

## Comunicação

[Communication]

### Expressão da caderina na discondroplasia tibial

[Cadherin expression in the tibial dyschondroplasia]

F. Capela e Silva<sup>1,2</sup>, E. Lamy<sup>2</sup>, A. Pereira<sup>2,3</sup>, J.C. Reis<sup>4</sup>, J.C. Potes<sup>2,4</sup>, A.S. Cabrita<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia - Universidade de Évora, Portugal

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais (ICAAM) Mediterrânicas - Universidade de Évora, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia - Universidade de Évora, Portugal

<sup>4</sup>Departamento de Medicina Veterinária - Universidade de Évora, Portugal

<sup>5</sup>Instituto de Patologia Experimental - Universidade de Coimbra, Portugal

A discondroplasia da tibia consiste numa anomalia das placas de crescimento epifisárias dos ossos longos, das estirpes de rápido crescimento de espécies avícolas, caracterizada pelo aparecimento de massa cartilaginosa branca avascular, opaca, que se estende até à metafíse, numa zona em que, normalmente, existe osso trabecular (Leach e Lilburn, 1992). Além do aparecimento espontâneo, que, segundo alguns autores, tem uma forte base genética, vários fatores, designadamente, nutricionais, micotoxinas e alguns ditiocarbamatos afetam a incidência e a gravidade das lesões discondroplásicas (Orth e Cook, 1994).

A maior parte da investigação realizada tem caracterizado a cartilagem discondroplásica e a cartilagem normal como expressão de vários genes e dos seus produtos (Farquharson e Jefferies, 2000; Praul et al., 2000; Leach e Monsonego-Ornan, 2007). A sua etiologia e os mecanismos de desenvolvimento das lesões não estão ainda devidamente esclarecidos, mas é de supor que tenha uma origem multifatorial (Cook et al., 1994; Pizauro Júnior et al., 2002). As lesões discondroplásicas podem ser transitórias, mas têm consequências permanentes no desenvolvimento do esqueleto, pois as massas de cartilagem não reabsorvida vão, muito provavelmente, interferir no conjunto das interações célula-célula e célula-matriz associadas ao normal decurso do processo de ossificação endocondral. As caderinas

constituem uma família de glicoproteínas transmembranares de cadeia simples, responsáveis pela adesão entre células, por meio de mecanismo dependente da presença de cálcio. As caderinas expressam-se em muitos tipos celulares, incluindo as células ósseas e cartilaginosas, e sabe-se que têm uma participação ativa nos processos de condrogênese e de osteogênese (Helfrich e Horton, 1999; DeLise et al., 2000; Marie, 2002).

Foram utilizados 40 frangos de corte, da linhagem Cobb, criados em sistema padronizado, com ração e água *ad libitum*, cumprindo as normas de bem-estar animal (FELASA, <<http://www.felasa.eu/>>). Aos 21 dias de idade, as aves foram distribuídas em dois grupos de 20 animais; grupo-controle e grupo experimental.

Para obtenção de aves com lesões discondroplásicas, incorporou-se à dieta do grupo-experimental ditiocarbamato tirame (Sigma Chemical Co. Saint Louis, EUA - CAS n.º 137-26-8), na concentração de 35mg/kg. Ao fim de 21 dias, e após anestesia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, removeu-se a tibia esquerda, e a sua epífise proximal foi seccionada longitudinalmente. Os fragmentos obtidos foram imediatamente fixados em formaldeído neutro a 10%, tamponado, durante 24 horas. A desmineralização foi realizada em EDTA a 5%, pH 7.4, durante 7-10 dias. Os fragmentos desmineralizados foram

---

Recebido em 11 de fevereiro de 2009

Aceito em 28 de dezembro de 2009

E-mail: fcs@uevora.pt

### Expressão da caderina...

processados em sistema automático, incluídos em parafina e cortados em micrótomo rotativo em secções com 5µm de espessura. As secções foram estendidas em lâminas de vidro de 75 x 25mm, tratadas com polilisina.

Para detecção da caderina, utilizou-se o *kit* LAB-SA (UltraVision Detection System Kit, NeoMarkers, EUA - TP-015-HD), de acordo com as indicações do fabricante, as secções foram tratadas com anticorpo primário comercial (NeoMarkers, EUA - Rabbit Pab 2, RB-1524) (pan-caderina na diluição de 1:50, com pré-tratamento em tampão citrato, pH 6.0, durante 20 minutos a 100°C, para recuperação antigênica) e incubadas a 4°C, *overnight*. Como controle negativo, usaram-se secções não tratadas com anticorpo primário. As leituras das lâminas, com as preparações definitivas, foram feitas em microscópio Nikon Eclipse 600, com a ampliação de 100X. Foram observadas lâminas de quatro a cinco animais por grupo, sendo uma por animal. As imagens foram obtidas por meio de câmara digital Nikon DN100. No caso dos condrócitos hipertróficos, realizaram-se contagens nas imagens digitais (100X), correspondentes a cinco campos, contendo o maior número de células (pelo menos 300 células), em imagens de quatro a cinco animais por grupo, sendo uma por animal. O número médio de células positivas foi dividido pelo total de células (soma das células positivas e negativas). Na contagem das células, utilizou-se

o programa SigmaScan Pro versão 5. Os valores obtidos, após testados para a normalidade e a homocedasticidade, foram submetidos à análise não paramétrica, utilizando Teste U Wilcoxon, por meio do programa SPSS 15.

Observaram-se condrócitos positivos em todas as zonas da placa de crescimento da epífise proximal da tíbia em ambos os tipos de placas. No entanto, a marcação foi mais evidente nos condrócitos da zona de hipertrofia, com uma sobre-expressão nas placas de crescimento discondroplásicas (91.2%), sendo a percentagem de células positivas significativamente mais elevada nestas do que nas placas de crescimento normais (34,8%) (Tab. 1, Fig. 1).

Embora a caderina seja uma proteína que se expressa em membrana celular, na zona de proliferação, a imunomarcação é também nuclear e citoplasmática, enquanto, nos condrócitos hipertróficos, a expressão da caderina é essencialmente citoplasmática. A dificuldade em observar a expressão membranar da caderina é, provavelmente, em razão da ocorrência de artefatos derivados das técnicas de fixação. Osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como inúmeras células da medula óssea, expressaram igualmente a caderina, com um padrão de expressão similar nos dois tipos de epífises. Não foi observada imunomarcação nas secções de controle negativo.

Tabela 1. Imunomarcação para a caderina, nos vários tipos celulares, em placas de crescimento normal e discondroplásica da epífise proximal da tíbia de frango

Tipos celulares	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	±	±
Condrócitos proliferativos	+	++
Condrócitos hipertróficos	++ (34,8±2,6a)*	+++ (91,2±0,2b)*
Osteoblastos	++	++
Osteoclastos	++	++
Osteócitos	++	++
Medula óssea	++	++

Imunomarcação: ± = ocasional, focal; + = fraca; ++ = moderada; +++ = intensa.

Valores entre parênteses = média±desvio-padrão.

\*Diferença significativa entre grupos (P<0,05).

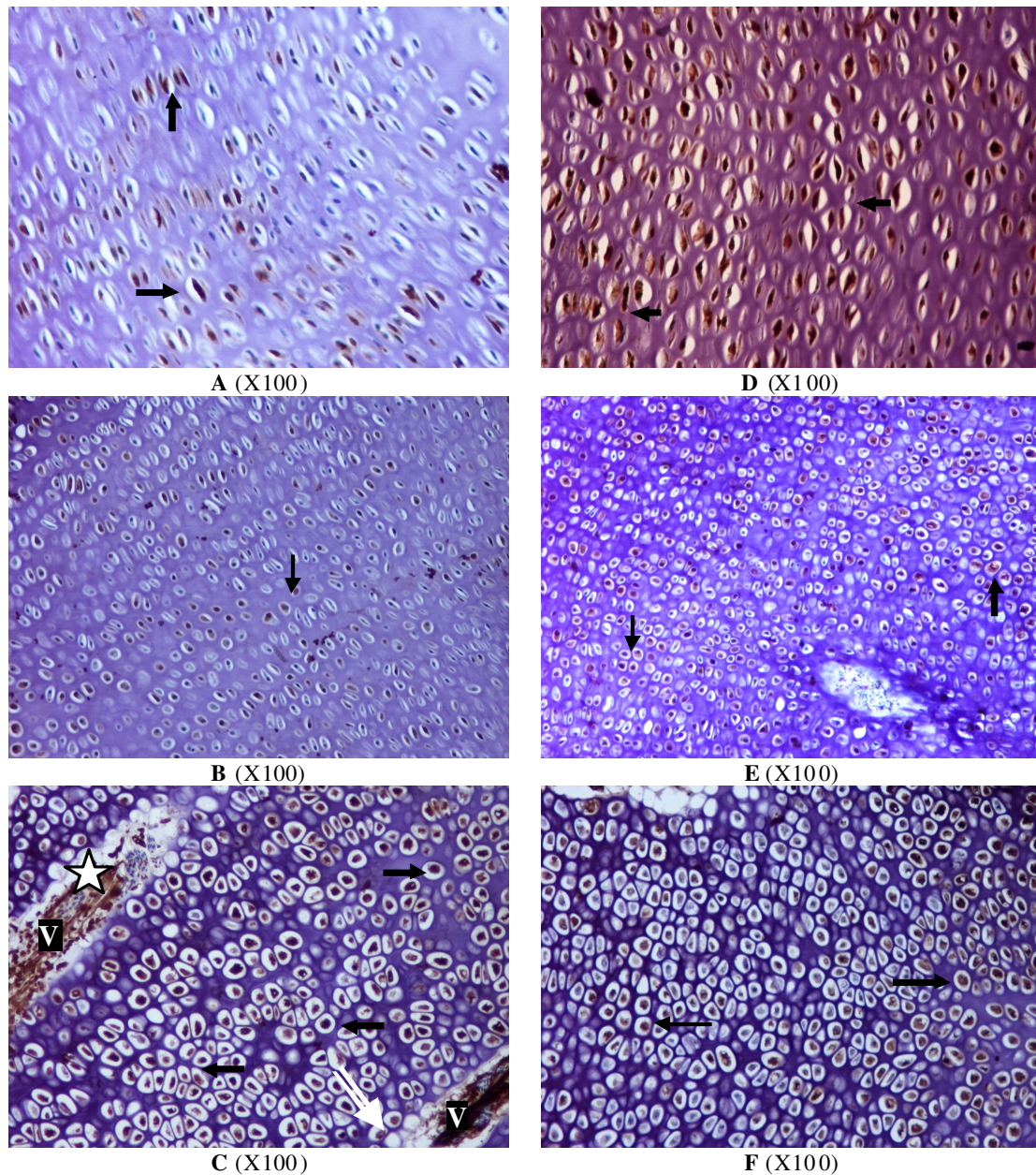


Figura 1. Imunomarcção para a caderina. Células positivas em todas as imagens. Nas zonas de proliferação (A) e na fase inicial de hipertrofia (B), das placas de crescimento normal, os condrócitos positivos (setas) são menos frequentes que nas correspondentes zonas (D) e (E) das placas de crescimento discondroplásicas. Imunomarcção intensa (setas) nos condrócitos hipertróficos das placas de crescimento normal (C) e discondroplásicas (F). Alguns condrócitos hipertróficos terminais (seta dupla), junto aos canais vasculares (V), mostram marcação positiva, bem como osteoblastos, osteoclastos e células da medula óssea (estrela). (100X - contracoloração com Hematoxilina de Mayer).

Os resultados do presente trabalho, obtidos por meio da utilização de anticorpo que reconhece uma variedade de caderinas (pan-caderina) foram surpreendentes, já que o contato entre condrócitos é muito reduzido devido à elevada produção de matriz, e confirmam os resultados

obtidos por Jefferies et al. (2000), que observaram igualmente uma sobre-expressão da caderina-B nos condrócitos hipertróficos das lesões discondroplásicas. Esses autores sugerem, inclusive, que a expressão anômala da caderina-B pode estar envolvida na etiologia da

discondroplasia. No entanto, a razão aparente para esta sobre-expressão não é clara, podendo estar relacionada a uma eventual redução dos níveis de cálcio nas lesões (Babich e Foti, 1994; Nie et al., 1995) e/ou com a sua participação na apoptose dos condrócitos da zona de hipertrofia (Ohyama et al., 1997; Vlemminckx e Kemler, 1999). Quanto ao padrão de expressão da pan-caderina nos osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, bem como em inúmeras células da medula óssea, similar em ambos os tipos de placas de crescimento deve-se, provavelmente, à participação desta proteína na proliferação, na diferenciação e na sobrevivência desses tipos

celulares, processos essenciais no decurso normal da formação de osso endocondral. A maioria dos trabalhos realizados sugere que a origem da discondroplasia está relacionada com a incapacidade dos condrócitos de atingirem o estágio terminal de hipertrofia completa. No entanto, estes resultados sugerem que, na formação das lesões discondroplásicas, podem estar envolvidos mecanismos mais complexos, sendo necessários estudos adicionais para determinar as causas precisas desta patologia.

Palavras-chave: discondroplasia da tibia, caderinas, imuno-histoquímica

#### ABSTRACT

*By immunohistochemistry the expression of a pan-cadherin antibody that recognizes a wide variety of cadherins in chondrocytes from normal and tibial dyschondroplasia (TD) growth plates was compared. Surprisingly, an upregulated expression that was not expected in TD lesion chondrocytes was observed. The reason for this apparent upregulation is not clear. The increased expression may simply be due to the particular phenotype of lesion chondrocytes, and cadherin may be involved in apoptosis of chondrocytes of TD lesion. Another possibility, is that a low level of calcium in the lesion may be responsible for the observed upregulation. The results of the present study suggest that the formation of the dyschondroplastic lesion is not merely due to the impaired terminal differentiation of lesion chondrocytes and that other mechanisms are probably involved in TD etiology. Further studies will be necessary to provide insight into the precise nature of the condition.*

*Keywords: tibial dyschondroplasia, cadherin, immunohistochemistry*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABICH, M.; FOTI, L.R. E-cadherins identified in osteoblastic cells, effects of parathyroid hormone and extracellular calcium on localization. *Life Sci.*, v.54, p.201-208, 1994.
- COOK, M.E.; BAI, Y.; ORTH, M.W. Factors influencing growth plate cartilage turnover. *Poult. Sci.*, v.73, p.889-896, 1994.
- DeLISE, A.M.; FISCHER, L.; TUAN, R.S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoar. Cartil.*, v.8, p.309-334, 2000.
- FARQUHARSON, C.; JEFFERIES, D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.*, v.79, p.994-1004, 2000.
- HELFRICH, M.H.; HORTON, M.A. Integrins and Adhesion Molecules. In: SEIBEL, M.J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. (Eds). *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. San Diego: Academic Press, 1999. p.111-125.
- JEFFERIES, D.; HOUSTON, B.; LESTER, D. et al. Expression patterns of chondrocyte genes cloned by differential display in tibial dyschondroplasia. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1501, p.180-188, 2000.
- LEACH, R.M. JR.; LILBURN, M.S. Current knowledge on the etiology of tibial dyschondroplasia in the avian species. *Poult. Sci. Rev.*, v.4, p.57-65, 1992.
- LEACH, R.M. JR.; MONSONEGO-ORNAN, E. Tibial dyschondroplasia 40 years later. *Poult. Sci.*, v.86, p.2053-2058, 2007.

MARIE, P.J. Role of N-cadherin in bone formation. *J. Cell Physiol.*, v.190, p.297-305, 2002.

NIE, D.; GENGE, B.R.; WU, L.N. et al. Defect in formation of functional matrix vesicles by growth plate chondrocytes in avian dyschondroplasia, evidence of defective tissue vascularization. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, p.1625-1634, 1995.

ORTH, M.W.; COOK, M.E. Avian tibial dyschondroplasia, a morphological and biochemical review of the growth plate lesion and its causes. *Vet. Pathol.*, v.31, p.403-414, 1994.

OHYAMA, K.; FARQUHARSON, C.; WHITEHEAD, C.C. et al. Further observations on programmed cell death in the epiphyseal growth plate, comparison of normal and dyschondroplastic epiphyses. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, p.1647-1656, 1997.

PIZAURO JÚNIOR, J.M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.4, p.169-185, 2002.

PRAUL, C.A.; FORD, B.C.; GAY, C.V. et al. Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.*, v.79, p.1009-1013, 2000.

VLEMINCKX, K.; KEMLER R. Cadherins and tissue formation, integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, v.21, p.211-220, 1999.