagens de crescimento da prole ao nascimento e aos 20 e 40 dias dos grupos tratados. O Sox9 é um fator de transcrição que está relacionado aos eventos iniciais da formação do esqueleto e é determinante para a diferenciação dos condroblastos (Wright *et al.*, 1995; DeLise *et al.*, 2000). A expressão de mRNA para Sox9 já foi detectada em cartilagens de camundongos durante o crescimento pós-natal (Salminen *et al.*, 2001). Henry e colaboradores (2012), ao avaliar o papel do Sox9 nas cartilagens, demonstraram que a inativação pós-natal deste fator reduz drasticamente a proliferação celular na placa epifisária com alteração no arranjo colunar da zona proliferativa e reduz o teor de proteoglicano sulfatado e de *agrecan* na cartilagem articular e na placa epifisária, semelhante ao observado neste estudo. Isto sugere que este fator continua a

desempenhar papel importante nos tecidos cartilagosos após o nascimento e no indivíduo adulto. Assim, acredita-se que a interferência do excesso de tiroxina materna e pós-natal possa, indiretamente, pela redução de Sox9, influenciar na composição da MEC, inclusive com redução na expressão gênica de alguns componentes. *In vitro*, a adição de T₄ em cultivo de *pellets* de condrócitos reduz a expressão gênica de Sox9 e aumenta a hipertrofia celular e a síntese de proteoglicanos (Okubo e Reddi, 2003).

A expressão gênica de Runx2 nas cartilagens de crescimento de ratos submetidos ao excesso de tiroxina materna e pós-natal revelou padrões diferentes de acordo com as idades. Os neonatos apresentaram aumento na expressão, enquanto houve redução nos ratos com 20 e 40 dias de idade. O Runx2/Cbfa1 desempenha importantes funções na formação óssea, principalmente para a diferenciação das células mesenquimais progenitoras em osteoblastos (Ducy *et al.*, 1997; Komori, 2005). Além disso, influencia a composição da matriz celular (Inada *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999; Mackie *et al.*, 2008) e é expresso em condrócitos pré-hipertrofos e hipertrofos das cartilagens de crescimento (Takeda *et al.*, 2001). É difícil explicar o porquê do aumento do Runx nos neonatos do grupo tratado com base nos nossos resultados e na literatura. No entanto, a redução do Runx-2 nos animais dos grupos tratados com 20 e 40 dias de idade pode estar relacionada ao tempo de exposição ao excesso de tiroxina. Talvez essa elevação do transcrito gênico para o Runx-2 nos neonatos tratados possa estar envolvida na maior quantidade de matriz óssea evidenciada nestes animais, como demonstrado no capítulo 2, uma vez que o aumento na expressão de Runx2 também pode estar associado a maior síntese de matriz (Liu *et al.*, 2001). Mas, essa hipótese parece pouco provável uma vez que os animais com 20 dias de idade do grupo tratado também apresentaram aumento da porcentagem de tecido ósseo trabecular com redução da expressão de Runx-2 nas cartilagens de crescimento. Em cultivos celulares de condrócitos da epífise de ratos ocorre indução da maturação celular por maior ativação da via de sinalização intercelular Wnt e de Runx2 após 48 horas de adição de T₃, entretanto, isso não ocorre com a persistência do tratamento após 7 e 10 dias de cultivo (Wang *et al.*, 2007). Desta forma, mais estudos são necessários para determinar precisamente os fatores que podem interferir nesta regulação ao longo do tempo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Os ratos neonatos do grupo tratado apresentaram aumento da expressão de Runx2 e colágeno I. De forma contrária, nos ratos com 20 e 40 dias dos grupos tratados, a redução de Runx2 foi acompanhada pela menor expressão gênica de colágeno I. Pode-se sugerir que a alteração de um desses fatores esteja relacionada à alteração do outro, uma vez que em células tronco mesenquimais, o aumento de colágeno I ocorre secundariamente ao aumento do fator de transcrição Runx2 (Burdan *et al.*, 2009). A matriz extracelular de células indiferenciadas é rica em colágeno I sendo posteriormente substituída por outras proteínas específicas da matriz cartilaginosa (Shum *et al.*, 2003). Estas observações demonstram a ação positiva dos hormônios tireoidianos na maturação dos condrócitos (Wang *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2008). Em cultivos de osteoblastos MC3T3-E1, T₃ também interfere na matriz óssea de forma dose e tempo dependentes e pode aumentar os níveis de mRNA de Col1a1 com alterações na ligação cruzada e na maturação do colágeno (Varga *et al.*, 2010). Mas porque apesar do aumento de Runx-2 e colágeno I houve redução do crescimento ósseo longitudinal nos neonatos? Pode ser que a elevação dos transcritos gênicos para esses dois fatores não seja acompanhada de aumento da síntese proteica? Essa é uma hipótese que merece ser melhor investigada. Mas pode-se pensar também que apesar da elevação desses dois fatores, os demais fatores estudados, importantes para o crescimento, dentre eles o colágeno II, estavam reduzidos nos animais neonatos do grupo tratado.

A redução da expressão de BMP2 estava associada à redução de colágeno II nas cartilagens de crescimento dos animais tratados de todas as idades, além de agrecan nos ratos com 40 dias de idade. *In vitro*, dependendo das condições de cultura, diversas mudanças nos tipos de colágeno e no conteúdo de proteoglicanos secretados pelos condrócitos podem ser encontradas (Stockwell, 1978). A expressão e a secreção dos componentes da MEC da cartilagem, incluindo o colágeno II e o agrecan são estimuladas por uma variedade de fatores solúveis presentes na placa

epifisária, incluindo o IGF-1, as BMPs e outros membros da superfamília TGF β (Lefebvre e Smits, 2005; Tew *et al.*, 2008). Por exemplo, em cultivo de condrócitos de embriões de camundongos, a BMP2 é extremamente eficiente em aumentar a síntese de pró-colágeno II e agrecan (Perrier-Groult *et al.*, 2013). Adicionalmente, Sox9 é coexpresso com outros dois membros da família Sox, o L-Sox5 e o Sox6, e em conjunto são necessários para a proliferação dos condrócitos e para a progressão ordenada da hipertrofia, bem como para a expressão de colágeno e agrecan (Lefebvre e Smits, 2005; Han e Lefebvre, 2008; Lin *et al.*, 2014). Sendo assim, a redução de BMP2 e de Sox9 nas cartilagens de animais dos grupos tratados podem mediar ações dos hormônios tireoidianos sobre a redução de colágeno II e agrecan.

Neste estudo, foi observada redução da expressão de caspase 3 nos animais com 20 e 40 dias dos grupos tratados, sugerindo menor apoptose dos condrócitos no grupo tratado, mas sem alteração nos neonatos. A apoptose, por meio das caspases, regula os estágios finais do ciclo de vida dos condrócitos e determina a taxa de células que entrará no processo de maturação (Hail *et al.*, 2006; Shapiro *et al.*, 2014). T₃ é um potente regulador de diversas atividades nos condrócitos. A partir de diversas vias de sinalização, T₃ pode influenciar a proliferação, a diferenciação, a apoptose e a angiogênese (Bassett e Willians, 2003). A maior parte dos condrócitos da borda inferior da zona hipertrófica é removida por apoptose, particularmente quando o glicogênio celular se esgota (Farnum e Wilsman, 1987), ocorrendo ativação das caspases e redução da expressão de Bcl-2 (Staines *et al.*, 2013). Assim, é sugerido que mesmo tendo sido observada redução de áreas da cartilagem coradas pelo PAS, esta provável redução de glicogênio não foi suficiente para ativar as caspases, e manteve as células no estágio de hipertrofia com aumento da espessura da zona hipertrófica, como observado nos capítulos anteriores. Sabe-se que a deficiência de fatores pró-angiogênicos como a MMP9 e o VEGF, como ocorreu na cartilagem dos animais tratados deste estudo, pode prejudicar a angiogênese e atrasar a apoptose dos condrócitos (Vu *et al.*, 1998; Gerber *et al.*, 1999). Entretanto, além das caspases outros fatores também podem ser utilizados para monitorar a morte celular programada, como o equilíbrio entre as proteínas Bcl-2 e Bax (Oltvai *et al.*, 1993). A deleção do gene Bcl-2 acelera a apoptose de condrócitos e diminui a espessura da placa epifisária. Assim, a interrupção deste equilíbrio afeta a função da placa epifisária e o comprimento dos ossos longos (Amling *et al.*, 1997). Além disso, nos condrócitos hipertróficos da placa epifisária, não ocorre a apoptose clássica, ou morte celular programada I. Acredita-se que haja uma resposta autofágica nos condrócitos hipertróficos, similar aquela observada durante as condições de estresse, tais como esgotamento de nutrientes, hipóxia e envelhecimento (Srinivas *et al.*, 2009), conhecida como morte celular programada tipo I (Shapiro *et al.*, 2014). Por isso, a associação de abordagens incluindo a técnica de TUNEL, a análise da morfologia celular por microscopia eletrônica e marcadores moleculares por imuno-histoquímica podem ser importantes para uma melhor avaliação da apoptose celular (Emons *et al.*, 2009).

A partir dos nossos resultados, sugere-se que a redução do glicogênio possa estar associada à redução dos níveis de mRNA para fosfatase alcalina, observada nos grupos tratados, uma vez que os hormônios tireoidianos estimulam a síntese de fosfatase alcalina via glicogênio (Ishikawa *et al.*, 1998). No entanto, o glicogênio pode ser uma das muitas fontes de fosfato orgânico (Buddecke *et al.*, 1973).

Foram observadas reduções na expressão gênica de MMP na cartilagem dos ratos submetidas ao excesso de tiroxina materna e pós-natal. As MMP são enzimas responsáveis pela degradação dos componentes de matriz, incluindo os diferentes tipos de colágenos, proteoglicanos dentre outros componentes, regulando desta forma o equilíbrio estrutural entre as proteínas e a matriz da cartilagem (McDonell, 1999; Lee, 2015). Sabe-se que há redução de colágeno II na matriz cartilaginosa associado com aumento nos níveis de MMP13 (Lee *et al.*, 2015). Desta forma, pode-se sugerir que a redução dos proteoglicanos pode ter ocorrido neste caso por menor síntese. Entretanto, outras enzimas como agrecanases e a MMP13 também estão associadas à degradação dos componentes da MEC (Tortorela *et al.*, 1999; Makihiro *et al.*, 2003) e não foram estudadas aqui. Sendo assim, mais estudos são necessários para avaliar o perfil destas

enzimas e compreender melhor a influência do excesso dos hormônios tireoidianos sob outras proteínas de degradação de matriz.

As MMPs regulam o crescimento e a migração celular, a remodelação da matriz extracelular (Zhang *et al.*, 2009) e promovem a remoção de moléculas anti-angiogênicas e a biodisponibilidade de fatores angiogênicos, como o VEGF (Dai e Rabie, 2007). A MMP9 é altamente expressa em osteoclastos em regiões mineralizadas e em condroclastos em áreas não mineralizadas da junção da cartilagem com o osso (Karaplis, 2008). No entanto, não foram encontradas quantidades significativas de células responsáveis pela reabsorção da matriz nas lâminas avaliadas dos grupos tratados (dados não demonstrados). Já foi demonstrado nos capítulos anteriores, menor expressão de VEGF nas cartilagens de crescimento de ratos submetidos ao excesso de tiroxina materna e pós-natal e já é bem definido que a invasão de vasos sanguíneos na MEC é dependente da sua degradação pelas metaloproteinases da matriz (Vortkamp *et al.*, 1998; DeLise *et al.*, 2000; Crombrughe *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2008; Horton e Degnin, 2010). Desta forma, pode-se sugerir que a redução da expressão das MMPs, associada à redução do VEGF, sejam alguns dos fatores implicados na gênese do menor crescimento evidenciado nos animais dos grupos tratados.

Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos do excesso de hormônios tireoidianos sobre a sinalização e o controle do crescimento e da diferenciação de condrócitos ainda necessita ser mais bem compreendido e estudado, particularmente devido às inúmeras interações entre as células e entre a matriz e a célula (Weiss e Reddi, 1980). Mas, este estudo traz, pela primeira vez, uma série de resultados que esclarecem as alterações da MEC cartilaginosa determinadas pelo excesso de tiroxina.

Conclui-se que o excesso de tiroxina influencia a composição da MEC das cartilagens de crescimento, por reduzir a quantidade de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e dos transcritos gênicos para Sox9, MMP9, colágeno II e BMP2 em todas as idades, e por alterar de forma diferenciada, de acordo com a idade, a expressão dos transcritos para Runx2, agregan, colágeno I, MMP2 e caspase.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante iniciar esse tópico comentando um pouco sobre a origem da ideia deste estudo. Abordada por uma aluna de medicina, na época, portadora de hipertireoidismo congênito associado a nanismo, a orientadora deste trabalho foi consultada sobre os mecanismos envolvidos na redução do crescimento ósseo causada pelo hipertireoidismo. Mas, essa era uma questão sem resposta na literatura e naquela época, nosso grupo de pesquisadores somente havia trabalhado com hipertireoidismo em animais adultos, desconhecendo os efeitos dessa disfunção sobre o crescimento ósseo. Hoje chegamos ao fim deste trabalho, respondendo algumas questões importantes e inéditas, mas sem a pretensão de esgotar o assunto e com novas ideias que fomentam a continuidade das pesquisas neste tema.

É fato que os hormônios tireoidianos são de fundamental importância para praticamente todos os tecidos e que a ação deles se dá durante o desenvolvimento fetal e embrionário e também em todos os estágios da vida pós-natal. A influência destes hormônios sobre o crescimento ósseo é inquestionável, mas a maioria dos estudos está focada no hipotireoidismo, que é causa mais frequente de alterações do crescimento ósseo. Mas, sem dúvida, a frequência de pacientes gestantes com hipertireoidismo é bastante significativa, sem contar a frequência de hipertireoidismo felino que é muitas vezes subestimada. Mas, o número de estudos do efeito desta disfunção tireoidiana sobre o crescimento ósseo infelizmente não é proporcional ao número de casos. Conhecendo-se todos os fatores de crescimento, moléculas e genes que controlam o crescimento ósseo, nossa pergunta imediata foi como esses mesmos fatores medeiam as ações do excesso de tiroxina sobre o osso em crescimento. O crescimento ósseo normal é dependente da proliferação e diferenciação celulares, da constituição da MEC e de fatores envolvidos na síntese e degradação da matriz cartilaginosa. Por isso, vários desses fatores foram estudados aqui.

Durante a gestação e lactação de mães com hipertireoidismo, há elevada exposição dos tecidos fetais e neonatais a níveis de tiroxina superiores às doses fisiológicas, fato este que pode prejudicar a maturação da tireoide ainda em formação. Neste estudo, a administração de tiroxina resultou em elevação dos níveis plasmáticos de tiroxina da mãe e dos filhotes com 40 dias. Contudo, o hipertireoidismo somente pôde ser comprovado nos ratos com 40 dias de idade, uma vez que nesses animais foi realizada também a dosagem de triiodotironina total. Mas é fato que todos os animais tiveram excesso de hormônio tireoidiano no sangue, comprovado pela redução do epitélio folicular da tireoide que, neste caso, somente ocorreria diante do excesso dos hormônios tireoidianos no sangue por *feedback* negativo sobre a tireoide. Mas, independente de ter ou não hipertireoidismo, nosso objetivo de estudar o efeito do excesso de tiroxina sobre o crescimento ósseo foi alcançado.

É intrigante o fato do excesso dos hormônios tireoidianos reduzirem o crescimento ósseo longitudinal somente nos animais neonatos e com 20 dias de idade, apesar das alterações nas cartilagens de crescimento terem sido semelhantes e observadas em todas as idades. Diante desse resultado, é provável que os animais apresentassem ao final do período de crescimento, tamanho semelhante, assim como já foi descrito em crianças com hipertireoidismo congênito. Em estudo realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, animais que tiveram contato com o excesso de tiroxina materna até o desmame e ficaram por mais 20 dias sem receber tratamento com tiroxina apresentaram tamanho semelhante. Mas aqui, os ratos após o desmame continuaram recebendo tiroxina e mesmo assim, também tiveram comprimento longitudinal semelhante. Mas, o que diferiu estes dois estudos é que os ratos que não receberam tiroxina após o desmame, apresentaram a mesma espessura de cortical, ao contrário dos resultados apresentados aqui, onde os ratos que receberam tiroxina até os 40 dias de idade apresentaram redução do crescimento em espessura.

Com base nos nossos resultados, ficou claro que o excesso de tiroxina reduz o crescimento ósseo em todas as idades e que isso acontece por várias alterações nas cartilagens de

crescimento, ou seja, por redução da proliferação celular, por redução dos fatores angiogênicos, mas principalmente pela redução da expressão de VEGF que ocorreu em todas as idades, por redução da quantidade de proteoglicanos, glicosaminoglicanos, metaloproteinases, proteínas colágenas e de fatores de transcrição como o Sox9 e a BMP2, importantes para a condrogênese.

Outro fato interessante que ocorreu nos animais neonatos e com 20 dias de idade do grupo tratado com tiroxina foi o aumento da quantidade de tecido ósseo trabecular. É fato que o hipertireoidismo é acompanhado de uma variação muito grande na massa óssea, podendo haver redução, aumento ou nenhuma alteração da quantidade de tecido ósseo em modelos animais e em indivíduos adultos. O excesso de tiroxina pode aumentar a quantidade de tecido ósseo quando há aumento da aposição frente a reabsorção. Embora estudar estes dois processos não tenha sido alvo deste estudo, é possível sugerir que o aumento da quantidade de tecido ósseo trabecular nos neonatos e nos ratos de 20 dias de idade dos grupos tratados tenha sido decorrente da supremacia do processo de aposição frente à reabsorção óssea. Os hormônios tireoidianos podem estimular a síntese de matriz óssea por estimular a atividade osteoblástica ou por estimular a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais, como demonstrado em diversos trabalhos realizados pelo nosso grupo e citados no decorrer do texto de cada capítulo. Mas, é difícil explicar a razão pela qual não ocorreu aumento de tecido ósseo trabecular nos ratos com 40 dias de idade. Uma hipótese é que com o tempo de exposição mais prolongado ao excesso de tiroxina nos ratos com 40 dias, a reabsorção tenha se igualado a aposição óssea. Mas esta é uma assertiva que merece e deve ser investigada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA-BUIS, RF; CÁZARES, DG; MONROY, JC. Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de la extremidad de los vertebrados. *Revista Especializada em Ciências Químico-Biológicas*. v.9, p.78-89, 2006.
- ABREU, JG; KETPURA, NI; REVERSADE, B; et al. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF- β . *Nature Cell Biology*. v.4, p.599-604, 2002.
- ABU, EO; BORD, S; HORNER, A; et al. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*. v.21, p.137-142, 1997.
- ADAMS, CS; SHAPIRO, IM. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. v.13, p.465-473, 2002.
- ADAMS, SL; COHEN, AJ; LASSOVÁ, L. Integration of signalling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *Journal of Cellular Physiology*. v.213, p.635-641, 2007.
- ADHAMI, MD; RASHID, H; CHEN, H; et al. Runx2 activity in committed osteoblasts is not essential for embryonic skeletogenesis. *Connective Tissue Research*. v.55, p.102-106, 2014.
- AHMED, OM; EL-TAWAB, SM; AHMED, RG. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *International Journal Developmental Neuroscience*. v.28, p.437-454, 2010.
- AHRENS, MJ; LI, Y; JIANG, H; et al. Convergent extension movements in growth plate chondrocytes require gpi-anchored cell surface proteins. *Development*. v. 136, p.3463-3474, 2009.
- AIGNER, T. Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton--biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Virchows Archiv*. v.441, p.219-230, 2002.
- AKIYAMA, H; CHABOISSIER, MC; MARTIN, JF; 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 & Development*, v.16, p.2813-2828, 2002.
- ALLAIN, TJ; CHAMBERS, TJ; FLANAGAN, AM; et al. Tri-iodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *Journal of Endocrinology*. v.133, p.327-331, 1992.
- ALLAIN, T; MCGREGOR, A. Thyroid hormones and bone. *Journal of Endocrinology*. v.139, p.9-18, 1993.
- ALLAIN, TJ; THOMAS, IMR; MCGREGOR, IAM; et al. Histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. *Bone*. v.16, p.505-509, 1995.
- ALONSO, V; De GORTÁZAR, AR; ARDURA, JA; et al. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Journal of Cellular Physiology*. v.217, p.717-727, 2008.
- AL-QATTAN, MM; YANG, Y; KOZIN, SH. Embryology of the Upper Limb. *Journal of Hand Surgery*. v.34a, p.1340-1350, 2009.

- 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. *Journal of Cell Biology*. v.136, p.205-213, 1997.
- ANDERSEN, SL; OLSEN, J; WU, CSK; et al. Low birth weight in children born to mothers with hyperthyroidism and high birth weight in hypothyroidism, whereas preterm birth is common in both conditions: a danish national hospital register study. *European Thyroid Journal*. v.2, p.135-144, 2013.
- 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. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v.48, p.1493-1502, 2000.
- ANDRAWEERA, PH; DEKKER, GA; ROBERTS, CT. The vascular endothelial growth factor family in adverse pregnancy outcomes. *Human Reproduction Update*. v.18, p.436- 57, 2012.
- ANSELMO, J; CAO, D; KARRISON, T; et al. Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. *Journal of the American Medical Association*. v.292, p.691-695, 2004.
- ARAÚJO, MCK; SILVA, MHBN; DINIZ, EMA et al. A tireoide no feto e no recém-nascido: peculiaridades funcionais e principais doenças tireoidianas. *Pediatria (São Paulo)*. v.25, p.51-60, 2003.
- ASAHARA, T; CHEN, D; TAKAHASHI, T; et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 modulate VEGF-induced postnasal neovascularization. *Circulation Research*. v.83, p.233-240, 1998.
- ASAI, S; CAO, X; YAMAUCHI, M; et al. Thyroid hormone non-genomically suppresses Src thereby stimulating osteocalcin expression in primary mouse calvarial osteoblasts. *Biochemical Biophysical Research Communication*. v.387, p.92-96, 2009.
- AUDHYA, TK; SEGEN, BJ; GIBSON, KD. Stimulation of proteoglycan synthesis in chick embryo sternum by serum and L-3,5,3'-triiodothyronine. *The Journal Of Biological Chemistry*. v.251, p. 3763-3767, 1976.
- AUGUSTIN, HG; KOH, GY; THURSTON, G; et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature Review Molecular Cell Biology*. v.10, p.165-177, 2009.
- BALLOCK, RT; ZHOU, X; MINK LM; et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in epiphyseal chondrocytes induced to terminally differentiate with thyroid hormone. *Endocrinology*. v.141, p.4552-4557, 2000.
- BALLOCK, RT; O'KEEFE, R.J. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. v.69, p.123-143, 2003.
- BARON, R. Anatomy and ultrastructure of bone – histogenesis, growth and remodeling, 2008. Disponível em: <http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid1/parathyroidframe1.htm>. Acesso em: 28 de novembro de 2016.
- BASSETT, JH; NORDSTRÖM, K; BOYDE, A; et al. Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization. *Molecular Endocrinology*. v.21, p.1893-1904, 2007.
- BASSETT, JH; WILLIAMS, GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. v.14, p.356-364, 2003.

- BASSETT, JH; WILLIAMS, GR. The skeletal phenotypes of TRalpha and TRbeta mutant mice. *Journal of Molecular Endocrinology*. v.42, p.269–282, 2009.
- BEIER, F. Cell-cycle control and the cartilage growth plate. *Journal of Cell Physiology*. v.202, p.1–8, 2005.
- BELLUOCCIO, D; BERNARDO, BC; ROWLEY, L; et al. A microarray approach for comparative expression profiling of the discrete maturation zones of mouse growth plate cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1779, p.330-340, 2008.
- BENYA, PD; PADILLA, SR; NIMNI, ME. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*. v.15, p.1313-1321, 1978.
- BERENDSEN, AD; OLSEN, BR. How Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF) regulates differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. v.62, p.103–108, 2014.
- BIANCO, AC; SALVATORE, D; GEREBEN, B; et al. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*. v.23, p.38-89, 2002.
- BIANCO, AC; KIM, BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation*. v.116, p.2571-2579, 2006.
- BISSELL, MJ; HALL, HG; PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology*. v.99, p.31–68, 1982.
- BLOISE, E; COUTO, HL; MASSAI, L; et al. Differential expression of follistatin and FLRG in human breast proliferative disorders. *BioMedCentral Cancer*. v.9, p.1-10, 2009.
- BLUTEAU, G; JULIEN, M; MAGNE, D; et al. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. *Bone*. v.40, p.568–576, 2007.
- BOELAERT, K; FRANKLYN, JA. Thyroid hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology*. v.187, p.1-15, 2005.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; MELO, AB; et al. Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Hormone Reserch*. v.72, p.88-97, 2009.
- BOELONI, JN; SILVA, JF; MAGALHÃES, FC; et al. Efeitos sítio-ósseo dependentes no fêmur e vértebra de ratas com disfunções tireoidianas. *Acta Ortopédica Brasileira*, v.18, p.291-294, 2010.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; SILVA, JF; et al. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and non-ovariectomized female rats with thyroid dysfunction. *Pathology - Research and Practice*. v.209, p.44-51, 2013a.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; GOES, AM; et al. Triiodothyronine does not increase osteogenic differentiation reduced by age in bone marrow mesenchymal stem cells of female rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. v.57, p.62-70, 2013b.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; GOES, AM; et al. In vitro effects of triiodothyronine on the reduced osteogenic potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells from ovariectomized rats and with osteoporosis. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. v.57, p.98-111, 2013c.

- BOHENSKY, J; SHAPIRO, IM; LESHINSKY, S; et al. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy*. v.3, p.207-214, 2007.
- BOHENSKY, J; TERKHORN, SP; FREEMAN, TA; et al. Regulation of autophagy in human and murine cartilage: hypoxia-inducible factor 2 suppresses chondrocyte autophagy. *Arthritis & Rheumatology*. v.60, p.1406-1415, 2009.
- BÖHME, K; CONSCIENCE-EGLI, M; TSCHAN, T; et al. Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *Journal of Cellular Biology*. v.116, p.1035–1042, 1992.
- BOLLEN, M; STALMANS, W. Glycogen Synthase in Liver Cells. *Endocrinology*, v.122, p.2915-2919, 1988.
- BORZI, RM; OLIVOTTO, E; PAGANI, S; et al. Matrix metalloproteinase 13 loss associated with impaired extracellular matrix remodeling disrupts chondrocyte differentiation by concerted effects on multiple regulatory factors. *Arthritis & Rheumatology*. v.62, p.2370–2381, 2010.
- BOTELHO, JF; SMITH-PAREDES, D; VERÓNICA, PA. Efficient Detection of Indian Hedgehog During Endochondral Ossification by Whole-Mount Immunofluorescence. *Hedgehog Signaling Protocols, Methods in Molecular Biology*. v. 1322, p.157-166, 2015.
- BRAY, RC; FRANK, CB; MINIACI, A. *The structure and function of diarthrodial joints*. In: McGINTY, J. B. ed. Operative arthroscopy. 2.ed. Philadelphia: Lippincot- Raven, 1996. Cap. 10, p.105-143.
- BUCKLER, J; WILLGERODT, H; KELLER, E. Growth in thyrotoxicosis. *Archives of Disease in Childhood*. v. 61, p.464–71, 1986.
- BUDDECKE, E; FILIPOVIC, I; BECKMANN, J; et al. Metabolic processes of energy provision and synthesis in the ox aorta. In: Connective tissue and Ageing, Editor VOGEL, H.G. Excerpta Medica, Amsterdam, 1973, pp. 7-10.
- BURSELL, JDH; WARNER, JT. Interpretation of thyroid function in children. *Paediatrics and child health*. v. 17, p.361-365, 2007.
- BURCH, WM; LEOVITZ, HE. Triiodothyronine stimulates maturation of porcine growth-plate cartilage in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. v.70, p.496–504, 1982.
- BURCH, WM; LEOVITZ, HE. Parathyroid hormone stimulates growth of embryonic chick pelvic cartilage in vitro. *Calcified Tissue International*. v.35, p.526-532, 1983.
- BURDAN, F; SZUMILO, J; KOROBOWICZ, A; et al. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochemical Cytobiology*. v.47, p.5–16, 2009.
- CAMARERO-ESPINOSA, S; ROTHEN-RUTISHAUSER, B; JOHAN, E. Articular cartilage: from formation to tissue. *Biomaterials Science*. v., p., 2016.
- CANALIS, E; ECONOMIDES, AN; GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews*. v.24, p.218-235, 2003.
- CARDOSO, LF; MACIEL, LMZ; DE PAULA, FJA. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 58, p. 452–463, 2014.

- CARLEVARO, MF; ALBINI, A; RIBATTI, D; et al. Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization. *The Journal of Cell Biology*. v.136, p.1375-1384, 1997.
- CARLEVARO, MF; CERMELLI, S; CANCEDDA, R; et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *Journal of Cell Science*. v.113, p.59-69, 2000.
- CARMELIET, P; FERREIRA, V; BREIER, G; et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. v.380, p.435-439, 1996.
- CARON, M; EMANS, P; COOLSEN, M; et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*. v.20, p.1170-1178, 2012.
- CARRINGTON, JL; REDDI, AH. Parallels between development of embryonic and matrix-induced endochondral bone. *Bioessays*. v.13, p.403-408, 1991.
- CASTRO, MPR; SOARES, JCC. Hipotireoidismo. *Revista Brasileira de Medicina*. v.71, p., 2014.
- CAWSTON, TE; WILSON, AJ. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. v.20, p.983-1002, 2006.
- CHAMBERS, MG; KUFFNER, T; COWAN, SK; et al. Expression of collagen and aggrecan genes in normal and osteoarthritic murine knee joints. *Osteoarthritis Cartilage*. v.10, p.51-61, 2002.
- CHEN, L; DENG, CX. Roles of fgf signaling in skeletal development and human genetic diseases. *Frontiers in Bioscience*. v.1, p.1961-1976, 2005.
- CHEN, LY; LIU, L. Current progress and prospects of induced pluripotent stem cells. *Science China Series C: Life Sciences*. v.52, p.622-636, 2009.
- CHILIAN, WM; WANGLER, RD; PETERS, KG; et al. Thyroxine-induced left ventricular hypertrophy in the rat. Anatomical and physiological evidence for angiogenesis. *Circulation Research*. v.57, p. 591-598, 1985.
- CHUNG, UI; LANSKE, B; LEE, K; et al. The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Developmental Biology*. v.95, p.13030-13035, 1998.
- CHUNG, UI. Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *Endocrine Journal*. v.51, p.19-24, 2004.
- CHUNG, R; FOSTER, BK; XIAN, CJ. The potential role of VEGF-induced vascularisation in the bone repair of injured growth plate cartilage. *Journal of Endocrinology*. v. 221, p.63-75, 2014.
- COFFIN, JD; FLORKIEWICZ, RZ; NEUMANN, J; et al. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Molecular Biology of the Cell*. v.6, p.1861-1873, 1995.

- COLVIN, JS; FELDMAN, B; NADEAU, JH; et al. Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. *Developmental dynamics*. v.216, p.72-88, 1999.
- CONEN, KL; NISHIMORI, S; PROVOT, S; et al. The transcriptional cofactor Lbh regulates angiogenesis and endochondral bone formation during fetal bone development. *Developmental Biology*. v.333, p.348–358, 2009.
- COOPER, DS. Hyperthyroidism. *Lancet*. v.362, p.459-468, 2003.
- CORTES, M; BARIA, AT; SCHWARTZ, NB. 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. *Current Opinion in Cell Biology*. v.13, p.721-727, 2001.
- DAI, J; RABIE, AB. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *Journal of Dental Research*. v.86, p.937-950, 2007.
- DAILEY, L; AMBROSETTI, D; MANSUKHANI, A; et al. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. v.16, p.233–247, 2005.
- DAO, DY; JONASON, JH; ZHANG, Y; et al. Cartilage-specific beta-catenin signaling regulates chondrocyte maturation, generation of ossification centers, and perichondrial bone formation during skeletal development. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.27, p.1680-1694, 2012.
- DE LUCA, F; BARON, J. Control of bone growth by fibroblast growth factors. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. v.10, p.61-65, 1999.
- DECKERS, MM; KARPERIEN, M; VAN DER BENT, C; et al. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. v. 141, p. 1667–1674, 2000.
- DEGNIN, CR; LAEDERICH, MB; HORTON, WA. FGFs in endochondral skeletal development. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.110, p.1046–1057, 2010.
- DELISE, AM; FISCHER, L; TUAN, RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage*. v.8, p.309–334, 2000.
- DELVERDIER, M; CABANIE, P; ROOME, N; et al. Critical analysis of the histomorphometry of rat thyroid after treatment with thyroxin and propylthiouracil. *Annales de Recherches Veterinaires*. v.22, p.373-378, 1991.
- DESCALZI, CF; MELCHIORI, A; BENELLI, R; et al. Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth plate chondrocytes during in vitro differentiation: dependence on extracellular matrix assembly. *European Journal of Cell Biology*. v.66, p.60-68, 1995.
- DESJARDIN, C; CHARLES, C; BENOIST-LASSELIN, C; et al. Chondrocytes play a major role in the stimulation of bone growth by thyroid hormone. *Endocrinology*. v.155, p.3123–3135, 2014.

- DOTT, NM. Investigation into the function of the pituitary and thyroid glands. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. v.13, p.241- 282, 1923.
- DUCY, P; ZHANG, R; GEOFFROY, V; et al. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. v.89, p.747-754, 1997.
- DUMONT, DJ; GRADWOHL, G; FONG, GH; et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, Tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes & Development*. v.8, p.1897–1909, 1994.
- DY, P; WANG, W; BHATTARAM, P; et al. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Cell*. v.22, p.597–609. 2012.
- EERDEN, BC; KARPERIEN, M; GEVERS, EF; et al. Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.15, p.1045–1055, 2000.
- EERDEN, BC; KARPERIEN, M; WIT, JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocrine Reviews*. v.24, p.782-801, 2003.
- EL-GHARBAWY, AH; PEEDEN, JNJr; LACHMAN, RS; et al. Severe cleidocranial dysplasia and hypophosphatasia in a child with microdeletion of the C-terminal region of RUNX2. *American Journal of Medical Genetics*. v.152A, p.169–174, 2010.
- EMONS, J; CHAGIN, AS; HULTENBY, K; et al. Epiphyseal fusion in the human growth plate does not involve classical apoptosis. *Pediatric Research*. v.66, p.654–659, 2009.
- ESKO, JD; SELLECK, SB. Order out of chaos: Assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annual Review of Biochemistry*. v.71, p. 435–471, 2002.
- FARNUM, CE; WILSMAN, NJ. Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *The Anatomical Record*. v.219, p.221- 232, 1987.
- FARNUM, CE; LEE, R; O'HARA, K; et al. Volume Increase in Growth Plate Chondrocytes During Hypertrophy: The Contribution of Organic Osmolytes. *Bone*. v. 30, p.574–581, 2002.
- FARQUHARSON, C. Social networking between cells of the foetal skeleton: The importance of thyroid hormones. *Journal of Endocrinology*, v.210, n.2, p.135–136, 2011.
- FERNÁNDEZ, MG. Hipertiroidismo y embarazo. *Endocrinología y Nutrición*. v.60, p.535-543, 2013.
- FERRARA, N; CARVER-MOORE, K; CHEN, H; et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. v.380, p.439-442, 1996.
- FERRARA, N; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology Review*. v.18, p.4–25, 1997.
- FERRARA, N; KEYT, B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *Experientia Supplementum*. v.79, p.209-232, 1997.
- FERRARA, N; GERBER, HP; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. v.9, p.669-676, 2003.

- FERREIRA, E; SILVA, AE; SERAKIDES, R; et al. Model of induction of thyroid dysfunctions in adult female mice. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.59, p.1245-1249, 2007.
- FISHER, DA; POLK, DH. Development of the thyroid. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. v.3, p.627–657, 1989.
- FISHER, DA; SCHOEN, EJ; LA FRANCHI, S; et al. The hypothalamic-pituitary-thyroid negative feedback control axis in children with treated congenital hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.85, p.2722-2727, 2000.
- FLAMANT, F; SAMARUT, J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. v.14, p.85–90, 2003.
- FORREST, D; SJÖBERG, M; VENNSTROM, B. Contrasting developmental and tissue-specific expression of α and β thyroid hormone receptor genes. *The EMBO Journal*. v.9, p.1519-1528, 1990.
- FOSTER, JW; DOMINGUEZ-STEGLICH, MA; GUIOLI, S; et al. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. v.372, p.525-530, 1994.
- FRATZL-ZELMAN, N; HÖRANDNER, H; LUEGMAYR, E; et al. Effects of triiodothyronine on the morphology of cells and matrix, the localization of alkaline phosphatase, and the frequency of apoptosis in long-term cultures of MC3T3-E1 cells. *Bone*. v.20, p.225–236, 1997.
- FREITAS, FRS; MORISCOT, AS; JORGETTI, V; et al. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR beta-selective compound GC-1. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. v.285, p.1135–1141, 2003.
- FREITAS, FRS; CAPELO, LP; SHEA, PJO; et al. The thyroid hormone receptor β -Specific Agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.20, p.294–304, 2005.
- FREITAS, ES; LEITE, ED; SOUZA, CA; et al. Histomorphometry and expression of Cdc47 and caspase-3 in hyperthyroid rat uteri and placentas during gestation and postpartum associated with fetal development. *Reproduction Fertility Development*. v.19, p.498-509, 2007.
- GAO, B. Wnt regulation of planar cell polarity (PCP). *Current Topics in Developmental Biology*. v.101, p. 263-295, 2012.
- GAUTHIER, K; CHASSANDE, O; PLATEROTI, M; et al. Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *The EMBO Journal*. v.18, p.623–631, 1999.
- GAUTHIER, K; PLATEROTI, M; HARVEY, CB; et al. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Molecular and Cellular Biology*. v.21, p.4748–4760, 2001.
- GERBER, HP; VU, TH; RYAN, AN; et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*. v.5, p.33-42, 1999.
- GLADE, MJ; KANWAR, YS; STERN, PH. Insulin and thyroid hormones stimulate matrix metabolism in primary cultures of articular chondrocytes from young rabbits independently and in combination. *Connective Tissue Research*. v.31, p.37–44, 1994.

- GOETZ, R; MOHAMMADI, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. v.14, p.166–180, 2013.
- GOGAKOS, AI; DUNCAN BASSETT, JH; WILLIAMS, GR. Thyroid and bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.503, p.129–136, 2010.
- GOHR, C. In vitro models of calcium crystal formation. *Current Opinion in Rheumatology*. v.16, p.263–267, 2004.
- GOLDRING, MB; TSUCHIMOCHI, K; IJIRI, K. The control of chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.97, p.33-44, 2006.
- GOLTZMAN D. Emerging roles for calcium-regulating hormones beyond osteolysis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. v.21, p.512-518, 2010.
- GONZALEZ, AM; BUSCAGLIA, M; ONG, M; et al. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *The Journal of Cell Biology*. v.110, p.753–765, 1990.
- GONZALEZ, AM; HILL, DJ; LOGAN, A; et al. Distribution of Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 and FGF Receptor-1 Messenger RNA Expression and Protein Presence in the Mid-Trimester Human Fetus. *Pediatric Research*. v.39, p.375–385, 1996.
- GONZALEZ-CRUSSI, F. Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. *American Journal of Anatomy*. v.130, p.441-460, 1971.
- GORKA, J; TAYLOR-GJEVRE, RM; ARNASON, T. Metabolic and clinical consequences of hyperthyroidism on bone density. *International Journal of Endocrinology*. v.2013, p.1-11, 2013.
- GOUVEIA, CH. O efeito molecular e estrutural do hormônio tiroideano no esqueleto. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. v.48, p.183-195, 2004.
- GOYAMA, S; SCHIBLER, J; CUNNINGHAM, L; et al. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*. v.123, p.3876-3888, 2013.
- GRUBER, R; CZERWENKA, K; WOLF, F; et al. Expression of the vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor alpha- and beta-isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone*. v.24, p.465-73, 1999.
- GU, WX; STERN, PH; MADISON, LD; et al. Mutual up-regulation of thyroid hormone and parathyroid hormone receptors in rat osteoblastic osteosarcoma 17/2.8 cells. *Endocrinology*. v.142, p.157-164, 2001.
- GUO, J; CHUNG, UI; YANG, D; et al. PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. *Developmental Biology*. v.292, p.116–128, 2006.
- HAIL, N; CARTER, BZ; KONOPLEVA, M; et al. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis*. v.11, p.889-904, 2006.
- HAJRA, KM; LIU, JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis*. v.9, p. 691-704, 2004.

- HALL, AP; WESTWOOD, FR; WADSWORTH, PF. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. *Toxicologic Pathology*, v.34, p.131–147, 2006.
- HAN, Y; LEFEBVRE, V. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Molecular and Cellular Biology*. v.28, p.4999–5013, 2008.
- HANAHAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. v.277, p.48-50, 1997.
- HARMER, N; PELLEGRINI, L; CHIRGADZE, D; et al. The crystal structure of fibroblast growth factor (FGF) 19 reveals novel features of the FGF family and offers a structural basis for its unusual receptor affinity. *Biochemistry*, v.43, p. 629-640, 2004.
- HARVEY, CB; O'SHEA, PJ; SCOTT, AJ, et al. Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function. *Molecular Genetics and Metabolism*. v.75, p.17–30, 2002.
- HATTORI, T; MULLER, C; GEBHARD, S; et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development*. v.137, p.901-911, 2010.
- HELL, RCR; BOELONI, JN; OCARINO, NM; et al. Effect of triiodothyronine on the bone proteins expression during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. v.55, p.339-44, 2011.
- HENRY, SP; LIANG, S; AKDEMIR, KC; et al. The postnatal role of Sox9 in cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.27, p.2511–2525, 2012.
- HIGUCHI, R; MIYAWAKI, M; KUMAGAI, T; et al. Central hypothyroidism in infants who were born to mothers with thyrotoxicosis before 32 weeks gestation: 3 cases. *Pediatrics*. v.115, p.623-625, 2005.
- HINOI, E; BIALEK, P; CHEN, YT; et al. Runx2 inhibits chondrocyte proliferation and hypertrophy through its expression in the perichondrium. *Genes & Development*. v.20, p.2937-2942, 2006.
- HOCK, JM; KRISHNAN, V; ONYIA, JE; et al. Osteoblast apoptosis and bone turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.16, p.975-984, 2001.
- HORNER, A; BISHOP, NJ; BORD, S; et al. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human neonatal growth plate cartilage. *Journal of Anatomy*. v.194, p.519-524, 1999.
- HORNER, A; BORD, S; KELSALL, AW; et al. Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. *Bone*. v.28, p.65–71, 2001.
- HORTON, WA; DEGNIN, CR. FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinology Metabolism*. v.20, p.341-348, 2009.
- HORTON, WA; HALL, J; HECHT, JT. Achondroplasia. *Lancet*. v.370, p.162-72, 2007.
- HORTON, WEJr; FENG, L; ADAMS, C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biology*. v.17, p.107-115, 1998.

- HOUSTON, CS; OPITZ, JM; SPRANGER, JW; et al. The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *American Journal of Medical Geneics*. v.15, p.3–28, 1983.
- HUANG, BK; GOLDEN, LA; TARJAN, G; et al. Insulin-like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.15, p.188-197, 2000.
- HUANG, W; CHUNG, UI; KRONENBERG, HM; et al. The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.98, p.160-165, 2001.
- HUANG, Z; BAO, SD. Roles of main pro and anti-angiogenic factors in tumorangiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. v.10, p.463-470, 2004.
- HUNZIKER, EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microscopy Research and Technique*. v.28, p.505–519, 1994.
- INADA, M; YASUI, T; NOMURA, S; et al. Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Developmental Dynamics*. v.214, p.279-290, 1999.
- INADA, M; WANG, Y; BYRNE, MH; et al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.101, p. 17192-17197, 2004.
- ISHIKAWA, Y; GENGE, BR; WUTHIER, RE; et al. Thyroid hormone inhibits growth and stimulates terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.13, p.1398-1411, 1998.
- IVKOVIC, S; YOON, BS; POPOFF, SN; et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*. v.130, p.2779-2791, 2003.
- JANNERS, MY; SEARLS, RL. Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing. *Developmental Biology*. v.23, p.136–165,1970.
- JARURATANASIRIKUL, S; SRIPLUNG, H. Growth pattern of childhood thyrotoxicosis: Longitudinal follow-up to final height. *Journal of the medical association of thailand*. v.89, p.1396-1399, 2006.
- JO, A; DENDULURI, S; ZHANG, B; et al. The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes & Disease*. v.1, p.149-161, 2014.
- JUPPNER, H; ABOU-SAMRA, AB; FREEMAN, M; et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*. v.254, p.1024-1026, 1991.
- KARACA, T; HULYA, UZY; KARABACAK, R; et al. Effects of hyperthyroidism on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and apoptosis in fetal adrenal glands. *European Journal of Histochemistry*. v.59, p.258-262, 2015.
- KARAER, K; YÜKSEL, Y; YALINBAŞ, E; et al. A case of campomelic dysplasia in whom a new mutation was found in the SOX9 gene. *Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi*. v.49, p.154-156, 2014.

- KARAPLIS, AC; LUZ, A; GLOWACKI, J; et al. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes & Development*. v.8, p. 277-289, 1994.
- KARAPLIS, AC. Embryonic development of bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation. Principles of Bone Biology. In: BRONER, F; FARACH-CARSON, MC. Bone formation. 3 ed. 2008. p.33-58.
- KARGA, H; PAPAPETROU, PD; KORAKOVOUNI, A; et al. Bone mineral density in hyperthyroidism. *Clinical Endocrinology*. v.61, p.466-472, 2004.
- KARP, SJ; 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.
- KERR, JF; WYLLIE, AH; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. v.26, p.239-257, 1972.
- KIANI, C; CHEN, I; WU, YJ; et al. Structure and function of aggrecan. *Cell Research*. v.12, p.19-32, 2002.
- KIM, KA; WAGLE, M; TRAN, K; et al. R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Molecular Biology of the Cell*. v.19, p.2588-2596, 2008.
- KIM, HJ; DELANEY, JD; KIRSCH, T. The role of pyrophosphate/phosphate homeostasis in terminal differentiation and apoptosis of growth plate chondrocytes. *Bone*. v.47, p.657-665, 2010.
- KIM, EJ; CHO, SW; SHIN, JO; et al. *Ihh* and Runx2/Runx3 Signaling Interact to Coordinate Early Chondrogenesis: A Mouse Model. *PLoS One*. v.8, p. 1-11, 2013.
- KIM, LS; OTTO, F; ZABEL, B; et al. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mechanisms of Development*. v.80, p.159-170, 1999.
- KLAUSHOFER, K; VARGA, F; GLANTSCHING, H; et al. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *Journal of Nutrition*. v.125, p.1996-2003, 1995.
- KNUDSON, CB; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. In: Seminars in cell & developmental biology. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, v.12, p. 69-78, 2001.
- KOBAYASHI, S. Acid mucopolysaccharides in calcified tissues. *International Review of Cytology*, v.30, p. 257-371, 1971.
- KOBAYASHI, R; SHIMOMURA, Y; OTSUKA, M; et al. Experimental hyperthyroidism causes inactivation of the branched-chain a-ketoacid dehydrogenase complex in rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v.375, p.55-61, 2000.
- KOEDAM, JA; SMINK, JJ; VAN BUUL-OFFERS, SC. Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expression in growth plate chondrocytes. *Molecular Cell Endocrinology*. v.197, p.35-44, 2002.
- KOIKE, T; IWAMOTO, M; SHIMAZU, A; et al. Potent mitogenic effects of parathyroid hormone (PTH) on embryonic chick and rabbit chondrocytes. Differential effects of age on growth, proteoglycan, and cyclic AMP responses of chondrocytes to PTH. *Journal of Clinical Investigation*. v.85, p.626-631, 1990.

- KOJIMA, T; HASEGAWA, T; DE FREITAS, PH. Histochemical aspects of the vascular invasion at the erosion zone of the epiphyseal cartilage in MMP-9-deficient mice. *Journal of Biomedical Research*. v.34, p.119-28, 2013.
- 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.
- KOMORI, T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry*. v. 95, p.445-453, 2005.
- KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and Tissue Research*. v.2, p.189-195, 2010.
- KOMORI, T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.112, p.750-755, 2011.
- KRONENBERG, HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. v.423, p.332-336, 2003.
- KRONENBERG, HM. PTHrP and skeletal development. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.1068, p.1-13, 2006.
- KRUEGER, RC; KURIMA, K; SCHWARTZ, NB. Completion of the mouse aggrecan structure and identification of the defect in the cmd-Bc as a near complete deletion of the murine aggrecan. *Mammalian Genome*. v.10, p.1119-1125, 1999.
- KUIPER, GGJM; KLOOTWIJK, W; VISSER, TJ. Expression of recombinant membrane-bound type I iodothyronine deiodinase in yeast. *Journal of Molecular Endocrinology*. v.34, p.865-878, 2005.
- KUSANO, K; MIYAURA, C; INADA, M; et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology*. v.139, p.1338-45, 1998.
- LANSKE, B; KARAPLIS, AC; LEE, K; et al. PTH/PTHrP Receptor in early development and indian hedgehog-regulated bone growth. *Science*. v.273, p.663-666, 1996.
- LANSKE, B; KRONENBERG, HM. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and parathyroid hormone (PTH)/PTHrP receptor. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. v.8, p.297-320, 1998.
- LAS HERAS, F; HARPAL, K; GAHUNIA, MSC; et al. Articular cartilage development: a molecular perspective structure and function of articular. *Orthopedic Clinics of North America*. v. 43, p. 155-171, 2012.
- LASSOVA, L; NIU, Z; GOLDEN, EB; et al. Thyroid hormone treatment of cultured chondrocytes mimics in vivo stimulation of collagen X mRNA by increasing BMP 4 expression. *Journal of Cellular Physiology*. v.219, p.595-605, 2009.
- LAZARUS, JE; HEGDE, A; ANDRADE, AC; et al. Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone*. v.40, p.577-586, 2007.
- LEBOY, PS; SULLIVAN, TA; NOOREYAZDAN, M; et al. Rapid chondrocyte maturation by serum-free culture with BMP-2 and ascorbic acid. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.66, p.394-403, 1997.

- LEBOY, PS. Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.1068, p.14-18, 2006.
- LEE, JM; LEE, EH; KIM, IS; et al. Deficiency leads to a reduction in skeletal size and degradation of the bone matrix. *Calcified Tissue International*. v.96, p.56–64, 2015.
- LEFEBVRE, V; LI, P; CROMBRUGGHE, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *The EMBO Reports*. v.17, p.5718-5733, 1998.
- LEFEBVRE, V; SMITS, P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. v.75, p.200-212, 2005.
- LEHMANN, W; EDGAR, CM; WANG, K. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone*. v.36, p.300-310, 2005.
- LEUNG, VYJ; GAO, B; LEUNG, KKH; et al. Sox 9 Governs differentiation stages-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLOS Genetics*. v.7, p.1-16, 2011.
- LESTER, SC; The breast. In: Robbins and Cotran Pathologic basis of disease, 7th Edit., V Kumar, AK Abbas, N Fausto, Eds Elsevier, Philadelphia, pp.119-154, 2008.
- LI, W; CHEN, J; DENG, M; et al. The zebrafish Tie2 signaling controls tip cell behaviors and acts synergistically with Vegf pathway in developmental angiogenesis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. v.46, p.641-646, 2014.
- LI, Y; DUDLEY, AT. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development*. v.136, p.1083-1092, 2009.
- LIN, HY; SU, YF; HSIEH, MT; et al. Nuclear monomeric integrin α v in cancer cells is a coactivator regulated by thyroid hormone. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. v.27, p.3209–16, 2013.
- LIN, L; SHEN, Q; XUE, T; et al. Sonic hedgehog improves redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes for articular cartilage repair. *PLoS One*. v.9, p.1-6, 2014.
- LIU, J; TANG, X; CHENG, J; et al. Analysis of the clinical and molecular characteristics of a child with achondroplasia: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine*. v.9, p.1763–1767, 2015.
- LIU, W; TOYOSAWA, S; FURUICHI, T; et al. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *Journal of Cell Biology*, v.155, p.157–166, 2001.
- LIU, Y; OLSEN, BR. Distinct VEGF functions during bone development and homeostasis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. v.62, p.363-368, 2014.
- LÖFGREN, M; EKAMAN, S; SVALA, E; et al. Cell and matrix modulation in prenatal and postnatal equine growth cartilage, zones of ranvier and articular cartilage. *Journal of Anatomy*. v.225, p.548-568, 2014.

- LONG, F; ZHANG, XM; 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.
- LUEGMAYR, E; VARGA, F; FRANK, T; et al. Effects of triiodothyronine on morphology, growth behavior, and the actin cytoskeleton in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Bone*. v.18, p.591–599, 1996.
- LUIDENS, MK; MOUSA, AS; DAVIS, FB. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, v.52, p.142–145, 2010.
- MACKIE, EJ; AHMED, YA; TATARCZUCH, L; et al. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. v. 40, p.46-62, 2008.
- MACKIE, EJ; TATARCZUCH, L; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology*. v.211, p.109-121, 2011.
- MACLEAN, HE; GUO, J; KNIGHT, MC; et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57(Kip2) mediates proliferative actions of PTHrP in chondrocytes. *Journal of Clinical Investigation*. v.113, p.1334-1343, 2004.
- MAES, C; CARMELIET, P; MOERMANS, K; et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mechanisms of Development*. v.111, p.61-73, 2002.
- MAES, C. Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcified Tissue International*. v.92, p.307–323, 2013.
- 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. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.18, p.1430-1442, 2003.
- MAIA, ZM; SANTOS, GK; BATISTA, ACM; et al. Efeitos do excesso de tiroxina materna nos ossos da prole de ratas do nascimento ao pós-desmame. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2016 (In press).
- MAISONPIERRE, PC; SURI, C; JONES, PF; et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. v.277, p.55-60, 1997.
- MAK, KK; KRONENBERG, HM; CHUANG, PT; et al. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development*. v.135, p.1947-1956, 2008.
- MAKIHIRA, S; YAN, W; MURAKAMI, H; et al. Thyroid hormone enhances aggrecanase-2 / adam-ts5 expression and proteoglycan degradation in growth plate. *Endocrinology*. v.144, p.2480–2488, 2003.
- MALININ, TI; HORNICEK, FJ. Response of human chondrocytes cultured in vitro to human somatotropin, triiodothyronine, and thyroxine. *Transplantation Proceedings*. v.29, p.2037-2039, 1997.
- MÄNNISTÖ, T; MENDOLA, P; REDDY, U; et al. Neonatal outcomes and birth weight in pregnancies complicated by maternal thyroid disease. *American Journal of Epidemiology*. v.178, p.731-740, 2013.

- MARCONDES, FK; BIANCHI, FJ; TANNO, AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. v.62, p.609-614, 2002.
- MARIE, PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. v.316, p.23-32, 2003.
- MARINI, M; BERTOLAI, R; AMBROSINI, S; et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor in human fetal skeletal site-specific tissues: Mandible versus femur. *Acta Histochemica*. v.117, p.228-234, 2015.
- MCDONNELL, S; MORGAN, M; LYNCH, C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochemical Society Transactions*, v.27, p.734-740, 1999.
- MEDICI, M; TIMMERMANS, S; VISSER, W; et al. Maternal thyroid hormone parameters during early pregnancy and birth weight: the generation r study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v.98, p.59-66, 2013.
- MESTMAN, JH. Hyperthyroidism in pregnancy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. v.27, p.127-149, 1998.
- MESTMAN, JH. Hyperthyroidism in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. v.18, p.267-288, 2004.
- MEYER, J; SÜDBECK, P; HELD, M; et al. Mutational analysis of the SOX9 gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations. *Human Molecular Genetics*. v.6, p.91-98, 1997.
- MILLAR, LK; WING, DA; LEUNG, AS; et al. Low birth weight and preeclampsia in pregnancies complicated by hyperthyroidism. *Obstetrics and Gynecology*. v.84, p.946-949, 1994.
- MILNE, M; KANG, M; QUAIL, JM; et al. Thyroid hormone excess increases insulin-like growth factor I transcripts in bone marrow cell cultures: divergent effects on vertebral and femoral cell cultures. *Endocrinology*, v.139, p.2527-2534, 1998.
- MITROU, P; RAPTIS, AS; DIMITRIADIS, G. Insulin action in hyperthyroidism: a focus on muscle and adipose tissue. *Endocrine Reviews*. v.31, p.663-679, 2010.
- MIURA, Y; TAKAHASHI, T; JUNG, SM; et al. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *Journal of Biological Chemistry*. v.277, p.4619-46204, 2002a.
- MIURA, M; TANAKA, K; KOMATSU, Y; et al. A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)(2)D(3) in osteoclast formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.291, p.987-994, 2002b.
- MOSEKILDE, L; ERIKSEN, EF; CHARLES, P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. v.19, p.35-63, 1990.
- MUELLER, MB; FISCHER, M; ZELLNER, J; et al. Effect of parathyroid hormone-related protein in an in vitro hypertrophy model for mesenchymal stem cell chondrogenesis. *International Orthopaedics*. v.37, p.945-951, 2013.

- MUNDLOS, S; OLSEN, BR. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. v.11, p.125–132, 1997.
- MUNDLOS, S; OTTO, F; MUNDLOS, C; et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*. v.89, p.773-779, 1997.
- MUNDY, GR; SHAPIRO, JL; BANDELIN, JG; et al. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. *Journal of Clinical Investigation*. v.58, p.529–534, 1976.
- MURAKAMI, S; KAN, M; MCKEEHAN, WL; et al. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.97, p.1113-1118, 2000.
- MURATA, M; YUDOH, K; MASUKO, K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage. How the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage*, v.16, p.279-286, 2008.
- NAGAI, H; AOKI, M. Inhibition of growth plate angiogenesis and endochondral ossification with diminished expression of MMP-13 in hypertrophic chondrocytes in FGF-2-treated rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. v.20, p.142-147; 2002.
- NAGASE, H; SUZUKI, K; CAWSTON, TE; et al. Involvement of a region near valine-69 of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in the interaction with matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). *Biochemical Journal*, v. 325, p. 163-167, 1997.
- NAKAMURA, T; NARUSE, M; CHIBA, Y; et al. Novel hedgehog agonists promote osteoblast differentiation in mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*. v.230, p.922-929, 2015.
- NAKASHIMA, K; ZHOU, X; KUNKEL, G; et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. v.108, p.17-29, 2002.
- NAZARPOUR, S; TEHRANI, FR; SIMBAR, M; et al. Thyroid dysfunction and pregnancy outcomes. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. v.13, p.387-396, 2015.
- NILSSON, O; MARINO, R; LUCA, F; et al. Endocrine regulation of the growth plate. *Hormone Research*. v.64, p.157-165, 2005.
- NICHOLLS, JJ; BRASSILL, MJ; WILLIAMS, GR; et al. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *Journal of Endocrinology*. v.213, p.209-221, 2012.
- NUNES, MT. Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. v.47, p.639-643, 2003.
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. v.287, p.795-801, 1980.
- O'SHEA, PJ; HARVEY, CB; SUZUKI, H; et al. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Molecular Endocrinology*. v.17, p.1410-1424, 2003.
- OBERLANDER, S; TUAN, RS. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*. v.120, p.177-187, 1994.

- OGILVY-STUART, AL. Neonatal thyroid disorders. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. v.87, p.165-171, 2002.
- OH, CD; MAITY, SN, LU, JF; et al. Identification of SOX9 interaction sites in the genome of chondrocytes. *PLoS One*. v.5, p.1-12, 2010.
- OHLSSON, C; NILSSON, A; ISAKSSON, O; et al. Effects of triiodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3 H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *Journal of Endocrinology*. v.135, p.115-123, 1992.
- OKUBO, Y; REDDI, AH. Thyroxine downregulates Sox9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.306, p.186-190, 2003.
- OLIVEIRA, TS; NUNES, VA; NASCIMENTO, EF; et al. Histomorphometry and histochemistry of the uterine tubes and uterus of puberal and prepuberal rats induced for hyperthyroidism. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.57, p.448-456, 2005.
- OLSEN, BR; REGINATO, AM; WANG, W. Bone development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. v.16, p.191-220, 2000.
- OLTVAI, ZN; MILLIMAN, CL; KORSMEYER, SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. v.74, p.609-619, 1993.
- ORI, A; WILKINSON, MC; FERNIG, DG. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. *Frontiers in Bioscience*. v.13, p. 4309-4338, 2008.
- ORNITZ, DM; MARIE, PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & Development*. v.16, p.1446-1465, 2002.
- ORNITZ, DM. FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Reviews*. v.16, p.205-213, 2005.
- ORNITZ, DM; MARIE, PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes & Development*. v.29, p.1463-186, 2015.
- OTTO, F; THORNELL, AP; 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.
- OVADIA, M; PARKER, CH; LASH, JW. Changing patterns of proteoglycan synthesis during chondrogenic differentiation. *Journal of embryology and experimental morphology*. v.56, p.59-70, 1980.
- PARK, J; GEBHARDT, M; GOLOVCHENKO, S; et al. Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte- derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage. *Biology Open*. v.4, p.608-621, 2015.
- PASCUAL, A; ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1830, p.3908-3916, 2013.
- PATEL, J; LANDERS, K; LI, H; et al. Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. v. 22, p.164-170, 2011.

- PENG, H; USAS, A; OLSHANSKI, A; et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.20, p.2017–27, 2005.
- PEPENE, CE; SECK, T; PFEILSCHIFTER, J; et al. The effects of triiodothyronine on human osteoblastic-like cells metabolism and interactions with growth hormone. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. v.111, p.66-72, 2003.
- PERBAL, B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Molecular Pathology*. v.54, p.57-79, 2001.
- PERRIER-GROULT, E; PASDELOUP, M; MALBOUYRES, M. Control of collagen production in mouse chondrocytes by using a combination of bone morphogenetic protein-2 and small interfering RNA targeting Col1a1 for hydrogel-based tissue-engineered cartilage. *Tissue Engineering Part C: Methods*. v.19, p.652-664, 2013.
- PERRIMON, N; HACKER, U. Wntless, hedgehog and heparan sulfate proteoglycans. *Development*, v.131, p. 2509–2511, 2004.
- PETÁK, I; HOUGHTON, JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathology & Oncology Research*. v.7, p.95-106, 2001.
- PÉTER, F; MUZSNAI, A. Congenital Disorders of the Thyroid: Hypo/Hyper. *Pediatric Clinics of North America*. v.58, p.1099-1115, 2011.
- PETERS, KG; WERNER, S; CHEN, G; et al. Two FGF receptors genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development*. v.114, p.233-243, 1992.
- PHOOJAROENCHANACHAI, M; SRIUSSADAPORN, S; PEERAPATDIT, T; et al. Effect of maternal hyperthyroidism during late pregnancy on the risk of neonatal low birth weight. *Clinical Endocrinology*. v.54, p.365-370, 2001.
- PHORNPHUTKUL, C; WU, KY; AUYEUNG, V; et al. mTOR signaling contributes to chondrocyte differentiation. *Developmental Dynamics*. v.237, p.702-712, 2008.
- PIGNATTI, E; ZELLER, R; ZUNIGA, A. To BMP or not to BMP during vertebrate limb bud development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. v.32, p.1-9, 2014.
- PINES, M; HURWITZ, S. The role of the growth plate in longitudinal bone growth. *Poultry Science*. v.70, p.1806-1814, 1991.
- PITOL, DL; CAETANO, FH; LUNARDI, LO. Microwave-induced fast decalcification of rat bone for electron microscopic analysis: an ultrastructural and cytochemical study. *The Brazilian Dental Journal*. v.18, p.153-157, 2007.
- POLAK, M; LEGAC, I; VUILLARD, E; et al. Congenital Hyperthyroidism: The fetus as a patient. *Hormone Research*. v.65, p.235–242, 2006.
- RABIER, B; WILLIAMS, AJ; MALLEIN-GERIN, F; et al. Thyroid hormone-stimulated differentiation of primary rib chondrocytes in vitro requires thyroid hormone receptor beta. *Journal of Endocrinology*. v.191, p.221–228, 2006.
- RANDAU, TM; SCHILDBERG, FA; ALINI, M; et al. The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells. *PLoS One*. v.8, p.1-17, 2013.

- REDDI, AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: Inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Engineering*. v.6, p.351–359, 2000.
- REN, SG; HUANG, Z; SWEET, DE; et al. Biphasic response of rat tibial growth to thyroxine administration. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, v.122, p.336-40, 1990.
- REYNOLDS, JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Journal Oral Diseases*. v.2, p.70-76, 1996.
- RIBEIRO, AFC; SERAKIDES, R; OCARINO, NM; et al. Effect of the hypothyroidism-castration association on the bone and parathyroids from adult female rats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.48, p.525-534, 2004.
- RIVKEES, SA; BODE, HH; CRAWFOR, JD. Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. *New England Journal of Medicine*. v.318, p.599-602, 1988.
- ROACH, HI; AIGNER, T; KOURI, JB. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis*, v.9, p.265–277, 2004.
- ROBSON, H; SIEBLER, T; SHALET, SM; et al. Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth. *Pediatric Research*. v.52, p.137-147, 2002.
- ROBSON, H; SIEBLER, T; STEVENS, DA; et al. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology*. v.141, p.3887-3897, 2000.
- ROMEREIM, SM; CONOAN, NH; CHEN, B; et al. A dynamic cell adhesion surface regulates tissue architecture in growth plate cartilage. *Development*. v.141, p.2085-2095, 2014.
- ROUGHLEY, PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. PJ Roughley *European Cells and Materials*. v.12, p.92–101, 2006.
- RUOSLAHTI, E; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. v.64, p.867–869, 1991.
- SAHARINEN, P; BRY, M; ALITALO, K. How do angiopoietins tie in with vascular endothelial growth factors? *Current Opinion In Hematology*. v.12, p.198-205, 2010.
- SALMINEN, H; VUORIO, E; SÄÄMÄNEN, AM. Expression of Sox9 and type IIA procollagen during attempted repair of articular cartilage damage in a transgenic mouse model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. v.44, p.947-955, 2001.
- SAMPAIO, I. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 2002, 256p.
- SANTOS, FC; SILVA, JF; BOELONI, JN; et al. Morphological and immunohistochemical characterization of angiogenic and apoptotic factors and the expression of thyroid receptors in the ovary of tilapia *Oreochromis niloticus* in captivity. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, p.371-376. 2015.
- SAP, J; MUNOZ, A; DAMM, K; et al. The c-erb-A protein is a highaffinity receptor for thyroid hormone. *Nature*. v.324, p.635-640, 1986.

- SARLIEVE, LL; RODRIGUEZ-PENA, A; LANGLEY, K; et al. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in the oligodendrocyte lineage. *Neurochemical Research*. v.29, p.903-922, 2004.
- SASAKI, J; MATSUMOTO, T; EGUSA, H; et al. In vitro reproduction of endochondral ossification using a 3D mesenchymal stem cell construct. *Integrative Biology*, v.4, p.1207-1214, 2012.
- SATO, K; HAN, DC; FUJII, Y; et al. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology*. v.120, p.1873-81, 1987.
- SATO, TN; TOZAWA, Y; DEUTSCH, U; et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. v.376, p.70-74, 1995.
- SCHIPANI, E; PROVOT, S. PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development. *Birth Defects Research*. v.69, p.352-362, 2003.
- SCHIPANI, E; RYAN, HE; DIDRICKSON, S; et al. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes & Development*. v.15, p.2865-2876, 2001.
- SCHLESSINGER, J; PLOTNIKOV, NA; IBRAHIMI, AO; et al. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in fgfr binding and dimerization. *Molecular Cell*. v.6, p.743-750, 2000.
- SEGNI, M; LEONARDI E; MAZZONCINI B; et al. Special features of Graves' disease in early childhood. *Thyroid*. v.9, p.871-877, 1999.
- SEGNI, M; GORMAN, CA. The aftermath of childhood hyperthyroidism. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. v.14, p.1277-1282, 2001.
- SELMI-RUBY, S; BOUAZZA, L; OBREGON, MJ; et al. The targeted inactivation of TRβ gene in thyroid follicular cells suggests a new mechanism of regulation of thyroid hormone production. *Endocrinology*. v.155, p.35-646, 2014.
- SERAKIDES, R; NUNES, VA; SANTOS, RL; et al. Histomorphometry and quantification of nucleolar organizer regions in bovine thyroid containing methylthiouracil residues. *Veterinary Pathology*. v.36, p.574-582, 1999.
- SERAKIDES, R; NUNES, VA; NASCIMENTO, EF; et al. Hypogonadism and thyroid function in hyper and euthyroid rats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.52, p.571-578, 2000.
- SERAKIDES, R; NUNES, VA; SILVA, CM; et al. Influência do hipogonadismo na histomorfometria e função tireoidiana de ratas hipotireóideas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.54, p.473-477, 2002.
- SERAKIDES, R; NUNES, VA; OCARINO, NM; et al. Efeito da associação hipertireoidismo-castração no osso de ratas adultas. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. v.48, p.875-884, 2004.
- SERAKIDES, R; OCARINO, NM; CARDOSO, TGS; et al. Resposta da paratireóide de ratas às variações do cálcio e fósforo plasmáticos no hipertireoidismo e hipogonadismo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 57, p. 48-54, 2005.

SERAKIDES, R; OCARINO, NM; MAGALHÃES, FC; et al. Histomorfometria óssea de ratas hipertireóideas lactantes e não-lactantes. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. v.52, p.677-683, 2008.

SETTEMBRE, C; ARTEAGA-SOLIS, E; MCKEE, MD; et al. Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes & Development*. v.22, p.2645-2650, 2008.

SHALABY, F; ROSSANT, J; YAMAGUCHI, TP; et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. v.376, p.62-66, 1995.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Journal of European Cells and Materials*. v.15, p.53-76, 2008.

SHAPIRO, F; FORRIOL, F. El cartílago de crecimiento: biología y biomecánica del desarrollo. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. v.49, p.55-67, 2005.

SHAPIRO, IM; ADAMS, CS; FREEMAN, T; et al. Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. v.75, p.330-339, 2005.

SHAPIRO, IM; LAYFIELD, R; LOTZ, M; et al. Boning up on autophagy: The role of autophagy in skeletal biology. *Autophagy*. v.10, p.7-19, 2014.

SHEU, TJ; ZHOU, W; FAN, J; et al. Decreased BMP2 signal in GIT1 knockout mice slows bone healing. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v.397, p.67-74, 2014.

SHORT, KR; NYGREN, J; NAIR, KS. Effect of T(3)- induced hyperthyroidism on mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates in oxidative and glycolytic tissues in rats. *The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v.292, p.642-647, 2007.

SHRAGA-HELED, N; KESSLER, O; PRAHST, C; et al. Neuropilin-1 and neuropilin-2 enhance VEGF121 stimulated signal transduction by the VEGFR-2 receptor. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, v.21, p.915-926, 2007

SHUM, L; COLEMAN, CM; HATAKEYAMA, Y; et al. Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. v. 69, p.102-122, 2003.

SILVA, AE; SERAKIDES, R; FERREIRA, E; et al. Effect of hypothyroidism on the solid form of Ehrlich tumor in intact or castrated adult female mice. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*. v.48, p.867-74, 2004.

SILVA, JF; OCARINO, NM; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. *Reproduction*. v.147, p.803-816, 2014.

SILVA, JF; OCARINO, NM; SERAKIDES, R. Placental angiogenic and hormonal factors are affected by thyroid hormones in rats. *Pathology, Research and Practice*. v.211, p.226-34, 2015.

SILVA, JF; OCARINO, NM; VIEIRA, ALS; et al. Effects of hypo- and hyperthyroidism on proliferation, angiogenesis, apoptosis and expression of COX-2 in the corpus luteum of female rats. *Reproduction in Domestic Animals*. v.48, p. 691-698, 2013.

SILVA, JF; VIDIGAL, PN; GALVÃO, DD; et al. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. *Reproduction, Fertility, and Development*. v.24, p.923-931, 2012.

SIMPSON, ME; ASLING, CW; EVANS, HM. Some endocrine influences on skeletal growth and differentiation. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v.23, p.1-27, 1950.

SINGH, H; MILNER, CS; AGUIAR HERNANDEZ, MM; et al. Vascular endothelial growth factor activates the Tie family of receptor tyrosine kinases. *Cellular Signalling Journal*. v.21, p.1346-1350, 2009.

SO, CL; KALUARACHCHI, K; TAM, PP; et al. Impact of mutations of cartilage matrix genes on matrix structure, gene activity and chondrogenesis. *Osteoarthritis Cartilage*. v.9, p.160-173, 2001.

SOUNG, DY; DONG, Y; WANG, Y; et al. Runx3/AML2/Cbfa3 regulates early and late chondrocyte differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.22, p.1260-1270, 2007.

SOUZA, CA; OCARINO, NM; SILVA, JF; et al. Administration of thyroxine affects the morphometric parameters and VEGF expression in the uterus and placenta and the uterine vascularization but does not affect reproductive parameters in gilts during early gestation. *Reproduction in Domestic Animals*. v.46, p.7-16, 2011.

SOUZA, RS; PINHAL, MAS. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, v.36, p. 48-54, 2011.

SPIEGELAERE, W; CORNILLIE, P; ERKENS, T; et al. Expression and localization of angiogenic growth factors in developing porcine mesonephric glomeruli. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. v.58, p.1045–1056, 2010.

SRINIVAS, V; BOHENSKY, J; ZAHM, AM; et al. Autophagy in mineralizing tissues: Microenvironmental perspectives. *Cell Cycle* v.8, p.391-393, 2009.

STAINES, KA; POLLARD, AS; MCGONNELL, IM; et al. Cartilage to bone transitions in health and disease. *Journal of Endocrinology*. v.219, p.1-12, 2013.

STEVENS, DA; HARVEY, CB; SCOTT, AJ. Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone. *Molecular Endocrinology*. v.17, p.1751-1766, 2003.

STEVENS, DA; HASSERJIAN, RP; ROBSON, H; et al. Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptors during endochondral bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.15, p.2431-42, 2000.

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

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

STOCKWELL, RA. Chondrocytes. *Journal of clinical pathology. Supplement (Royal College of Pathologists)*. v.12, p.7–13, 1978.

- STRATTON, R; SHIWEN, X; MARTINI, G; et al. Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *Journal of Clinical Investigation*. v.108, p.241-250, 2001.
- STREULI, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Current Opinion in Cell Biology*, v.11, p.634–640, 1999.
- STRICKER, S; FUNDELE, R; VORTKAMP, A; et al. Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Developmental Biology*. v.245, p.95-108, 2002.
- SU, N; DU, X; CHEN, L. FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases. *Frontiers in Bioscience*. v.13, p.2842-2865, 2008.
- SUUTRE, S; TOOM, A; AREND, A; et al. Involvement of BMP-2, TGF- β 2 and TGF- β 3 signaling in initial and early stages of heterotopic ossification in a rat experimental model. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. v.37, p.31-40, 2010.
- SUWANWALAIKORN, S; ONGPHIPHADHANAKUL, B; BRAVERMAN, LE; et al. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats. *European Journal of Endocrinology*. v.134, p.655-659, 1996.
- TAKEDA, S; BONNAMY, JP; OWEN, MJ; et al. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes & Development*, v.15, p.467–481, 2001.
- TAKIMOTO, A; NISHIZAKI, Y; HIRAKI, Y; et al. Differential actions of VEGF-A isoforms on perichondrial angiogenesis during endochondral bone formation. *Developmental Biology*. v.332, p.196-211, 2009.
- TAMAYOSE, K; HIRAI, Y; SHIMADA, T. A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Human Gene Therapy*. v. 7, p.507-513, 1996.
- TANG, W; YANG, F; LI, Y; et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) in osteoblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. v.287, p.1671-1678, 2012.
- TARE, RS; TOWNSEND, PA; PACKHAM, GK; et al. Bcl-2-associated athanogene-1 (BAG-1): A transcriptional regulator mediating chondrocyte survival and differentiation during endochondral ossification. *Bone*. v.42, p.113-128, 2008.
- TEW, SR; POTHACHAROEN, P; KATOPODI, T; et al. SOX9 transduction increases chondroitin sulfate synthesis in cultured human articular chondrocytes without altering glycosyltransferase and sulfotransferase transcription. *Biochemical Journal*. v.414, p.231-236, 2008.
- TICKLE, C. Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Developmental Cell*, v.4, p.449–458, 2003.
- TOPCZEWSKI, J; SEPICH, DS; MYERS, DC; et al. The zebrafish glypican knypek controls cell polarity during gastrulation movements of convergent extension. *Developmental Cell*. v.1, p.251-264, 2001.

- TRZEPACZ, PT; KLEIN, I; ROBERTS, M; et al. Graves' disease: an analysis of thyroid hormone levels and hyperthyroid signs and symptoms. *The American Journal of Medicine*. v.87, p.558-61, 1989.
- TSANG, K; CHAN D; CHEAH, K; Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: Death or lineage extension? *Development Growth & Differentiation*. v.57, p.179-192, 2015.
- TSANG, K; TSANG, S; CHAN, D; et al. The chondrocytic journey in endochondral bone growth and skeletal dysplasia. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. v.102, p.52-73, 2014.
- TSOURDI, E; RIJNTJES, E; KÖHRLE, J. Hyperthyroidism and hypothyroidism in male mice and their effects on bone mass, bone turnover, and the wnt inhibitors sclerostin and dickkopf-1. *Endocrinology*. v.156, p.3517-3527, 2015.
- TSUMAKI, N; YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Reviews*. v.16, p.279-285, 2005.
- TURNER, N; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*. v.10, p.116-129, 2010.
- VAES, BLT; DUCY, P; SIJBERS, AM; et al. Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone*. v.39, p.724-738, 2006.
- VARGA, F; RUMPLER, M; KLAUSHOFER, K. Thyroid hormones increase insulin-like growth factor mRNA levels in the clonal osteoblastic cell line MC3T3-E1. *FEBS Lett*. v.345, p.67-70, 1994.
- VARGA, A; RUMPLER, A; ZOEHRER B; et al. T3 affects expression of collagen I and collagen cross-linking in bone cell cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.402, p.180-185, 2010.
- VISCO, DM; VAN SICKLE, DC; HILL, MA; et al. The vascular supply of the chondro-epiphyses of the elbow joint in young swine. *Journal of Anatomy*. v.163, p.215-29, 1989.
- VISSER, WE; FRIESEMA, ECH; VISSER, TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Molecular Endocrinology*. v.25, p.1-14, 2011.
- VORTKAMP, A. Skeleton morphogenesis: defining the skeletal elements. *Current Biology*. v.7, p.104-107, 1997.
- VORTKAMP, A; PATHI, S; PERETTI, GM; et al. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mechanisms of Development*. v.71, p.65-76, 1998.
- VU, T; SHIPLEY, HJM; BERGERS G; et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*. v.93, p.411-422, 1998.

WALLIS, GA. Bone growth: Coordinating chondrocyte differentiation. *Current Biology*. v.6, p.1577–1580, 1996.

WANG, L; SHAO, YY; BALLOCK, RT. Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.22, p.1988-1995, 2007.

WANG, L; SHAO, YY; BALLOCK, RT. Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of β -catenin signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.25, p.1138-1146, 2010.

WAUNG, JÁ; BASSETT, JH; WILLIAMS, GR. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. v.23, p.155–161, 2012.

WAUNG, JA; BASSETT, JHD; WILLIAMS, GR. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. v.23, p.155-162, 2012.

WEIR, EC; PHILBRICK, WM; AMLINGT, M; et al. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Developmental Biology*. v.93, p.10240-10245, 1996.

WEISE, M; DE-LEVI, S; BARNES, KM; et al. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.98, p.6871-6876, 2001.

WEISS, RE; REDDI, AH. Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.77, p.2074-2078, 1980.

WEISS, S; HENNIG, T; BOCK, R; et al. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*. v.223, p.84-93, 2010.

WHITE, A; WALLIS, G. Endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralisation. *Current Biology*. v.11, p.589-91, 2001.

WIERSINGA, WM. Adult hypothyroidism. In: DE GROOT, LJ; BECK-PECCOZ, P; CHROUSOS, G; et al. Editors. South Dartmouth (MA): 2000, pp. 423–426. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285561/>. Acesso em: 28 de novembro de 2016.

WILLIAMS, GR. Thyroid hormone actions in cartilage and bone. *European Thyroid Journal*. v.2, p.3-13, 2013.

WILLIAMS, GR; ROBSON, H; SHALET, SM. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *Journal Endocrinology*. v.157, p.391-403, 1998.

- WOZNEY, JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Molecular Reproduction and Development*. v.32, p.160-167, 1992.
- WRIGHT, E; HARGRAVE, MR; CHRISTIANSEN, J; et al. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nature Genetics*. v.9, p.15–20, 1995.
- YANG, J; ANDRE, P; YE, L; et al. The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *International Journal of Oral Science*. v.7, p.73-79, 2015.
- YANG, L; TSANG, KY; TANG, HC; et al. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.111, p.12097–12102, 2014).
- YANG, Y. Skeletal Morphogenesis during embryonic development. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*. v.19, p.197-218, 2009.
- YANG, YQ; TAN, YY; WONG, R; et al. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *International Journal of Oral Science*. v.4, p.64-68, 2012.
- YATES, KE; ALLEMANN, F; GLOWACKI, J. Phenotypic analysis of bovine chondrocytes cultured in 3D collagen sponges: effect of serum substitutes. *Cell and Tissue Banking*, v.6, p.45-54, 2005.
- YEN, PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*. v.81, p.1097–1142, 2001.
- YOSHIDA, CA; YAMAMOTO, H; FUJITA, T; et al. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & Development*. v.18, p.952-963, 2004.
- YU, K; ORNITZ, DM. The FGF ligand-receptor signaling system in chondrogenesis, osteogenesis and vascularization of the endochondral skeleton. *International Congress Series*. v.1302, p.67-78, 2007.
- ZELZER, E; GLOTZER, DJ; HARTMANN, C; et al. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanism of Development*. v.106, p.97-106, 2001.
- ZELZER, E; MAMLUK, R; FERRARA, N; et al. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development*. v.131, p.2161-2171, 2004.
- ZELZER, E; MCLEAN, W; NG, YS; et al. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*. v.129, p.1893–1904, 2002.
- ZELZER, E; OLSEN, BR. Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Current Topics in Developmental Biology*. v.65, p.169-87, 2005.
- ZHANG, S; XIAO, Z; LUO, J; et al. Dose-dependent effects of Runx2 on bone development. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.24, p.1889-1904, 2009.

ZHANG, W; CHEN, J; ZHANG, S; et al. Inhibitory function of parathyroid hormone-related protein on chondrocyte hypertrophy: the implication for articular cartilage repair. *Arthritis Research & Therapy*. v.14, p. 1-10, 2012.

ZHOU, X; VON DER MARK, K; HENRY, S; et al. Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLOS Genetics*. v.10, p.1-20, 2014.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado do CEUA

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UFMG	CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 47 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Efeito do hipertireoidismo materno e neonatal induzido na atividade proliferativa, apoptótica, angiogênica, de diferenciação e de síntese de", que tem como responsável Rogéria Serakides, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 15/04/2014. Este certificado espira-se em 15/04/2019.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 47 / 2014, related to the Project entitled "Effect of induced maternal hyperthyroidism and neonatal in proliferative activity, apoptosis, angiogenesis, differentiation and synthesis of", under the supervision of Rogéria Serakides, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 15/04/2014. This certificate expires in 15/04/2019.	
Jacqueline Isaura Alvarez Leite Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 15/04/2014.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	

Anexo 2. Preparo da solução de tiroxina (50µg/5mL) para indução do hipertireoidismo

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

Anexo 3. Metodologia para descalcificação dos ossos longos

- Fixar os ossos em formalina a 10%, neutra e tamponada.
- Retirar os tecidos musculares e conectivos adjacentes.
- Imergir as amostras na solução 1 por 24 horas sem tocar no fundo do recipiente.
- Imergir as amostras na solução 2 sem tocar no fundo do recipiente, até completa descalcificação. Exames radiográficos dos ossos podem ser realizados para verificar a presença de cálcio no tecido.
- Lavar em água corrente por 24h.
- Seccionar os ossos em duas metades, pelo seu eixo longitudinal.

Solução 1 de EDTA

EDTA	0,7g
Tartarato de sódio e potássio	8g
Tartarato de sódio	0,14g
Hcl	120ml
H2O destilada	900ml

Solução 2 de EDTA a 10%

EDTA	10 g
H2O destilada	100ml

Anexo 4. Técnica de inclusão em parafina para processamento histológico de ossos

Processar os ossos pela técnica de inclusão em parafina que consiste na passagem dos ossos nas seguintes etapas:

Álcool 70%	2 h
Álcool 80%	2 h
Álcool 90%	2 h
Álcool Absoluto Usado	2 h
Álcool Absoluto Novo	2 h
Xilol	40 min
Embebição pela parafina	40 min

Anexo 5. Técnica de coloração pela hematoxilina-eosina

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

Estufa 60°C	15 min
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Álcool Absoluto I	10 min
Álcool Absoluto II	10 min
Álcool Absoluto III	10 min
Álcool 90%	10 min
Álcool 80%	10 min
Água Destilada	3 min
Hematoxilina	1 min
Água Corrente	10 min
Eosina	2 min
Álcool 95%	20 seg
Álcool 95%	20 seg
Álcool Absoluto I	10 min
Álcool Absoluto II	10 min
Álcool Absoluto III	10 min
Xilol I	2 min
Xilol II	2 min
Montagem da lâmina com bálsamo		

Anexo 6. Protocolo para gelatinizar lâminas

Reagentes:

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

Modo de preparo:

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

Água destilada	Mergulhar 2 x
Solução de gelatina	30 min.

Secar ao ar livre em local livre de poeira por 24 h

Anexo 7. Protocolo da imunistoquímica para osso

Kit: Estreptovidina-biotina-peroxidase

Xilol I	30 min
Xilol II	30 min
Álcool Absoluto I	10 min
Álcool Absoluto II	10 min
Álcool Absoluto III	10 min
Álcool 90%	10 min
Álcool 80%	10 min
Álcool 70%	10 min
Água corrente	5 min
Banho Maria a 98°C (Trilogy™) (20 min no banho maria e 20 min na temperatura ambiente)	40 min
3x PBS	5 min
Bloqueio da peroxidase (câmara escura – 6 ml de H ₂ O ₂ e 194 ml de metanol)	30 min
3x PBS	5 min
Soro bloqueio (câmara úmida a temperatura ambiente)	30 min
Anticorpo 1° (câmara úmida na geladeira)	15 a 18h
3x PBS	5 min
Anticorpo 2° (câmara úmida a temperatura ambiente)	45 min
3x PBS	5 min
Estreptovidina-peroxidase (câmara úmida a temperatura ambiente)	30 min
3x PBS	5 min
DAB (tempo variou com anticorpo 1°)	x
Água corrente	10 min
Hematoxilina	60 seg
ou Methyl green	30 min
Água corrente	10 min
Álcool 70%	10 min
Álcool 80%	10 min
Álcool 90%	10 min
Álcool Absoluto III	10 min
Álcool Absoluto II	10 min
Álcool Absoluto I	10 min
Xilol II	10 min
Xilol I	10 min
– Montagem da lâmina	

Anexo 8. Extração de RNA total com trizol (tecido)

- Homogeneizar o fragmento de tecido dentro de um microtubo de 1,5 ml com 500 µL de Trizol com o uso de um homogeinizador.
- Adicionar mais 500 µL de Trizol no microtubo e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- Adicionar 200 µL de clorofórmio/ microtubo, agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos no gelo.
- Centrifugar por 15 minutos a 12000g (4°C).
- Transferir a fase aquosa para outro microtubo.
- Adicionar 500 µL de isopropanol e incubar por 30 minutos a -80°C .
- Descongelar no gelo e centrifugar por 10 minutos a 12000g (4°C).
- Retirar o sobrenadante e colocar em outro microtubo. Acondicionar o pellet no gelo e centrifugar o sobrenadante por 10 min a 12000g (4°C).
- Descartar o sobrenadante e lavar os pellets com 1 ml de etanol 75%.
- Centrifugar por 5 minutos a 10500g (4°C).
- Secar o pellet por 5 minutos.
- Dissolver o pellet em água DEPC (20 µl).
- Colocar todos os tubos no termobloco a 56°C durante 10 minutos (para solubilizar o RNA)
- Dosar o RNA Nanovit.

Anexo 9. Síntese do 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.
 - o Ex.: a dosagem de um determinado RNA foi: 400 µg/1000 µL
 - o 400 µg _____ 1000 µL
 - o 1 µg _____ x
 - o x = 2,5 µL de RNA
- Assim colocar 2,5 µL de RNA + 5,5 µL de água DEPC, pois o volume total (RNA + água) é de 8 µL.

Preparar o Master MIX :

Master MIX	1x	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 no Termociclador programado da seguinte forma:
 - o 25°C por 10 minutos; 42°C por 50 minutos; 85°C por 5 minutos e *hold* – 4°C
- Colocar no gelo as amostras e adicionar 1 µL de RNase H por tubo. Colocá-los no Termociclador novamente programado da seguinte forma:
 - o 37°C por 20 minutos e *hold* – 4°C
- Estocar o cDNA a -20°C

Anexo 10. RT-PCR tempo real

- Kit utilizado: kit SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Aparelho utilizado: *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*
- Recomendação do kit: volume final de reação de 50 µL, porém faz-se 25 µL de volume final, ou seja, 2,5 µL de cDNA para 25 µL de reação.
- Preparar o Mix:

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

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 22,5 µL de MIX em cada poço e acrescentar 2,5 µL de cDNA (um por amostra) ou 2,5 µL de água DEPC (controle negativo).

Diluição do Rox: 1 µL do Rox concentrado para 9 µL de água DEPC

Preparar um MIX para cada *primer*, sendo que se coloca primeiro a água DEPC, segundo o *SYBR Green*, terceiro o *Rox* e depois os *primers forward* e *reverse*.

- Após preparar a placa de PCR contendo MIX + cDNA é importante dar um *spin* na placa antes de colocá-la na máquina de PCR tempo real.
- Programação da máquina de RT-PCR (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*):

	Estágio	Repetições	Temperatura	Tempo
Ativação da enzima (hold)	1	1	95°C	10 min
PCR (ciclos)	2	40	95°C 60°C	15 sec 1 min

Anexo 11. Protocolo da coloração por safranina-O

Hidratar as lâminas igual à técnica de HE.

Fast Green	5 min
Ácido Acético	2 min
Safranina	5 min
álcool absoluto I	2 seg
álcool absoluto II	15 min
Xilol I	2 min
Xilol II	2 min

Solução de Safranina-O 0,1%

Safranina O	0,1g
Água Destilada.	100mL

Solução de Fast Green 0,01%

Fast Green	0,1g
Água Destilada.	1000mL

Solução de Ácido Acético 1%

Ácido Acético	1 mL
Água Destilada.	99 mL

Anexo 12. Protocolo da coloração por alcian blue (pH 2,5)

Solução de Ácido Acético 3%

Ácido Acético	3 mL
Água Destilada.	99 mL

Hidratar as lâminas igual à técnica de HE.

Ácido Acético	3 min
Alcian Blue	30 min
Água corrente	10 min
Eosina	1 min

Desidratar as lâminas igual à técnica de HE.

Montagem da lâmina com bálsamo

Anexo 13. Protocolo da coloração por ácido periódico de *schiff* (PAS)

Solução de ácido periódico

Acido periódico	1g
Água Destilada.	100mL

Reagente de schiff

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

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

Hidratar as lâminas igual à técnica de HE.

Ácido periódico	10 min
Água destilada	2 seg
Reativo de schiff	20 min
Água corrente	10 min
Hematoxilina	1 min
Água corrente	10 min

Desidratar as lâminas igual à técnica de HE.

Montagem da lâmina com bálsamo