

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.62, n.2, p.495-498, 2010

## Comunicação

[Communication]

### Expressão imunoistoquímica da proteína S-100 na discondroplasia da tibia

[S-100 protein immunostaining in tibial dyschondroplasia]

F. Capela e Silva<sup>1,2</sup>, E. Lamy<sup>2</sup>, J.C. Reis<sup>3</sup>, J.C. Potes<sup>2,3</sup>, A. Pereira<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 Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Portugal

<sup>4</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora, Portugal

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

A discondroplasia da tibia é uma patologia das placas de crescimento epifisárias dos ossos longos das estirpes de rápido crescimento de espécies avícolas, caracterizada por anomalias na diferenciação dos condrócitos, traduzindo-se na acumulação de uma massa cartilaginosa branca, opaca, não calcificada e avascular (Orth e Cook, 1994). Para além do aparecimento espontâneo, com forte base genética, vários fatores afetam a incidência e a gravidade das lesões discondroplásicas (Orth e Cook, 1994). Os trabalhos realizados têm caracterizado a cartilagem discondroplásica relativamente à expressão de vários genes e seus produtos (Farquharson e Jefferies, 2000; Praul et al., 2000; Leach e Monsonigo-Ornan, 2007). Sua etiologia não está ainda devidamente esclarecida, sendo de supor uma origem multifatorial (Orth e Cook, 1994).

As proteínas S-100 constituem uma família de proteínas citoplasmáticas de baixo peso molecular, que se podem ligar ao  $\text{Ca}^{2+}$ , ao  $\text{Zn}^{2+}$  e ao  $\text{Cu}^{2+}$  e que estão envolvidas em muitos processos biológicos importantes (Donato, 2003). Inicialmente foram descritas como sendo específicas do sistema nervoso, tendo sido, no entanto, identificadas noutros tecidos, incluindo a cartilagem e o osso (Weiss e Dorfman, 1986; Dascalu et al., 1996; Balmain et al., 2003). O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a expressão imunoistoquímica da proteína S-100 na discondroplasia da tibia.

Frangos de corte, da linhagem Cobb, foram criados em sistema padronizado, desde o dia do nascimento até aos 21 dias de idade (dieta e água foram disponibilizadas *ad libitum*), cumprindo as normas de bem-estar animal (FELASA, <<http://www.felasa.eu>>). Foram estabelecidos dois grupos com 20 animais cada, sendo um grupo-controle e um grupo experimental. Para obtenção de animais com lesões discondroplásicas, incorporou-se à dieta o ditiocarbamato Tirame (CAS n° 137-26-8, SIGMA, n° T5638), na concentração de 35mg/kg. Ao fim de 21 dias, e após anestesia, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido por remoção da tibia esquerda e secção longitudinal de sua epífise proximal. Os fragmentos obtidos foram imediatamente fixados em formaldeído neutro a 10%, tamponado, durante 24 horas, após o que se procedeu à sua desmineralização em EDTA a 5%, pH 7,4, durante 7-10 dias.

Após a desmineralização, os fragmentos foram processados em um sistema automático, incluídos em parafina e cortados em micróto mo em secções com 5µm de espessura. As secções foram estendidas em lâminas de vidro de 75 x 25mm, tratadas com polilisina. Para a imunoistoquímica, utilizou-se o método LAB-SA (UltraVision Detection System Kit, NeoMarkers, USA, ref. TP-015-HD), de acordo com as indicações do fabricante, com anticorpo primário comercial (NeoMarkers, ref. RB-044, diluição 1:100, e incubação *overnight*, a 4°C). Como

---

Recebido em 28 de outubro de 2009

Aceito em 26 de fevereiro de 2010

E-mail: fcs@uevora.pt

controle negativo, usaram-se secções sem o anticorpo primário. As preparações definitivas foram observadas em microscópio (Nikon Eclipse 600), com a ampliação de 100x, em secções correspondendo a 4-5 animais/grupo e uma secção/animal, sendo as imagens obtidas por meio de câmara digital Nikon DN100.

Foram observados condrócitos positivos na zona de hipertrofia, nas placas de crescimento normais e discondroplásicas (Fig. 1 e Tab. 1). Nestas últimas, foi evidente a expressão citoplasmática

da proteína S-100 no interior das lesões, embora algumas células proliferativas tenham exibido expressão nuclear. Alguns condrócitos na fase final de hipertrofia, junto aos canais vasculares e aos locais de mineralização, mostraram, igualmente, imunomarcação citoplasmática intensa. Evidenciou-se também imunomarcação positiva de osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e de inúmeras células da medula óssea. Não foi observada imunomarcação nas secções de controle negativo.

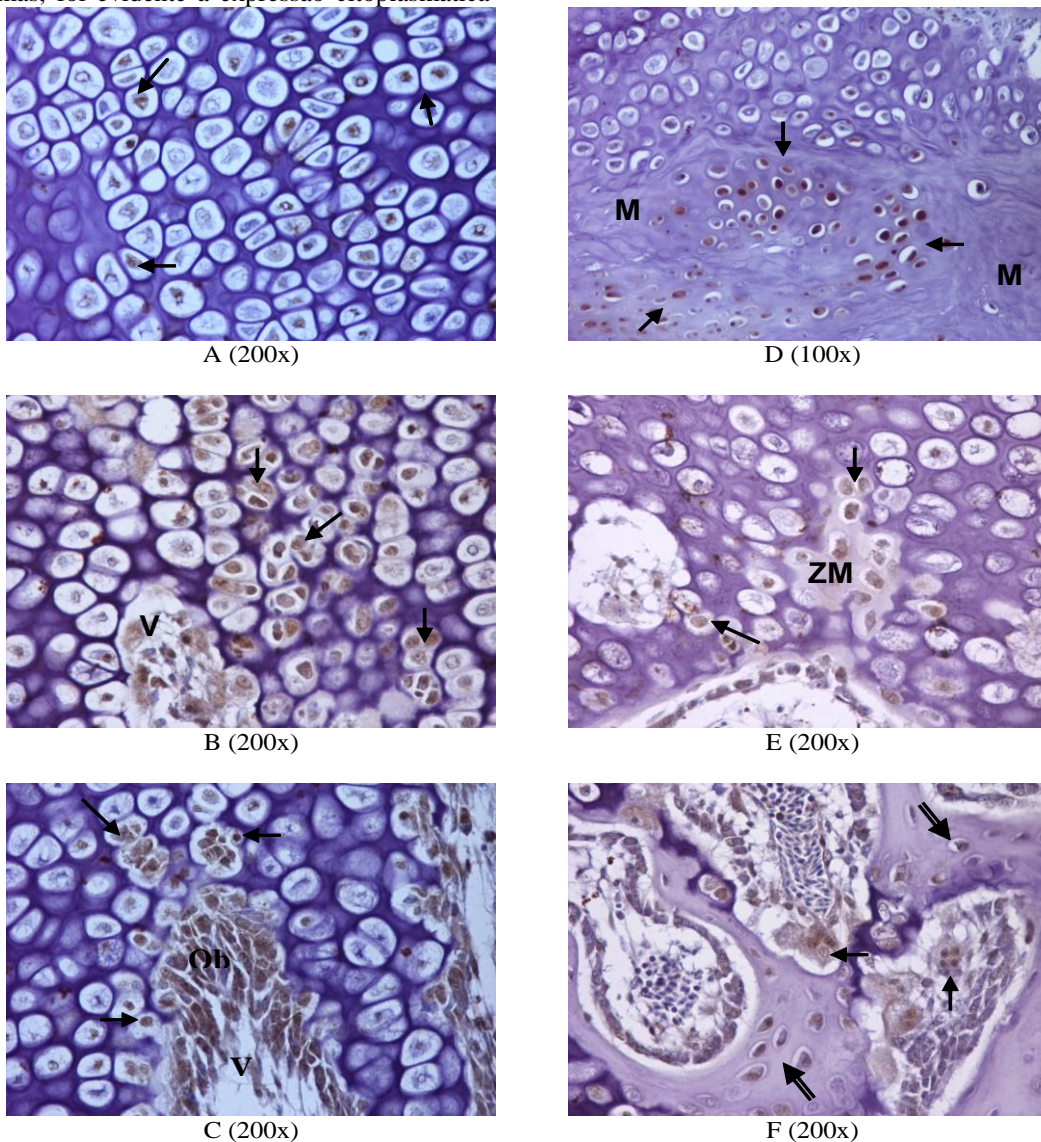


Figura 1. Imunoexpressão da S-100. Tíbia, frango de corte. Placas de crescimento normais (A, B, C): são visíveis condrócitos hipertróficos (setas) e osteoblastos (Ob) positivos (V = canais vasculares). Placas de crescimento discondroplásicas (D, E, F): em D, são visíveis condrócitos hipertróficos positivos (setas) no interior de zona de lesão, com acumulação de matriz (M) e, em E, junto à zona de mineralização (ZM); em F, observam-se osteoclastos (setas simples) e osteócitos (dupla seta), positivos. Contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Tabela 1. Expressão imuno-histoquímica da proteína S-100 em tíbia de frango de corte

Tipo celular	Normal	Discondroplasia
Condrócitos de reserva	negativo	±
Condrócitos proliferativos	negativo	±
Condrócitos hipertróficos	±	+
Osteoblastos	+	+
Osteoclastos	+++	+++
Osteócitos	++	+++
Medula óssea	+	+

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

Os resultados obtidos estão de acordo com os de outros autores, uma vez que foram observados condrocitos positivos fundamentalmente na zona de hipertrofia e junto aos canais vasculares, nas placas de crescimento normais (Weiss e Dorfman, 1986), e nas placas de crescimento discondroplásicas, embora algumas células proliferativas tenham exibido expressão nuclear. Nas placas de crescimento discondroplásicas, foram observados condrocitos hipertróficos positivos no interior das lesões, o que pode estar associado à reparação dos tecidos adjacentes (Leonardi et al., 2000), ou pode tratar-se de uma resposta à situação de inflamação crônica derivada do estresse bioquímico e mecânico provocado pela acumulação de matriz (Dascalu et al., 1996).

Os dados deste trabalho sugerem ainda que as proteínas da família S-100 podem estar envolvidas na proliferação, na hipertrofia e na apoptose dos condrocitos, como evidenciado por outros autores para outros tecidos (Donato, 2003), na estimulação da angiogênese da placa de crescimento (Ambartsumian et al., 2001) e na participação da homeostase do cálcio (Barger e Van Eldik, 1992). O conhecimento da

participação das proteínas S-100 na mineralização da cartilagem (Weiss e Dorfman, 1986; Balmain et al., 2003) e do seu envolvimento na regulação da remodelação da matriz extracelular, influenciando a expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs) e dos seus inibidores tecidulares (TIMPs) (Elenjord et al., 2008), torna interessante um estudo mais aprofundado sobre a eventual ligação dessas proteínas no desenvolvimento de lesões discondroplásicas.

A expressão da proteína S-100 nos osteoblastos, nos osteoclastos e nos osteócitos, bem como em inúmeras células da medula óssea, similar em ambos os tipos de placas de crescimento, provavelmente, estaria relacionada com a participação da S-100 na proliferação, na diferenciação – processos essenciais no normal decurso da ossificação endocondral – e na sobrevivência desses tipos celulares (Donato, 2003).

Palavras-chave: frango de corte, tíbia, discondroplasia, proteína S-100, imunoistoquímica

#### ABSTRACT

*It was compared, by immunohistochemistry, the expression of S-100 protein from normal and tibial dyschondroplasia (TD) growth plates. The results suggest that S-100 may be involved in growth plate homeostasis. The expression of S-100 in dyschondroplastic chondrocytes may be due to a low level of calcium in the lesion and/or compression of chondrocytes by the accumulated matrix. One further possibility is the association between S-100 and the regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their endogenous inhibitors (TIMPs). Further studies will be necessary to provide insight into involvement of S-100 in tibial dyschondroplasia development and the precise nature of the pathology.*

*Keywords: broiler, tibia, dyschondroplasia, S-100 protein, immunohistochemistry*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBARTSUMIAN, N.; KLINGELHOFER, J.; GRIGORIAN, M. et al. The metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*, v.20, p.4685-4695, 2001.
- BALMAIN, N.; MOUTAHIR, F.; HEIZMANN, C.W. et al. Immunolocalization of S100A2 calcium-binding protein in cartilage and bone cells. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, v.49, p.485-486, 2003.
- BARGER, S.W.; VAN ELDIK, L.J. S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.9689-9694, 1992.
- DASCALU, A.; KORENSTEIN, R.; ORON, Y. et al. A hyperosmotic stimulus regulates intracellular pH, calcium, and S-100 protein levels in avian chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.227, p.368-373, 1996.
- DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.*, v.60, p.540-551, 2003.
- ELENJORD, R.; LJONES, H.; SUNDKVIST, E. et al. Dysregulation of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors by S100A4. *Connect. Tissue Res.*, v.49, p.185-188, 2008.
- FARQUHARSON, C.; JEFFERIES, D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poultry Sci.*, v.79, p.994-1004, 2000.
- LEACH, R.M. JR.; MONSONEGO-ORNAN, E. Tibial dyschondroplasia 40 years later. *Poultry Sci.*, v.86, p.2053-2058, 2007.
- LEONARDI, R.; VILLARI, L.; BERNASCONIC, G. et al. Cellular S-100 protein immunostaining in human dysfunctional temporomandibular joint discs. *Arch Oral Biol.*, v.45, p.411-418, 2000.
- 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.
- PRAUL, C.A.; FORD, B.C.; GAY, C.V. et al. Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poultry Sci.*, v.79, p.1009-1013, 2000.
- WEISS, A.P.; DORFMAN, H.D. S-100 protein in human cartilage lesions. *J. Bone Joint Surg. Am.*, v.68, p.521-526, 1986.