



Discondroplasia Tibial: Mecanismos de Lesão e Controle

Tibial Dyschondroplasia: Mechanisms of the Lesion and Control

■ Autor(es) / Author(s)

Pizauro Junior JM¹
Ciancaglini P²
Macari M³

1-Depto. de Tecnologia - FCAV/UNESP,
Jaboticabal

2-Depto. de Química - FFCLRP/USP, Ribeirão Preto

3 Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal -
FCAV/UNESP, Jaboticabal

■ Correspondência / Mail Address

João Martins Pizauro Júnior

Depto. de Tecnologia - FCAV / UNESP
Via de Acesso Profº Paulo Donato Castelanne, Km 5
14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil

E-mail: jpizauro@fcav.unesp.br

■ Unitermos / Keywords

calcificação, discondroplasia tibial, mineral,
ossificação endocondral

*calcification, endochondral ossification, mineral,
tibial dyschondroplasia*

RESUMO

A discondroplasia tibial (DT) é atribuída a uma assincronia no processo de diferenciação dos condrócitos, levando à formação de uma camada de condrócitos pré-hipertrofos e de uma cartilagem na tíbia proximal que não é calcificada, mas é resistente à invasão vascular. Além disso, tem sido proposto que, na discondroplasia tibial, a etapa final do processo de calcificação não ocorre devido ao fato de que os efetores de alguns genes, relacionados com o mecanismo de calcificação do disco de crescimento podem apresentar algumas de suas propriedades químicas ou biológicas alteradas e/ou não serem expressos. Nesse sentido, a compreensão do mecanismo de ação e o papel das biomoléculas e dos minerais relacionados com a discondroplasia tibial poderão contribuir para o conhecimento de doenças do tecido ósseo e estabelecer estratégias de prevenção e tratamento.

ABSTRACT

Tibial dyschondroplasia is attributed to an asynchrony of chondrocytes differentiation with the appearance of a layer of pre-hypertrophic chondrocytes and a non-calcified cartilage in the proximal growth plate in the tibia which is resistant to vascular invasion. It has been also proposed that in the tibial dyschondroplasia, the final step of calcification does not occur due to the effector of some genes, involved in the calcification mechanism in the growth plate, present their chemical and biological properties disrupted and does not express. Thus, the study of the mechanisms and biomolecules and minerals involved in the tibial dyschondroplasia process might contribute to the better knowledge of this disease and to stablish strategies of prevention and treatment.



INTRODUÇÃO

Nos vertebrados superiores, o processo de ossificação endocondral é o responsável pelo crescimento longitudinal da maioria dos ossos do esqueleto. Em circunstâncias normais, a calcificação ocorre no disco epifisário pela ação de células conhecidas como condrócitos, as quais se encontram em diferentes estágios de diferenciação, dependendo, principalmente, da sua localização no interior do disco de crescimento (Anderson, 1995; Gerber & Ferrara, 2000).

O disco de crescimento (Figura 1) é composto de cartilagem, formando uma estreita faixa de ligação (0,5 a 1 mm) entre a epífise e a diáfise, e pode ser dividido em várias regiões anatômicas: a) zona de reserva, que contém condrócitos aparentemente dispersos e inativos; b) zona de proliferação, onde a maioria das divisões celulares ocorrem. Essa região contém as células precursoras dos condrócitos (células progenitoras) em forma de disco. O nascimento de células jovens que se diferenciam em condrócitos acarreta um acúmulo de novas células que são deslocadas para baixo, formando uma coluna ao longo da zona proliferativa. A formação dessa coluna permite a subdivisão da matriz em septo transversal, que separa as colunas de células em diferentes estágios, e em septo longitudinal, que separa as colunas de células adjacentes. O tempo de vida de um condrócito, entre o seu nascimento na zona proliferativa e morte na zona hipertrófica, é de aproximadamente três (3) dias em aves de crescimento rápido; c) a zona de maturação, é a região onde os condrócitos passam de uma fase de pós-divisão a um estado de maturação. O estado de maturação é caracterizado por uma fase de intensa síntese e secreção de matriz, e é nesse local onde aparece a enzima fosfatase alcalina. A zona hipertrófica, contém condrócitos aumentados e muitas vesículas da matriz. Finalmente, existe a zona de calcificação, onde os condrócitos sofrem degeneração. É nessa região que ocorre o depósito de fosfato de cálcio no interior das vesículas, que posteriormente se extravasa infiltrando nos interstícios do septo longitudinal.

O crescimento longitudinal do osso ocorre através do equilíbrio preciso entre a proliferação dos condrócitos, produção de matriz óssea, calcificação biológica, hipertrofia e invasão vascular da lacuna do condrócito hipertrofiado. Assim, a diferenciação dos condrócitos é a etapa crucial do processo de ossificação endocondral (Anderson, 1995; Gerber & Ferrara, 2000;

Farquharson & Jefferreis, 2000; Jefferreis *et al.*, 2000; Loveridge *et al.*, 1993). Segundo Brighton (1987) e Howlett (1979), os condrócitos adquirem uma série de fenótipos durante os estágios proliferativo, pré-hipertrófico e hipertrófico, antes de atingirem os estágios finais de morte celular, sugerindo que a etapa final de diferenciação dos condrócitos no disco de crescimento possui um papel central no processo de ossificação endocondral (Pines *et al.*, 1998; Loveridge *et al.*, 1993; Gerber & Ferrara, 2000; Farquharson & Jeffreis, 2000; Praul *et al.*, 2000).

O papel dos condrócitos no disco de crescimento é fascinante devido, principalmente, ao fato de que seu período de vida é sincronizado no tempo e no local onde sua atividade é requerida. O acúmulo de resultados experimentais, ao longo desses últimos anos, tem mostrado que a hipertrofia dos condrócitos é etapa essencial para invasão vascular e, subsequente, substituição da matriz calcificada por osso (Gerber & Ferrara, 2000), sugerindo que a vascularização da região inferior do disco de crescimento representa uma etapa crucial na interação entre os processos de condrogênese (produção de cartilagem) e osteogênese (formação do tecido ósseo), principalmente durante o período de crescimento rápido dos ossos longos ou reparo de fraturas (Gerber & Ferrara, 2000). Mudanças nesse equilíbrio pode levar ao desenvolvimento de doenças esqueléticas, tais como osteoartrite, calcificação ectópica e discondroplasia.

Estudos recentes mostraram que, no caso da discondroplasia tibial, as lesões contêm altos níveis de condrócitos pré-hipertróficos e ausência de células hipertróficas, sugerindo que a etapa final do processo de calcificação não aconteceu devido à presença de células que não expressaram, ou possuem baixo nível de expressão, dos genes responsáveis pela hipertrofia dos condrócitos (Pines *et al.*, 1998). Além disso, tem sido sugerido que a formação de estruturas vasculares e a calcificação da cartilagem estão intimamente associadas com o desenvolvimento de patologias. Na tentativa de explicar essas patologias, alguns autores admitem que a invasão vascular da cartilagem está associada à apoptose dos condrócitos e, conseqüentemente, à inibição das etapas finais do processo de calcificação biológica (Anderson, 1995, Gerber Ferrara, 2000; Farquharson & Jeffreis, 2000). Apoptose, ou morte programada da célula, é atualmente reconhecida como um fenômeno biologicamente útil que acontece na maioria tecidos que exibem crescimento ordenado. Assim sendo, um atraso na apoptose dos condrócitos pode resultar em um acúmulo de células hipertrofiadas no disco de crescimento. Logo, o estudo dos processos que regulam



a maturação do condrócito poderá contribuir para a compreensão do(s) mecanismo(s) responsável(is) pelo desenvolvimento da lesão. A morte programada dos condrócitos no disco de crescimento de ossos longos tem sido muito estudada nos últimos anos (Clarke & Clarke, 1996), e os resultados obtidos mostraram que existe uma estreita relação entre a vascularização da cartilagem e a morte programada dos condrócitos hipertróficos (Floyd *et al.*, 1987). De fato, tem sido demonstrado que a vascularização e a reabsorção da cartilagem calcificada ocorre após a apoptose dos condrócitos (Gibson *et al.*, 1995, 1997, 2001), e que a invasão vascular pode eliminar, de cada coluna de células, um condrócito hipertrófico a cada 3 horas, ou 8 células em um dia (Hunziker *et al.*, 1987), sugerindo que a morte dos condrócitos (apoptose) coincide com a sua hipertrofia e não depende de estímulos externos (Gibson *et al.*, 1997).

Outro aspecto a ser considerado é que o processo de ossificação endocondral pode ser reproduzido experimentalmente *in vivo* através do implante de matriz óssea desmineralizada (Reddi & Huggins, 1972), ou pelo implante de proteína morfogênica, extraída do tecido ósseo, no tecido subcutâneo de ratos (Urist *et al.*, 1973), ou ainda, pelo implante de proteína morfogênica ou matriz óssea desmineralizada associada com plasma enriquecido em plaqueta (Marx *et al.*, 1998). Reddi & Huggins (1972) demonstraram que o implante de matriz óssea desmineralizada, em tecido subcutâneo de ratos, age como um estímulo que desencadeia um processo de diferenciação e organização celular, levando à formação seqüencial de cartilagem e osso. Os aspectos histológicos e bioquímicos envolvidos no processo de calcificação ectópica dessas placas, via ossificação endocondral, foram estudados por esses mesmos autores, que observaram uma estreita correlação entre a atividade da fosfatase alcalina com os sítios histológicos de formação do tecido ósseo. A principal característica desse método é o fato de que as enzimas envolvidas no processo de calcificação biológica podem ser estudadas em diferentes etapas do processo de ossificação endocondral, tanto em condições normais como patológicas (Leone *et al.*, 1997). No que tange ao uso de plasma enriquecido de plaqueta (PRP), tem sido demonstrado que a adição desse plasma acelera o processo de deposição do tecido ósseo e melhora a qualidade de regeneração do tecido implantado. A teoria mais aceita, atualmente, é que o uso do PRP, juntamente com matriz óssea desmineralizada ou proteína morfogênica, estimula o processo de

ossificação endocondral e até mesmo pode acelerar o processo regenerativo do tecido ósseo. As aplicações clínicas de componente derivado do sangue sugere que o uso de PRP parece prover biomoléculas e fatores de crescimento e de diferenciação celular que conduzem a regeneração mais rápida e efetiva do tecido lesionado.

CALCIFICAÇÃO

Atualmente, admite-se que o brotamento das vesículas de matriz representa um intrigante mecanismo de geração de organelas extracelulares, cuja função é a de realizar as etapas finais do processo de calcificação antes da morte programada da célula por apoptose (Kirsch & Wuthier, 1994; Anderson, 1995).

Os eventos bioquímicos e biofísicos, responsáveis pela biogênese das vesículas extracelulares, ainda não estão perfeitamente elucidados, mas admite-se que eles estejam relacionados com o ciclo de vida dos condrócitos e, possivelmente, com o seu processo de apoptose (Kerr *et al.*, 1972; Anderson, 1995).

Um dos grandes desafios da biologia é a compreensão de como as células se replicam e se dividem, e um dos aspectos importantes desse problema é saber como as células formam as vesículas extracelulares. A nova vesícula deve ser formada com grande precisão e possuir todas as informações necessárias para criar um microambiente adequado para a formação e preservação de mineral de hidroxiapatita (Anderson, 1995).

As vesículas surgem por brotamento das superfícies laterais dos condrócitos (Figura 2) e são secretadas no local específico do início da calcificação da matriz do tecido ósseo. Nos osteoblastos, as vesículas surgem da membrana plasmática adjacente à matriz óssea recentemente formada. Nos odontoblastos, as vesículas surgem na porção apical da célula que se encontra em contato com a matriz da pré-dentina.

O papel dessas vesículas como mediadoras da deposição mineral é fortemente sugerido pelos seguintes fatos: o local de aparecimento de depósitos minerais tem exata correspondência com o local das vesículas (Anderson, 1973; Ali, 1976; Martino *et al.*, 1979); os primeiros cristais (Figura 2) na forma de pequenas agulhas ou de bastão, que precedem o crescimento do cristal extracelular, têm sido detectados dentro dessas vesículas (Bonucci, 1971; Ali & Evans, 1973; Anderson, 1973, 1976; 1995; Wuthier, 1977; Sela *et al.*, 2000). Além disso, tem sido proposto que o interior das vesículas também serve como um microambiente selado, que protege o primeiro núcleo do mineral, enquanto ainda está em um estado pré-cristalino mais solúvel, antes de se converter em um



cristal de hidroxiapatita. Tem sido verificado, ainda que as vesículas isoladas também possuem a capacidade de depositar sais de cálcio *in vitro* (Ali & Evans, 1973; Hsu & Anderson, 1977, 1978, 1986; Register *et al.*, 1984; Wuthier & Register 1985).

Se a hipótese acima for correta, então genes que são normalmente expressos nos condrócitos hipertróficos deveriam mostrar expressão reduzida, ou os efetores de alguns genes relacionados com o mecanismo de calcificação do disco de crescimento poderiam apresentar algumas de suas propriedades químicas ou biológicas alteradas. Nesse contexto, Nie *et al.* (1995) demonstraram que as vesículas extracelulares isoladas de aves com discondroplasia tibial são inativas e não conseguem iniciar o processo de calcificação biológica. Segundo esses autores, existe um defeito na vascularização do tecido, onde o fornecimento de minerais e nutrientes necessários para a cartilagem é inadequado para suportar a formação de vesículas extracelulares normais, necessárias para iniciar o processo de calcificação biológica.

Por outro lado, Laureano *et al.* (2002) verificaram que os estudos das propriedades cinéticas da fosfatase alcalina extraída do disco de crescimento, e purificada por centrifugação diferencial, de aves normais e de aves acometidas de lesão mostraram que nenhum dos parâmetros estudados (atividades de p-nitrofenilfosfatase, de ATPase e de pirofosfatase, efeito do pH e ação de inibidores) apresentaram algum resultado que pudesse sugerir alguma modificação no comportamento cinético da enzima, sugerindo que a discondroplasia tibial não pode ser atribuída à alteração da(s) propriedade(s) da fosfatase alcalina, mas pode ser atribuída a mecanismos e/ou defeito(s) mais complexo(s).

Papel do pirofosfato

Estudos efetuados por pesquisadores para determinar os tipos de lipídios, de eletrólitos e, principalmente, as enzimas presentes nas vesículas extracelulares, têm revelado que a fosfatase alcalina não é a única enzima importante para o processo de calcificação biológica presente na membrana (Anderson, 1995; Hsu, 1994; Pizauro *et al.*, 1998). Dentre elas, tem sido demonstrado a presença de elevados níveis de pirofosfatase, de adenosina-5'-trifosfatase (Pizauro *et al.*, 1998; Hsu & Anderson, 1995) e da ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1) (Caswell *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 2000; Gijsbers *et al.*, 2001). Segundo Johnson

et al. (1999, 2000) e Gijsbers *et al.* (2001), a ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1) utiliza o ATP presente no fluido extracelular da cartilagem para gerar o substrato da ectofosfatase alcalina (Figura 3), o pirofosfato inorgânico (PPi).

Além disso, já foi demonstrado que a fosfatase alcalina também pode hidrolisar o ATP, liberando o fosfato inorgânico. A enzima é regulada alostericamente pelo ATP (Pizauro *et al.*, 1993) e inibida competitivamente pelo produto da reação, o fosfato inorgânico (Pizauro *et al.*, 1987), sugerindo que os níveis relativos de PPi, um inibidor da calcificação, e de Pi, um inibidor da fosfatase alcalina, presentes no fluido extracelular da matriz, também desempenham um papel importante na regulação do processo de calcificação biológica. Essa hipótese é suportada pela recente demonstração de que o nível do fosfato inorgânico, derivado da hidrólise do PPi pela fosfatase alcalina, atua como um sinal da indução da expressão da glicoproteína fosforilada osteopontina em osteoblastos (Bek *et al.*, 2000). O pirofosfato inorgânico (PPi) participa da regulação de vários eventos intracelulares e extracelulares de uma grande variedade de tecidos, sugerindo que a regulação da sua síntese, degradação e transporte ocorre por meio de mecanismos altamente especializados. O papel fisiológico do pirofosfato extracelular tem sido muito estudado nos últimos anos, principalmente em relação ao processo de calcificação biológica. A compreensão dos eventos que participam da síntese e do metabolismo do pirofosfato no tecido ósseo pode contribuir para elucidar sua participação no processo de calcificação. O pirofosfato é um potente inibidor da mineralização biológica, da formação de "pedra" nos rins e em outros fluidos extracelulares (Anderson *et al.*, 1997; Fleisch & Russel 1972; Galperin *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Krug *et al.*, 2000; Okawa *et al.*, 1998; Rutsch *et al.*, 2001; Wuthier *et al.*, 1972). Além disso, tem sido verificado que o pirofosfato inibe a capacidade dos condrócitos de depositar minerais diretamente (especificamente cristais de hidroxiapatita e de fosfato de cálcio básico) na matriz pericelular do tecido ósseo (Johnson *et al.*, 1999; 2000; Poole *et al.*, 1989). Especula-se, ainda, que a remoção e/ou a degradação do pirofosfato é necessária para destruir seu efeito inibitório da calcificação biológica mediada pelas vesículas extracelulares (Meyer, 1984; Rezende *et al.*, 1999; Anderson 1995; Anderson *et al.*, 1997; Leone *et al.*, 1997). Por outro lado, a propagação dos cristais de hidroxiapatita fora das vesículas extracelulares também é inibida pelo PPi (Anderson, 1995). Assim, o pirofosfato pode representar a molécula sinal responsável pelo



controle da calcificação, tanto em condições normais, como em condições patológicas (Terkeltaub, 2001), sugerindo que o aumento da concentração extracelular do inibidor natural da formação da hidroxiapatita e da mineralização bloqueia a calcificação da cartilagem articular e de outros tecidos. Assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na sua síntese, pela enzima ATP-pirofosfohidrolase, também conhecida por PC-1, e dos mecanismos envolvidos na regulação da sua concentração no tecido ósseo, pelas enzimas fosfatase ácida e fosfatase alcalina, poderá contribuir para a compreensão da discondroplasia tibial. Essa hipótese é suportada pela demonstração de que ratos transgênicos deficientes de fosfatase ácida também apresentam cartilagem não vascularizada (Hayman *et al.*, 1996). Tem sido demonstrado, ainda, que ratos cujo gene da metaloproteinase-9 da matriz foi nocauteado apresentam cartilagem semelhante àquela encontrada na discondroplasia (Vu *et al.*, 1998), sugerindo que os osteoclastos também desempenham um papel importante no processo de vascularização da porção terminal distal do disco de crescimento e reabsorção da cartilagem calcificada (Praul *et al.*, 2000).

DISCONDROPLASIA TIBIAL

Apesar da discondroplasia tibial merecer atualmente a atenção de inúmeros pesquisadores, os eventos químicos e biológicos envolvidos nesse processo ainda não estão perfeitamente elucidados. Na tentativa de explicar esse mecanismo, alguns autores admitem que o estímulo mecânico juntamente com o genótipo e alterações nos constituintes da dieta podem interromper os eventos envolvidos no processo de diferenciação dos condrócitos e desencadear o processo de formação da lesão (Edwards, 2000; Praul *et al.*, 2000; Farquharson & Jeffereis, 2000; Rath *et al.*, 1998; Velleman, 2000; Reddi, 2000). De fato, estudos realizados por vários pesquisadores mostraram que a interrupção do processo de diferenciação dos condrócitos leva à formação de uma camada de condrócitos pré-hipertróficos e de uma matriz óssea que não é calcificada e resistente à invasão vascular (Edwards, 2000; Praul *et al.*, 2000; Farquharson & Jeffereis, 2000; Rath *et al.*, 1998; Velleman, 2000; Reddi, 2000). Como os condrócitos continuam a proliferar-se normalmente, ocorre um acúmulo de condrócitos pré-hipertróficos e a lesão aumenta em

tamanho (Figura 4). Nessas condições, o fornecimento de nutrientes e de oxigênio aos condrócitos localizados no interior da lesão é inadequado, o que resultaria em maior morte celular por apoptose (Praul *et al.*, 2000). Alguns autores admitem ainda, que a etapa final do processo de calcificação não acontece, devido ao fato de que os efeitos de alguns genes relacionados com o mecanismo de calcificação do disco de crescimento de aves podem apresentar algumas de suas propriedades alteradas e/ou não serem expressos.

Estudos recentes mostraram que o estresse celular também pode desencadear o processo de apoptose, e que as células respondem ao estresse aumentando a expressão de "chaperones" moleculares, também conhecidos como proteína de choque térmico (Hsp70), a fim de aumentar a habilidade da célula em suportar condições letais de estresse (Kaarniranta *et al.*, 1998; Ohtsuka & Hata, 2000; Mosser *et al.*, 2000). Um outro aspecto interessante que merece ser destacado é que a Hsp70 inibe a apoptose prevenindo a liberação do citocromo c da mitocôndria e o processamento da pró-caspases 9 e 3, sugerindo que o aumento da expressão da Hsp70 é essencial para inibir o processo de apoptose induzido pelo estresse (Mosser *et al.*, 2000).

Apoptose dos condrócitos

Durante o processo de ossificação endocondral, os condrócitos passam por vários estágios de diferenciação celular e, finalmente, apresentam sinais morfológicos de morte celular (Clarke & Clarke, 1996). Atualmente, tem sido proposto que os eventos morfológicos que acontecem no disco epifisário da cartilagem em crescimento representa um modelo interessante de apoptose. O termo apoptose foi introduzido por Kerr *et al.* (1972) para descrever um tipo de morte celular que exibe um conjunto distinto de características morfológicas e bioquímicas. Esse processo contrasta com necrose, na qual a morte celular é secundária a diversos danos celulares. Muitos exemplos de apoptose, mas não todos, representam uma verdadeira morte celular programada (Martin *et al.*, 1994). Além disso, estudos recentes mostram que o estresse celular pode desencadear o processo de morte celular, e que as células respondem ao estresse aumentando a expressão de "chaperones" moleculares a fim de aumentar a habilidade da célula em suportar condições letais de estresse (Mosser *et al.*, 2000).

Vanmuylder *et al.* (1997) admitem que a expressão das proteínas de estresse (Hsps) podem estar envolvidas com a apoptose dos condrócitos e possuem uma função importante no processo fisiológico de morte celular dessas



células. É proposto, também, que os “chaperones” moleculares parecem ter a capacidade de modular o processo de morte celular em culturas de tecido ósseo, resultando em reabsorção da matriz calcificada. Segundo Nair *et al.* (1999), os prostanóides e o óxido nítrico, que são reguladores da remodelação óssea, também podem participar do processo de regulação da síntese de “chaperones”.

Em relação aos eventos envolvidos no processo de discondroplasia tibial, há evidências de que a apoptose é mínima, sugerindo que ocorre uma alteração no processo de morte celular programada, resultando em um tecido que contém células imaturas que sobreviveram mais que o seu tempo de vida normal (Ohyama *et al.*, 1997). Por outro lado, Praul *et al.* (1997) relataram que na discondroplasia tibial as células apresentam características morfológicas de células necróticas e até mesmo de células apoptóticas, sugerindo que a apoptose observada nessa lesão é um efeito secundário e não a causa primária da doença.

Assim, a identificação dos genes expressos (ESTs) relacionados com os mecanismos moleculares, que participam dos processos envolvidos na calcificação da cartilagem em condições patológicas, como a discondroplasia, pode fornecer dados que possam, ulteriormente, serem utilizados em estudos moleculares e estabelecer estratégias de ajuda para o tratamento de doenças desse tecido.

Vitaminas D, A e C

A vitamina D consiste em um grupo de moléculas semelhantes aos esteróides denominadas de secosteróides, dentre os quais, o colicalciferol (Vitamina D₃) e o ergosterol (Vitamina D₂) são os compostos que participam da regulação do desenvolvimento do tecido ósseo, do metabolismo e da homeostase do cálcio (Bortman *et al.*, 2002; Farquharson & Jeffereis, 2000). Nas aves, a vitamina D₃ é cerca de 30 a 40 vezes mais potente do que a vitamina D₂. A vitamina D pode ser obtida pela alimentação ou ser produzida pelo organismo, desde que haja luz suficiente. Vários estudos mostram que, teoricamente, a síntese endógena deveria fornecer vitamina D₃ suficiente para prevenir raquitismo e maximizar o crescimento de frangos de corte expostos à luz solar por um período compreendido entre 11 e 45 minutos por dia. A vitamina D₃ pode ser sintetizada por uma via endógena na qual o precursor 7-deidrocolesterol, que ocorre naturalmente nas camadas epidérmicas, pode ser

convertido em pré-vitamina D, na lâmina de Malpigi, pela irradiação da luz ultravioleta. À temperatura corporal, cerca da metade da pré-vitamina D produzida na pele, é convertida espontaneamente em vitamina D₃ por dia. As vitaminas D₂ e D₃ são inativas e suas formas ativas são produzidas pelas hidroxilação (adição de hidroxila) enzimática realizada no fígado e nos rins, produzindo a 25-(OH)D₃ e 1 α ,25-(OH)₂D₃ respectivamente. Assim, a pré-vitamina D₃ permanece na pele enquanto que a vitamina D₃ é transportada da pele ou do intestino para o fígado, ligada a uma proteína ligadora de vitamina D, onde é hidroxilada na posição 25, formando o 25(OH)D₃. O 25(OH)D₃ entra na circulação onde é a principal forma de vitamina D encontrada no plasma, sendo transportada aos rins também ligada à proteína ligadora de vitamina D, onde sofre hidroxilação na posição 1 formando o 1,25(OH)₂D₃ que é o metabólito natural mais potente da vitamina D. As necessidades nutricionais de vitamina D₃ para frangos é expressa em unidade internacional (ICU ou *International Chick Units*), para diferenciá-la da vitamina D total e da vitamina D₂.

A forma ativa da vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃), é um importante regulador do desenvolvimento do tecido ósseo, do metabolismo e da homeostase do cálcio. Além disso, a 1,25-(OH)₂D₃ possui também um papel importante na regulação do crescimento e diferenciação das células do tecido ósseo (Whitehead, 2002).

A vitamina D é um hormônio cuja transdução de sinal pode ser desencadeada pela ligação a um receptor localizado na membrana plasmática (mVDR) e/ou no núcleo (nVDR) (Farquharson & Jeffereis, 2000; Bortman *et al.*, 2002; Revelli *et al.*, 1998). Algumas evidências experimentais suportam a hipótese de que também pode existir uma inter-relação entre a resposta gênica e a resposta não-gênica operando no mesmo tipo de célula.

Em relação ao seu mecanismo de ação no núcleo da célula, tem sido demonstrado que o hormônio atravessa a membrana celular por difusão passiva e liga-se ao receptor nuclear que se heterodimeriza. O heterodímero formado migra para o núcleo onde estimula a atividade da enzima, RNA polimerase II, responsável pela síntese de RNAm de proteínas alvos e, conseqüentemente, novas mensagens serão transcritas em proteínas específicas.

O mecanismo de ação não-genômico da vitamina D envolve a ligação do hormônio a receptores extracelulares. Esses receptores ativam a cascata da adenil ciclase-AMPC-proteína quinase e do fosfatidilinositol, resultando em abertura de canais de cálcio, que disparam vários processos celulares. Finalmente, a inter-relação entre as duas respostas, gênicas e membranar, seria a



ativação de proteínas alvos no citoplasma e no núcleo. Um dos possíveis candidatos é o receptor nuclear da $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ e as proteínas regulatórias envolvidas na modulação da transcrição gênica induzida. O seu uso, na avicultura, tem despertado um grande interesse por parte dos pesquisadores nos últimos anos devido, principalmente, à sua capacidade de estimular a diferenciação dos condrócitos, regularizar o crescimento ósseo, prevenir o raquitismo e diminuir a incidência da discondroplasia tibial (Throp *et al.*, 1993; Roberson & Edwards, 1994; Rennie & Whitehead, 1996; Kilburn & Edwards, 2001). Estudos recentes indicam que a exigência quantitativa para colicalciferol (vitamina D_3) pelas aves jovens varia de 275 ICU ($6,9 \mu\text{g/kg}$) para o crescimento, 503 ICU ($10,1 \mu\text{g/kg}$) para aumentar o conteúdo de cinzas dos ossos, 552 ICU ($13,8 \mu\text{g/kg}$) para aumentar a quantidade de cálcio do sangue e 904 ICU ($22,6 \mu\text{g/kg}$) para prevenir o raquitismo (Baker *et al.*, 1998; Kilburn & Edwards, 2001; Edwards *et al.*, 1996; Edwards, 2000). Estudos mostram que a adição da vitamina $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ a dietas adequadas ou desbalanceadas de cálcio e fósforo reduz a incidência de discondroplasia tibial, aumenta a absorção de cálcio e o conteúdo de cinzas dos ossos (Rennie *et al.*, 1993; Edwards, 1989; Kilburn & Edwards, 2001). Tem sido verificado, ainda, que a adição da $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ a dieta balanceada de cálcio e fósforo também reduz a incidência de discondroplasia tibial durante o período de crescimento das aves (Xu *et al.*, 1997; Kilburn & Edwards, 2001), sugerindo que a forma $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ da vitamina D é um hormônio chave na homeostase do cálcio, controlando diretamente a absorção do cálcio dietético no intestino, a reabsorção óssea e influenciando a reabsorção do cálcio nos túbulos proximais dos rins (Norman, 1979). Além disso, tem sido demonstrado, também, que a $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ e a $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ são requeridas para a síntese do peptídeo C-terminal do colágeno do tipo II (Hinek & Poole, 1988). A $24,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ é necessária para a expressão máxima da atividade da fosfatase alcalina de cartilagem e osso (Shwartz *et al.*, 1998) e da proteína ligadora de cálcio no disco de crescimento das aves (Xu *et al.*, 1998).

O acúmulo de resultados experimentais, ao longo desses últimos anos, tem mostrado que a vitamina D é essencial ao processo de condrogênese (produção de cartilagem) e osteogênese (formação do tecido ósseo), principalmente durante o período de crescimento das aves (Xu *et al.*, 1998; Edwards, 2000). Entretanto, o mecanismo pelo qual a vitamina D previne a discondroplasia tibial foi e continua sendo

um assunto bastante controverso. Tem sido proposto que a vitamina D exerce um papel direto na regulação do metabolismo dos condrócitos (Sylvia *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 1998; Suda, 1985). Essa hipótese é suportada, principalmente, pela recente demonstração de que o seu uso como suplemento dietético é essencial para promover diferenciação dos condrócitos, bem como normalizar o crescimento no interior do disco de crescimento e prevenir discondroplasia tibial. Entretanto ainda não está perfeitamente esclarecido porque as aves de crescimento rápido necessitam de altos níveis exógenos de vitamina D para prevenir a discondroplasia tibial, sugerindo que, nas aves de crescimento rápido, a síntese endógena pelos rins é deficiente, e não consegue manter os níveis ideais de vitamina D, necessários para o processo de ossificação endocondral. Essa suposição é suportada pelo fato de que aves que possuem maior predisposição para desenvolver a lesão apresentam baixas concentrações plasmáticas de vitamina D, embora as concentrações circulantes de $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$ em pintos portadores de discondroplasia tibial sejam normais.

Outra possibilidade que não pode ser descartada seria uma alteração local na concentração dos metabólitos da vitamina D. Alguns autores admitem, ainda, que os condrócitos localizados no interior da lesão possuem menor número de receptores nucleares, e que os receptores dessas células também possuem uma baixa afinidade pelo ligante, o que poderia explicar a necessidade de altas concentrações de $1,25\text{(OH)}_2\text{D}_3$, a fim de se alcançar efeitos normais (Xu *et al.*, 1998). Entretanto, ainda não é conhecido se a vitamina previne a discondroplasia tibial induzindo a síntese de receptores nucleares.

Existem evidências, também, de que a discondroplasia tibial poderia ser atribuída a uma diminuição da síntese de uma proteína ligadora de cálcio intestinal e, subsequente diminuição do cálcio circulante (Haussler & McCain, 1977a,b). Entretanto esse parece não ser o caso uma vez que os níveis normais de cálcio e de fósforo necessários para a calcificação têm sido encontrados no disco de crescimento de animais com discondroplasia tibial. Recentemente, Xu *et al.* (1998) demonstraram que na discondroplasia tibial os condrócitos apresentam uma diminuição na expressão do gene da proteína ligadora de cálcio.

Tem sido proposto, ainda, que a discondroplasia tibial não está associada com um aumento nos condrócitos ou diminuição da reabsorção da cartilagem (Farquharson *et al.*, 1993), mas sim com fatores que regulam a diferenciação dos condrócitos (Rennie *et al.*, 1993; Farquharson *et al.*, 1995; Whitehead, 2002). Essa hipótese é suportada pelo fato de que a suplementação dietética



de 1,25-dihidroxicolecalciferol para aves normais resulta em estímulos da diferenciação de condrócitos e, particularmente, aumento da atividade da fosfatase alcalina (Farquharson *et al.*, 1992).

Estudos recentes têm demonstrado a presença de receptores funcionais para os metabólitos 1,25-(OH)₂D₃ e 24,25-(OH)₂D₃ na membrana das vesículas extracelulares isoladas do disco de crescimento (Nemere *et al.*, 1998; Pedrozo *et al.*, 1999). O mecanismo de sinalização desses receptores inclui a participação da proteína quinase C (Sylvia *et al.*, 1997; 2001), a fosfolipase A₂ (Schwartz & Boyan, 1988; Sylvia *et al.*, 1998) e de prostaglandinas (Schwartz *et al.*, 1992; Sylvia *et al.*, 2001). O efeito final da interação desses metabólitos com os receptores é a modulação das enzimas envolvidas na calcificação biológica, a fosfatase alcalina, e enzimas proteolíticas, tais como a metaloproteases, colagenases e estromelina que participam da degradação e da renovação das proteoglicanas e do colágeno.

O mecanismo de controle da mineralização, mediado pelas vesículas extracelulares, inclui efeitos na liberação das vesículas pela 1,25 dihidrovitamina D₃, ativação de proteína quinase e apoptoses. Além disso, a composição da vesícula da matriz e o seu potencial de mineralização podem ser regulados por hormônios calciotrópicos e citocininas. Alterações no microambiente das vesículas também podem influenciar o seu potencial de iniciar a calcificação e a propagação extravascular do mineral (Sylvia *et al.*, 2001).

Resultados contraditórios têm sido publicados sobre o efeito da vitamina D na concentração da fosfatase alcalina circulante. Segundo Roberson & Edwards (1994), o nível de fosfatase alcalina circulante não é afetado pelo uso da vitamina D na alimentação. Apesar dessas contradições, alguns autores admitem, ainda, que a vitamina D poderia aumentar a expressão de uma fosfatase alcalina intestinal, que poderia atuar como uma fosfotransferase e favorecer a translocação do fosfato, e de outras proteínas que são reguladas pela proteína ligadora de cálcio.

Em relação ao papel da vitamina A, alguns estudos indicam que concentrações elevadas dessa vitamina, na dieta, interfere na absorção de vitamina D, no intestino, pois ambas competem pelo mesmo sítio de absorção (Veltmann *et al.*, 1986). Além disso, resultados contraditórios tem sido obtidos, utilizando-se altos níveis de vitamina A na dieta sobre a incidência de discondroplasia, alguns autores demonstram que níveis elevados podem reduzir a incidência, enquanto outros indicam que existe uma exacerbação do

processo (Veltmann *et al.*, 1986; Ballard & Edwards, 1998).

Britton (1992) estudou os efeitos causados por um excesso de vitamina A na dieta de frangos, utilizando-se de três níveis de vitamina A e dois de vitamina D nas rações, e concluiu que a severidade da discondroplasia aumentou nas aves alimentadas com ração deficiente em vitamina D e com os maiores níveis de vitamina A. Resultados semelhantes foram obtidos por Luo & Huang (1991), que pesquisaram a interação das vitaminas A e D sobre o desempenho, incidência e severidade da discondroplasia em frangos. Trabalhos com perús demonstram que níveis dietéticos de 13.200 mg de vitamina A/kg podem reduzir a taxa de crescimento e evidenciar sintomas clínicos de raquitismo (Stevens *et al.*, 1983).

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é essencial para a formação do colágeno e sua deficiência resulta na síntese de molécula de colágeno instável, caracterizada por uma matriz extracelular anormal e interrupção da ossificação endocondral. O colágeno é a molécula orgânica, que confere força e estabilidade à cartilagem do disco de crescimento (Farquharson & Jeffereis, 2000), e sua estabilidade depende da hidroxiprolina para formar pontes de hidrogênio intercadeias (Jimenez *et al.*, 1973).

A vitamina C é o cofator das enzimas prolil e lisil hidroxilase que participam do processo de modificação pós-transcricional, levando à formação da forma estável do colágeno (Hausmann, 1967; Hutton *et al.*, 1967; Kivikko & Prochop, 1967, 1972). O ácido ascórbico também estimula outras reações de hidroxilação, inclusive a da hidroxilase que converte 25-(OH)₂D₃ em 1,25-(OH)₂D₃ (Farquharson & Jeffereis, 2000). Entretanto ainda não está perfeitamente esclarecido se o ácido ascórbico e a vitamina D (metabólito 1,25-(OH)₂D₃) apresentam ação sinérgica na prevenção da discondroplasia tibial, participando da modulação e da regulação da composição da matriz óssea secretada no disco de crescimento e da diferenciação dos condrócitos.

Estudos *in vitro* mostram que a adição de ácido ascórbico ao meio de cultivo facilita a diferenciação dos condrócitos (Monsonigo *et al.*, 1997), aumentando a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de osteopontina (Beck *et al.*, 2000). Segundo esses autores, o ácido ascórbico é um indutor importante de diferenciação de osteoblastos, estimulando a secreção de matriz extracelular rica em colágeno e de efetores gênicos específicos tais como: fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina. A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz extracelular pelos osteoblastos, durante o desenvolvimento do tecido ósseo. Em relação à sua função, admite-se que a osteopontina



facilita a ligação dos osteoblastos e dos osteoclastos à matriz extracelular, permitindo assim que tais células desempenhem suas respectivas funções durante a osteogênese.

Segundo Farquharson *et al.* (1998) o ácido ascórbico, *in vitro*, além de atuar como um sinal estimulador da síntese de fosfatase alcalina, também aumenta o número de receptores da $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ dos condrócitos. Como o número de receptores dos condrócitos, localizados no interior da lesão está reduzido (Berry *et al.*, 1996), tem sido proposto que o ácido ascórbico, juntamente com $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, pode desempenhar, em nível celular, um papel importante na regulação do desenvolvimento da discondroplasia tibial. Entretanto as diferentes condições experimentais utilizadas no estudo do efeito da vitamina C na discondroplasia tibial têm levado à publicação de resultados contraditórios, o que tem dificultado a elucidação da possível eficácia dessa vitamina na prevenção do desenvolvimento da lesão.

Weiser (1988) verificou que a adição de vitamina C na dieta animal resulta em aumento da proteína ligadora de cálcio duodenal e do metabólito $1,25\text{-dihidroxicolecalciferol}$ ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) plasmático, sugerindo que a vitamina C provoca um aumento da atividade da hidroxilase que converte $25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ em $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Por outro lado, Edwards (1989) não observou nenhuma interação entre o ácido ascórbico e o colecalciferol no crescimento, na quantidade de cinzas do tecido ósseo, ou na prevenção da discondroplasia tibial.

Estudos mostraram que a suplementação de ácido ascórbico à dieta normal não previnem a discondroplasia tibial em aves, embora Whitehead *et al.* (1994) tenham demonstrado que a adição de vitamina C à dieta eliminou ou reduziu a incidência da lesão em níveis tão baixos quanto aquele das aves portadoras de discondroplasia tibial induzida pela dieta, contendo $2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Entretanto estudos posteriores mostraram que a adição de 250, 500 ou 1.000 mg de Vitamina C/kg na ração não reduziu a incidência de discondroplasia tibial, tanto na ausência como na presença de vitamina D (Edwards, 2000), sugerindo que a vitamina C não previne a discondroplasia tibial em aves (Leach & Burdette, 1985; Edwards, 1989).

Cloreto de sódio

Dentre os minerais das dietas para aves, o cloreto de sódio é, provavelmente, o macromineral essencial

mais barato de todos os nutrientes. O íon sódio é o cátion mais abundante do fluido extracelular (ECF), e o cloreto o principal ânion, cuja concentração média no ECF é da ordem de 140 e 105 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente (Harper *et al.*, 1997; Underwood & Suttle, 1999). A osmolaridade, a concentração de sódio e o volume de líquido extracelular dependem de fatores dietéticos, ambientais (calor, frio, pressão atmosférica) e do sistema hormonal renina-angiotensina-aldosterona (Detweiler, 1996; Harper *et al.*, 1997; Underwood & Suttle, 1999). Quando o consumo de sódio é alto, a produção de aldosterona cai e a excreção de sódio, pela urina, aumenta. Por outro lado, quando o consumo de sódio é baixo, o rim produz mais aldosterona e a eliminação de sódio na urina diminui. Além disso, tem sido demonstrado que o desequilíbrio osmótico, causado por deficiências dietéticas ou excessos de sódio, potássio e cloreto é regulado pelo complexo sistema vasopressina e renina-angiotensina-aldosterona (Detweiler, 1996; Harper *et al.*, 1997; Underwood & Suttle, 1999). Esse sistema é importante para o processo de regulação da osmolalidade, manutenção da pressão osmótica dos líquidos corporais, protegendo o organismo contra a perda excessiva de líquido.

O sódio também participa do controle da passagem de nutrientes para as células (Maynard *et al.*, 1984), da regulação do volume celular, da absorção de pirimidinas, de aminoácidos, de carboidratos e de sais biliares (Harper *et al.*, 1997). Além disso, ele também participa da condução de impulsos nervosos, do controle da contração muscular e da manutenção dos potenciais de membrana.

Embora os íons sódio e cloreto sejam considerados essenciais para o ótimo crescimento e desenvolvimento do esqueleto, bem como para prevenir e diminuir a incidência da discondroplasia tibial em aves, resultados contraditórios têm sido publicados em relação às necessidades diárias desses íons. Nesse sentido, o NRC (1994) recomenda a adição de 0,2% dos íons cloreto e sódio à dieta no período de 0 a 3 semanas de idade, nível esse superior àquele recomendado pelo mesmo NRC em 1984. Valores semelhantes também foram recomendados por Britton (1991) e por Zanardo (1994). Por outro lado, Murakami *et al.* (1997) verificaram que os melhores resultados foram obtidos com níveis dietéticos de 0,25% de sódio. Além disso, estudos de Butolo *et al.* (1995) sobre a influência dos níveis de NaCl na conversão alimentar de frangos de corte indicam uma exigência de 0,55% de NaCl ou 0,22% de sódio.

Segundo Oviedo-Rondón *et al.* (2001), a exigência de íons sódio e de cloreto para o máximo desempenho de frangos de corte é de 0,28% e 0,25%, respectivamente. Esses autores verificaram, ainda, que a área da zona

hipertrófica da metáfise proximal do tibiotarso diminuiu com o aumento dos níveis do íon sódio, diminuindo assim a probabilidade de incidência de discondroplasia tibial.

Murakami *et al.* (2001), estudando as exigências nutricionais dos íons sódio e cloreto para frangos de corte, observaram que a área da zona hipertrófia aumentou com o aumento da concentração do íon cloreto, sugerindo que altos níveis de cloreto podem aumentar a probabilidade de incidência de discondroplasia tibial. Além disso, segundo esses autores, as exigências desses íons para o máximo crescimento dos frangos de corte, no período compreendido entre 21 a 42 dias de idade, é de 0,15% para o íon sódio e de 0,23% para o íon cloreto, respectivamente.

Perspectivas

Parece evidente que as aves portadoras de altos índices de discondroplasia tibial têm um defeito no metabolismo da vitamina D, sugerindo que o estímulo mecânico juntamente com o genótipo e alterações nos constituintes da dieta podem interromper os eventos envolvidos no processo de diferenciação dos condrócitos e desencadear o processo de formação

da lesão. O principal desafio para o futuro é estabelecer se o aporte externo de vitamina D₃ é suficiente para prevenir a discondroplasia tibial e/ou se discondroplasia tibial é devida à mecanismos e/ou defeito(s) mais complexo(s).

Os minerais constituem uma pequena porção das dietas de aves, mas são essenciais para prevenir as deficiências e, conseqüentemente, patologias. Alguns minerais, particularmente o cloreto de sódio, exercem funções essenciais no organismo animal, e o uso de concentrações apropriadas desse mineral na dieta de aves é muito importante para a regulação dos processos fisiológicos, bem como prevenir o desenvolvimento da discondroplasia tibial em aves.

A descoberta de novas técnicas de biologia molecular, de novos fatores e de novas moléculas envolvidas na biomineralização podem fornecer dados que possam, ulteriormente, ser utilizados em estudos moleculares e estabelecer estratégias de ajuda para o tratamento de doenças do tecido ósseo. A compreensão do mecanismo de ação dessas biomoléculas pode levar à descoberta de uma condição ideal na prevenção da discondroplasia tibial em alguns animais, mas não em outros.

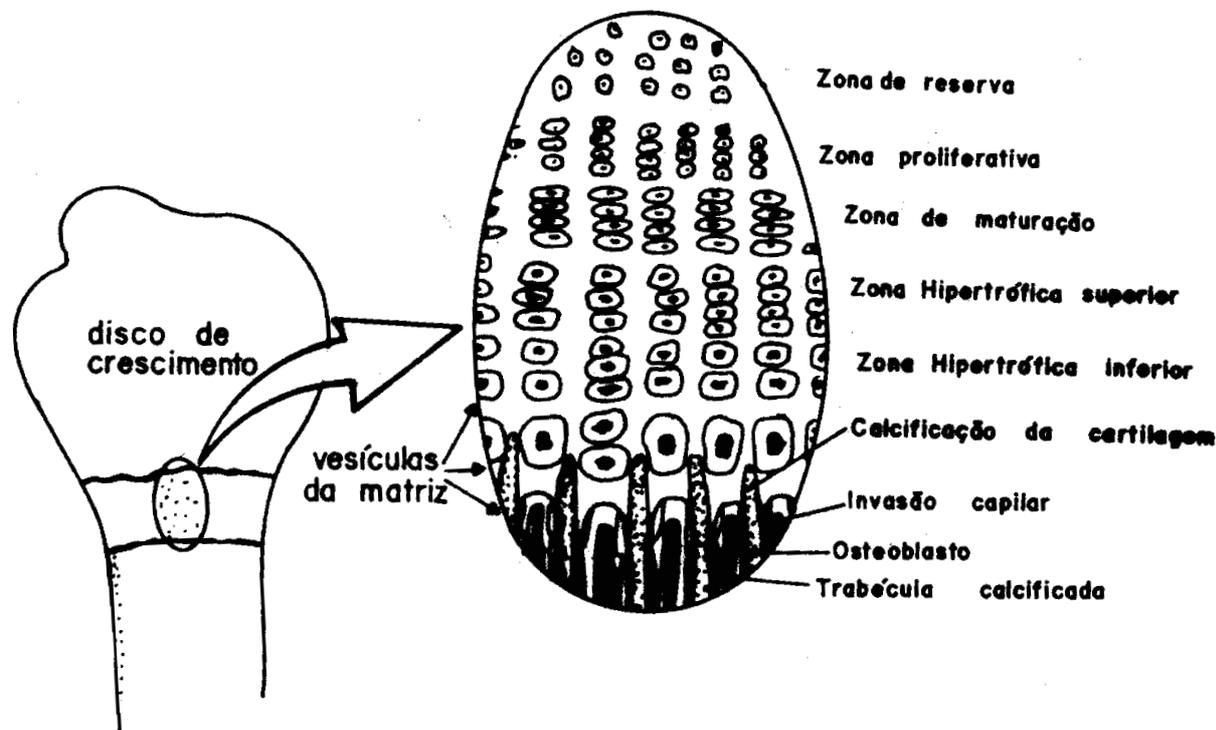


Figura 1 - Estágios do processo de ossificação endocondral no disco de crescimento. O processo de ossificação endocondral envolve: proliferação dos condrócitos, maturação e hipertrofia, como também síntese e calcificação de matriz extracelular. Esses eventos iniciais são seguidos pela vascularização da cartilagem calcificada.

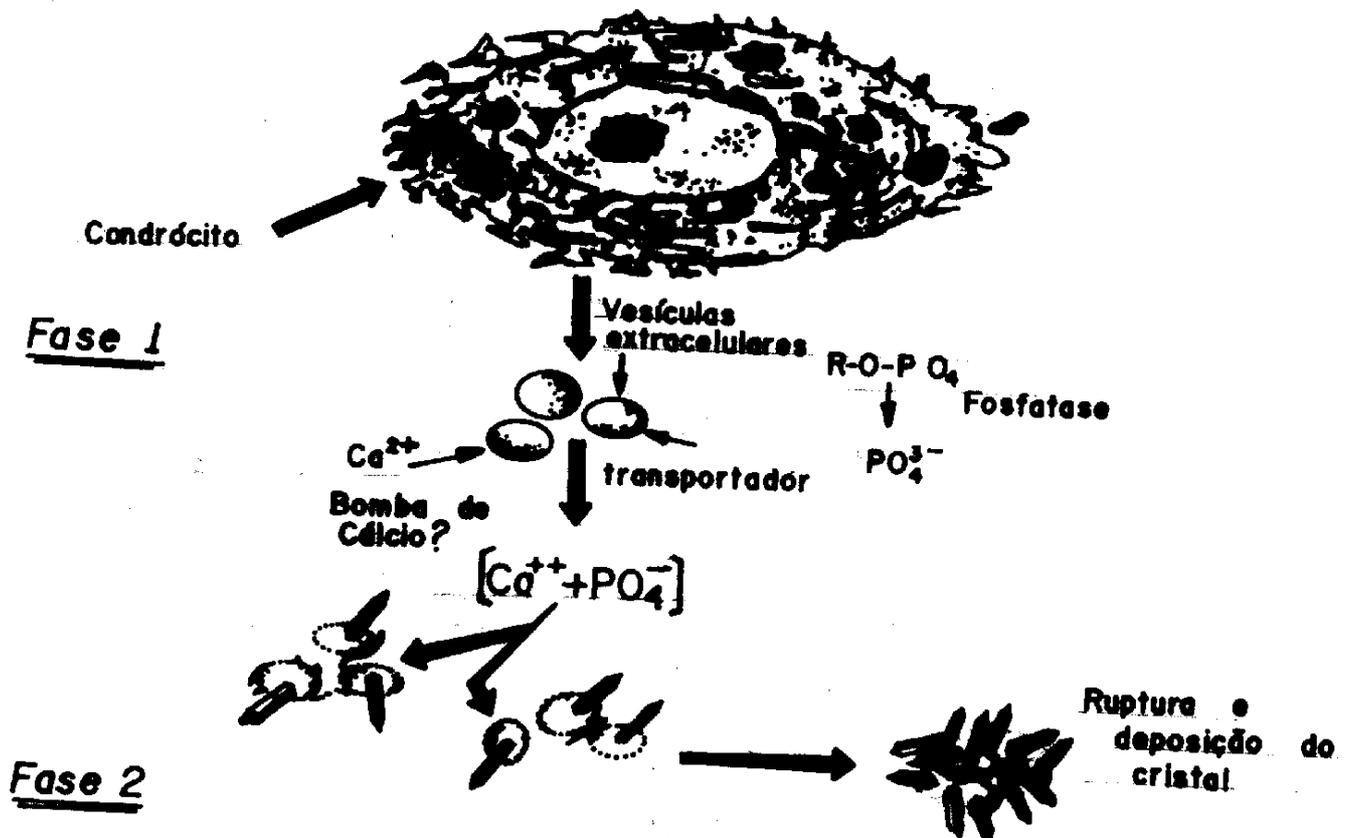


Figura 2 - Biogênese das vesículas da matriz. As vesículas extracelulares são formadas por brotamento de regiões especializadas da membrana plasmática dos condrocitos, osteoblastos e odontoblastos. Na primeira fase (fase 1 ou nucleação), o cálcio é transferido para o interior das vesículas onde permanece ligado aos lipídios da membrana e às proteínas do interior das vesículas da matriz. Paralelamente, a fosfatase alcalina fornece o fosfato através da sua ação sobre seu substrato fisiológico. O aumento do produto iônico cálcio versus fosfato, no interior das vesículas extracelulares, provoca a precipitação do fosfato de cálcio e, em consequência ocorre um colapso da matriz. O mineral rompe a membrana da vesícula e extravasa para o meio extracelular, provocando assim o crescimento dos cristais (fase 2 ou crescimento do mineral). Finalmente, o processo é completado com a ruptura da vesícula, formação de cristais e degradação da membrana da vesícula extracelular por proteases e lipase.

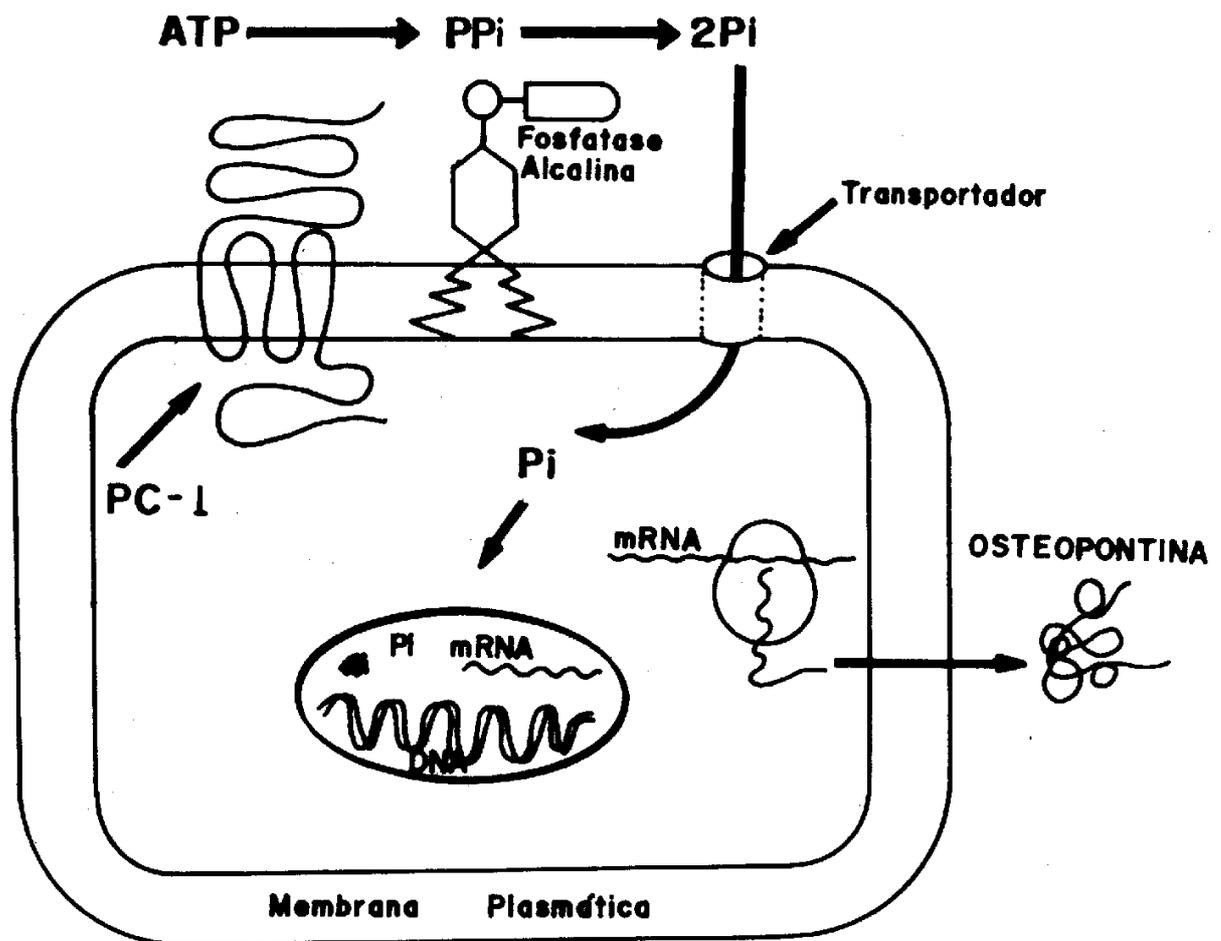


Figura 3 - Coordenação da atividade fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1), atividade da fosfatase alcalina e do nível de osteopontina. O sítio catalítico das ectoenzimas, fosfatase alcalina e PC-1 estão localizados na porção extracelular e em contato com o fluido intersticial. No fluido extracelular, a PC-1 hidrolisa o ATP para gerar o substrato da ectofosfatase alcalina, o pirofosfato inorgânico. A fosfatase alcalina hidrolisa o pirofosfato liberando o fosfato inorgânico (Pi). O fosfato livre entra na célula por um transportador de fosfato dependente de sódio. No interior da célula o fosfato inorgânico estimula a transcrição e síntese de osteopontina.

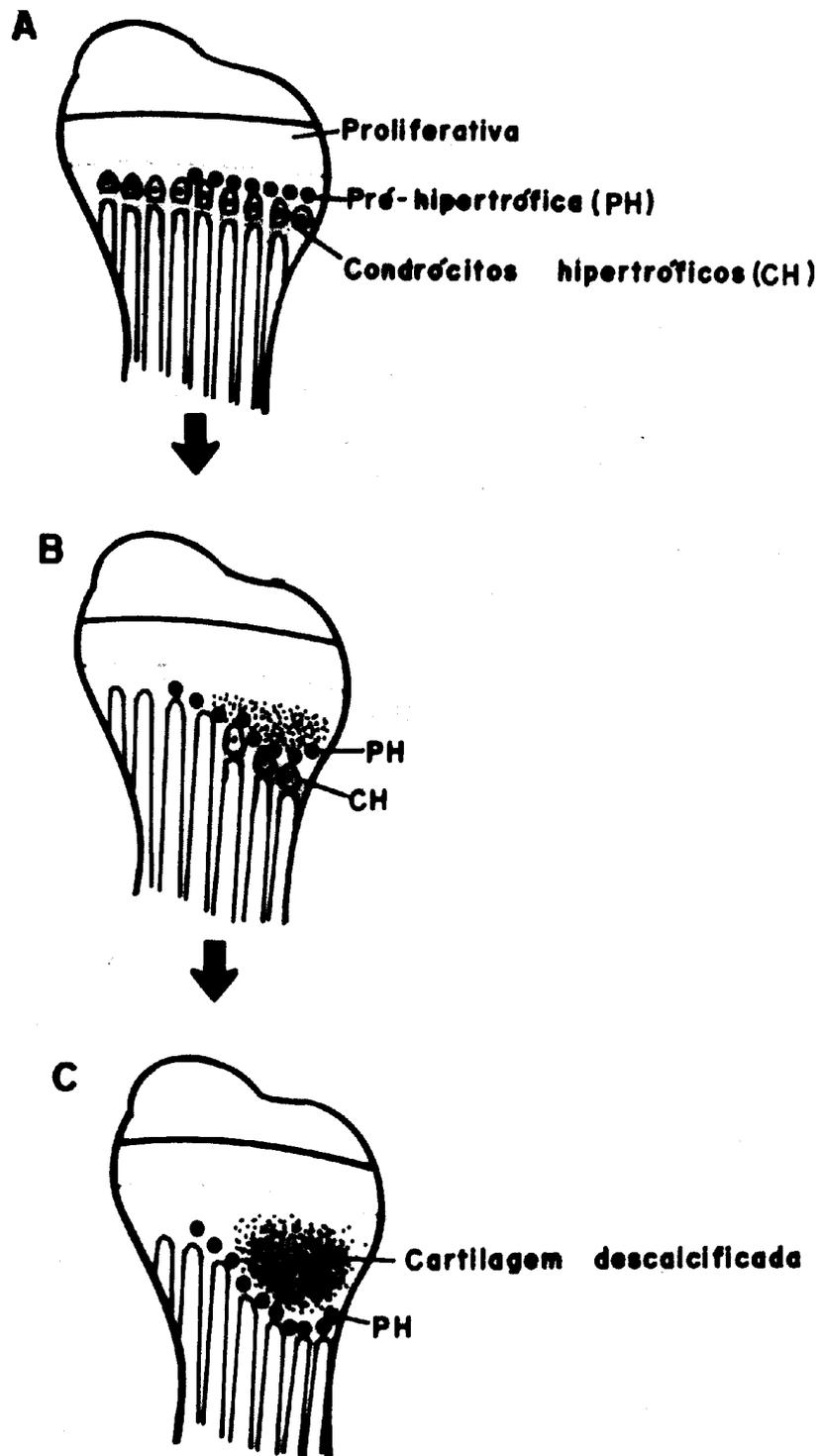


Figura 4 - Etapas do desenvolvimento da discondroplasia tibial.

A- inicialmente, o estímulo mecânico interrompe a cascata de diferenciação dos condrocitos pré-hipertrofos em hipertrofos.

B- os condrocitos continuam a proliferar-se normalmente levando a um acúmulo de condrocitos pré-hipertrofos.

C- a lesão aumenta em tamanho e o fornecimento de nutrientes e de oxigênio aos condrocitos localizados no interior da lesão é inadequado, levando ao aparecimento de uma lesão severa.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali SY. Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. *Federation Proceedings* 1976; 35:135-42.
- Ali SY, Evans L. The uptake of ⁴⁵Ca ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochemical Journal* 1973; 134: 647-650.
- Anderson HC. Calcium-accumulating vesicles in the intercellular matrix of bone. In: *Hard Tissue Growth. Repair and Remineralization*. Elsevier. New York. Ciba Foundation Symposium (New Series) 11. 1973. p.213-226..
- Anderson HC. Matrix vesicle calcification. *Federation Proceedings* 1976; 35: 105-108.
- Anderson HC, Hsu HH, Morris DC, Fedde KN, Whyte MP. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *American Journal of Pathology* 1997; 151: 1555-1561.
- Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995; 314: 266-280.
- Baker DH, Biehl RR, Emmert JL. Vitamin D₃ requirement of young chicks receiving diets varying in calcium and available phosphorus. *Bristh Poultry Science* 1998; 39 (3): 413-417.
- Ballard R, Edwards HM. Effects of dietary zeolite and vitamin A on tibial dyschondroplasia in chickens. *Poultry Science* 1998; 67: 113-119.
- Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97 (15): 8352-8357.
- Berry JL, Farquharson C, Whitehead CC, Mawer EB. Growth plate chondrocyte vitamin D receptor number and affinity are reduced in avian tibial dyschondroplastic lesions. *Bone* 1996; 19:197-213.
- Bonucci E. The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1971; 78:108-139.
- Butollo EAF, Nobre PTC, Lima IA. Study of performance of broiler chickens fed different levels of sodium chloride (NaCl). In: *Anais da Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola*. Facta, Curitiba, PR., Brasil 1995. p51-52.
- Caswell AM, Whyte MP, Russell RG. Normal activity of nucleoside triphosphate pyrophosphatase in alkaline phosphatase-deficient fibroblasts from patients with infantile hypophosphatasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1986; 63:1237-1241.
- Clarke PG, Clarke PG. Nineteenth century research on the naturally occurring cell death and related phenomena. *Anatomy and Embryology* 1996; 193:81-89.
- Detweiler DK. Estresse circulatório normal e patológico. In: *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. Swenson MJ and Reece WO (eds). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996; p.232-233.
- Edwards HM. The effect of dietary cholecalciferol, 25hydroxycholecalciferol and 1,25dihydroxycholecalciferol on the development of tibial dyschondroplasia in broiler chickens in the absence and presence of disulfiram. *Journal of Nutrition* 1989; 119: 647-652.
- Edwards HM. Jr Nutrition and skeletal problems in poultry. *Poultry Science* 2000; 79(7): 1018-23.
- Edwards HM, Carlos AB, Kasin A. Evaluation of commercial cholecalciferol (D₃) sources. *Poultry Science* 1996; 75 (Suppl. 1): 1 (Abstrat).
- Farquharson C, Jeffereis D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* 2000; 79(7): 994-1004.
- Farquharson C, Whitehead CC, Rennie JS, Loveridge N. In vivo effect of 1,25 dihydroxycholecalciferol on the proliferation and differentiation of avian chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* 1993; 8: 1081-1088.
- Farquharson C, Berry JL, Mawer EB, Seawright E, Whitehead CC. Regulators of chondrocyte differentiation in tibial dyschondroplasia: an in vivo and in vitro study. *Bone* 1995; 17 (3): 279-286.
- Farquharson C, Berry JL, Mawer EB, Seawright E, Whitehead CC. Ascorbic acid-induced chondrocyte terminal differentiation: the role of the extracellular matrix and 1,25-dihydroxyvitamin D. *European Journal of Cell Biology* 1998; 6: 110-118.
- Farquharson C, Whitehead CC, Rennie S, Trop B, Loveridge N. Cell proliferation and enzyme activities associated with development of avian dyschondroplasia: an in situ biochemical study. *Bone* 1992; 13 (1): 59-67.
- Fleisch H, Russell RG. A review of the physiological and pharmacological effects of pyrophosphate and diphosphonates on bones and teeth. *Journal of Dental Research* 1972; 51: 324-332.
- Floyd WED, Zaleske DJ, Schiller AL, Trahan C, Mankin HJ. Vascular events associated with the appearance of second center of ossification in the murine distal femoral epiphysis. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1987; 69:185-190.
- Galperin MY, Bairoch A, and Koonin EV. A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Science* 1998;7: 1829-1835.
- Gerber HP, Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2000; 10: 223-238.
- Gibson GJ, Kohler WJ, Schaffer MB. Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Developmental Dynamics* 1995; 203 (4): 468-476.
- Gibson G, Lin DL, Wang X, Zhang L. The release and activation of transforming growth factor beta2 associated with apoptosis of chick hypertrophic chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001; 16 (12):2330-2338.



- Gibson G, Lin DL, Roque M. Apoptosis on terminally differentiated chondrocytes in culture. *Experimental Cell Research* 1997; 233(2):372-382.
- Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Mathieu B. Structural and catalytic similarities nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases and alkaline phosphatases *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(2): 1361-1368.
- Harper ME, Willis JS, Patrick J. Sodium and choride in nutrition. In: *Handbooks of Nutritionally Essential Mineral Elements*. O'Dell BL and Sundie RA (eds). Merceel Dekker, Nerw York .1997. p. 93-116.
- Hausmann E. Cofactor requeriments for the enzymatic hydroxylation of lysine in a polypeptide precursor of collagen. *Biochemica et Biophysica Acta* 1967; 133: 591-593.
- Haussler MR, McCain TA. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (first of two parts). *New England Journal of Medicine* 1977a; 297 (18): 974-983.
- Haussler MR, McCain TA. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (second of two parts). *New England Journal of Medicine* 1997b; 297(19): 1041-1050.
- Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp-5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996; 122:3151-3162.
- Hinek A, Poole AR. The influence of vitamin D metabolites on the calcification of cartilage matrix and the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). *Journal of Bone and Mineral Research* 1988; 3 (4): 421-429.
- Howllet CR. The fine structure of the proximal growth plate of the avian tibia. *Journal of Anatomy* 1979; 128: 377-399.
- Hsu HH. Mechanisms of initiating calcification. ATP-stimulated Ca- and Pi-depositing activity of isolated matrix vesicles. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1994; 26:1351-1356.
- Hsu HH, Anderson HC. Calcification of isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from fetal bovine cartilagem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978; 75: 3805-3808.
- Hsu HH, Anderson HC. The deposition of calcium pyrophosphate by NTP pyrophosphohydrolase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilagem. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1986; 18 (12): 1141-1146.
- Hsu HHT, Anderson CH. A role for ATPase in the mechanisms of ATP-dependent Ca and phosphate deposition by isolated rachitic matrix vesicles. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 1995; 12: 1349-1356.
- Hsu HHT, Anderson HC. A simple and defined method to study calcification by isolated matrix vesicles. Effect of ATP and vesicle phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 500: 162- 172.
- Hunziker EB, Schenk RK, Cruz-Orive LM. Quantition of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1987; 69: 162-173.
- Hutton JJ, Tappel AL, Udenfriend U. Cofactors and substrate requeriments of collagen proline hydroxylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1967; 118: 231-240.
- Jeffereis D, Houston B, Lester D, Withehead CC, Thorp BH, Botman M, Farquharson C. Expression patterns of chondrocyte genes cloned by differential display in tibial dyschondroplasia. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000;1501 (2-3):180-188.
- Jimenez S, Harsch M, Rosenbloom J. Hidroxyproline stabilizes the triple helix of chick tendon collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1973; 52(1): 106-114.
- Johnson K, Moffa A, Chen Y, Pritzker K, Goding J, Terkeltaub R. Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 14(6): 883-892.
- Johnson KA, Wennberg C, Hessle L, Mauro S, Goding JJ, Millan JL, Terkeltaub R. Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *American Journal of Physiology (Regulatory Integrative and Comparative Physiology)* 2000; 279: R1365-R1377.
- Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi MJ, Goldring MB, Eriksoson JE, Sistonen L, Helminen HJ. Hsp70 accumulation in chondrocytes cells exposed to high continous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95(5): 2319-2324.
- Kerr NF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a base biological phenomenon with wide- ranging implicatons in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972; 26:239-257.
- Kilburn J, Edwards HM. The response of broilers to the feeding of mash or pelleted diets containing maize of varying particle sizes. *British Poultry Science* 2001; 42(4): 484-492.
- Kirsch T, Wuthier RE. Stimulation of calcification of growth plate matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269 (15): 11462-11469.
- Kivirikko KL, Prockop DJ. Partial purification and characterization of protocollagen lysine hydroxylase from chick embryos. *Biochemica et Biophysica Acta* 1972; 258 (2): 366-379.
- Kivirikko KL, Prockop DJ. Enzymatic hydroxylation of proline and lysine in protocollagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of ohe United States of America* 1967; 57: 782-790.
- Krug HE, Mahowald ML, Halverson PB, Sallis JD, Cheung HS. Phosphocitrate prevents disease progression in murine progressive ankylosis. *Arthritis and Rheumatism* 2000; 36: 1603-1611.
- Laureano MMM, Pizauro JM, Souza JP, Frizzas de Lima ACF, Routman K, Pizauro RJL. Discondroplasia tibial: caracterização cinética da



- fosfatase alcalina do disco epifisário de frangos. Anais. XIV Congresso de Iniciação Científica. Unesp. Presidente Prudente. 2002. CDroom.
- Leach RM Jr, Burdette JH. The influence of ascorbic acid on the occurrence of tibial dyschondroplasia in young broiler chickens. *Poultry Science* 1985; 64 (6):1188-91.
- Leone FA, Pizauro JM, Ciancaglini P. Rat osseous plate alkaline phosphatase: a search for its role in biomineralization. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* 1997; 3: 57-73.
- Loveridge N, Farquharson C. Studies on growth plate chondrocytes in situ: cell proliferation and differentiation. *Acta Paediatrica (Suppl.)* 1993; 391: 41-48.
- Luo L, Huang J. Effects of vitamin A and D supplementation on tibial dyschondroplasia in broilers. *Animal Feed Science and Technology* 1991; 34: 21-27.
- Martin SJ, Green DR, Cotter TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Science* 1994; 19 (1): 26-30.
- Martino LJ, Yager VL, Taylor JL. An ultrastructural study of the role calcification nodules in the mineralization of woven bone. *Calcified Tissue International* 1979; 27(1):57-64.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology* 1998; 85(6): 638-46.
- Maynard LA, Loosly JK, Hintz HF, Warner RG. *Nutrição animal*. 3th ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1984. 736p.
- Meyer JL. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1984; 231(1): 1-8.
- Monsonogo E, Baumbach WR, Lavelin I, Gertler A, Hurwitz S, Pines M. Generation of growth hormone binding protein by avian growth plate chondrocytes is dependent on cell differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1997; 135 (1): 1-10.
- Mosser DD, Caro AW, Bougert L, Merin AB, Sherman MY, Morimoto MI, Massie B. The chaperone function of Hsp70 is requisite for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20 (19): 7146-7159.
- Murakami AE, Saleh EA, England JA, Dickey, DA, Watkins SE, Waldroup PW. Effect of level and sources of sodium on performance of male broilers to 56 days. *Journal of Applied Poultry Research* 1997; 6:128-136.
- Murakami AE, Oviedo-Rondon EO, Martins EN, Pereira MS, Scapinello C. Sodium and chloride requirements of growing broiler chickens (twenty-one to forty-two days of age) fed corn-soybean diets. *Poultry Science* 2001; 80 (3): 289-94.
- National Research Council, 1984. Nutrient requirements of poultry. 8th ed. National Academy Washington, DC.
- National Research Council, 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th Ed. National Academy Washington, DC.
- Nair SP, Meghji S, Reddi K, Poole S, Miller AD, Henderson B. Molecular chaperones stimulate bone resorption. *Calcified Tissue International* 1999; 64 (3): 214-218.
- Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ which mediates rapid activation of protein kinase C. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998; 13(9): 1353-1359.
- Nie D, Genge BR, Wu LN, Wuthier RE. Defect in formation of functional matrix vesicles by growth plate chondrocytes in avian tibial dyschondroplasia: evidence of defective tissue vascularization. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995; 10(11): 1625-1634.
- Norman AW. Vitamin D: metabolism and calcium absorption - Review. *American Journal of Medicine* 1979; 67(6): 989-998.
- Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70- and Hsp40- a review. *International Journal of Hyperthermia* 2000; 16 (3): 231-245.
- Ohyama K, Farquharson C, Whitehead CC, Shapiro IM. Further observations on programmed cell death in the epiphyseal growth plate: comparison of normal and dyschondroplastic epiphyses. *Journal of Bone and Mineral Research* 1997; 12(10): 1647-1656.
- Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature Genetics* 1998; 19: 271-273.
- Oviedo-Rondon EO, Murakami AE, Furlan AC, Moreira I, Macari M. Sodium and chloride requirements of young broiler chickens fed corn-soybean diets (one to twenty-one days of age). *Poultry Science* 2001; 80 (5): 592-598.
- Pedrozo H, Schwartz Z, Rimes S, Sylvia VL, Nemere I, Posner GH, Dean DD, Boyan BD. Physiological importance of the 1,25-(OH)₂D₃ membrane receptor and evidence for a membrane receptor specific for 24,25-(OH)₂D₃. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 14 (6): 856-867.
- Pines M, Knopov O, Genina S, Hurwitz LC, Gerstenfield, Leach, R.M. Development of avian tibial dyschondroplasia: Gene expression and protein synthesis. *Calcified Tissue International* 1998; 63: 521-527.
- Pizauro JM, Ciancaglini P, Leone FA. Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1993; 1202: 22-28.
- Pizauro JM, Curti C, Ciancaglini P, Leone FA. Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. *Comparative Biochemistry Physiology* 1987; 87: 921-926.
- Pizauro JM, Demenis MA, Ciancaglini P, Leone FA. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1368: 108-114.



- Poole, AR, Matsui Y, Hinek A, Lee ER. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anatomical Record* 1989; 224: 167-179.
- Praul CA, Gay CV, Leach RM Jr. Chondrocytes of the tibial dyschondroplastic lesion are apoptotic. *International Journal of Developmental Biology* 1997; 41 (4): 621-626.
- Praul CA, Ford BC, Gay CV, Pines M, Leach RM. Gene expression and tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* 2000; 79 (7): 1009-1013.
- Rath N C, Huff WE, Bayari GR, Balog JM. Cell death in avian tibial dyschondroplasia. *Avian Diseases* 1998; 42: 72-79.
- Reddi AH, Huggins CB. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1972; 69: 1601-1605.
- Reddi AH. Initiation and promotion of endochondral bone formation by bone morphogenetic proteins: potential implications for avian tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* 2000; 9 (7): 978-981.
- Register TC, Gregory PW, Wuthier RE. Effect on L- and D-tetramisole on ^{32}P and ^{45}Ca uptake and mineralization by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259: 922-928.
- Rennie JS, Whitehead CC. Effectiveness of dietary 25- and 1-hydroxycholecalciferol in combating tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *British Poultry Science* 1996; 37: 413-421.
- Rennie JS, Whitehead CC, Thorp BH. The effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol in preventing tibial dyschondroplasia in broilers fed on diets imbalanced in calcium and phosphorus. *British Journal of Nutrition* 1993; 69: 809-816.
- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 . *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1998; 9 (10): 419-427.
- Rezende LA, Ciancaglini P, Pizauro JM, Leone FA. Inorganic pyrophosphatase-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cellular and Molecular Biology* 1999; 44 (2): 293-302.
- Roberson KD, Edwards HM. Effects of ascorbic acid and 1,25-dihydroxycholecalciferol on alkaline phosphatase and tibial dyschondroplasia in broiler chickens. *British Poultry Science* 1994; 35: 763-773.
- Rutsch F, Vaingankar S, Johnson K, Goldfine I, Maddux B, Schauerte P, Kalhoff H, Sano K, Boisvert WA, Superti-Furga A, Terkeltaub R. PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *American Journal of Pathology* 2001; 158(2) : 543-54.
- Sela J, Gross UM, Kohavi D, Shani J, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Primary mineralization at the surfaces of implants. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2000; 11 (4): 423-436.
- Schwartz Z, Boyan BD. The effects of vitamin D metabolites on phospholipase A2 activity of growth zone and resting zone cartilage cells in vitro. *Endocrinology* 1998; 122: 2191-2198.
- Schwartz Z, Brooks BP, Swain LD, Dei Toro F, Norman AW, Boyan BD. Production of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and 24,25-dihydroxyvitamin D_3 by growth zone and resting zone chondrocytes is dependent on cell maturation and is regulated by hormones and growth factors. *Endocrinology* 1992; 130: 2495-2504.
- Schwartz Z, Schlader DL, Swain LD, Boyan BD. Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and 24,25-dihydroxyvitamin D_3 on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase-A2 specific activities. *Endocrinology* 1998; 1(23): 2878-2884.
- Stevens VL, Blair R, Riddel C. Dietary levels of fat, calcium, and vitamins A and D_3 as contributory factors to rickets in poult. *Poultry Science* 1983; 62: 2073-2082.
- Suda S, Takahashi N, Shinki T, Horiuchi N, Yamaguchi A, Yoshiki S, Enomoto S, Suda T. 1- α ,25-dihydroxyvitamin D_3 receptors and their action in embryonic chick chondrocytes. *Calcified Tissue International* 1985; 37(1): 82-90.
- Sylvia VL, Del Toro Jr. F, Hardin RR, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Characterization of PGE_2 receptors (EP) and their role as mediators of 1 α ,25-(OH) $_2\text{D}_3$ effects on growth zone chondrocytes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2001;78: 261-274.
- Sylvia VL, Schwartz Z, Curry DB, Chang Z, Dean DD, Boyan BD. 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ regulates protein kinase C activity through two phospholipid-independent pathways involving phospholipase A2 and phospholipase C in growth zone chondrocytes. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998; 13: 559-569.
- Sylvia VL, Schwartz Z, Holmes SC, Dean DD, Boyan BD. 24,25-(OH) $_2\text{D}_3$ regulation of matrix vesicle protein kinase C occurs both during biosynthesis and in the extracellular matrix. *Calcified Tissue International* 1997; 61(3): 13-32.
- Terkeltaub, R. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *American Journal of Physiology & Cell Physiology* 2001; 281 (1) C1-C11.
- Trop BH, Ducro B, Whitehead CC, Farquharson C, Sorensen, P. Avian tibial dyschondroplasia: The interaction of genetic selection and dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Avian Pathology* 1993; 22: 311-324.
- Underwood EJ, Suttle N. *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd ed. Foundation for Animal Health and Welfare, Penicuik, Edinburgh, UK. 1999. pp. 185-212.
- Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM, Chien C. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1973; 70 (12): 3511-3515.
- Vanmuylder N, Evrard L, Dourov N. Strong expression of heat shock proteins in growth plate cartilage, an immunohistochemical study of Hsp28, Hsp70 and Hsp110. *Anatomy and Embryology* 1997; 195 (4): 359-62.



Velleman SG. The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poultry Science* 2000; 79(7): 985-989.

Veltmann JR Jr, Jensen LS, Rowland GN. Excess dietary vitamin A in the growing chick: effect of fat source and vitamin D. *Poultry Science* 1986; 65 (1): 153-163.

Vu TH, Shirpley JM., Bergers G, Berger JE, Helms JEA, Hanhan D, Shapiro SD, Senior RM, Web Z. MM-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and the apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 1998; 93: 411-422.

Weiser H, Schlachter M, Bachmann H. The importance of ascorbic acid for hydroxylation of vitamin cholecalciferol to 1,25(OH)₂ cholecalciferol and 24R,25(OH)₂ cholecalciferol to a more active metabolite .In: *Vitamin D, Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology*. Norman AW, Bouillon R, Thomasset M (eds). Walter de Gruyter & Co., Berlin, Gernany. 1988. p.644-653.

Whitehead CC, Farquharson C, Rennie JS, McCormack HA. Nutritional and cellular factors affecting tibial dyschondroplasia in broilers. In: *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium*. University of Sydney, Sydney, NSW, Australia. 1994. p.13-19

Whitehead CC. Influence of vitamins and minerals on bone formation. *Archiv fur Gelfugelkunde (Special Issue – 11th European Poultry Conference)*: 47 (Abstract).

Wuthier RE. Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles and extracellular fluid. *Calcified Tissue Research* 1997; 23: 125-133.

Wuthier RE, Register TC. Role of alkaline phosphatase a polyfunctional enzyme in mineralizing tissues. In: *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissue*. Butler WT (ed.) EBSCO Media, Inc. Birmingham. 1985. p.113-124.

Wuthier RE, Bisaz S, Russell RG, Fleisch H. Relationship between pyrophosphate, amorphous calcium phosphate and other factors in the sequence of calcification in vivo. *Calcified Tissue Research* 1972; 10: 198-206.

Xu T, Kerr JM, Soares Jr, JH. Molecular aspects of tibial dyschondroplasia in the chicken: expression of calbindin-D28k gene. *Nutrition Research* 1998; 18 (1): 25-34.

Xu T, Soares Jr, JH, Leach RM Jr, Hollis, BW, Kerr JM. Evidence of increased cholecalciferol requirement in chickes with tibial dyschondroplasia. *Poultry Science* 1997;76: 46-53.

Zanardo JA. Níveis de sódio e agentes anticoccidianos ionóforos e não ionóforos em rações de frangos de corte . [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal de Viçosa , Viçosa, MG. 1994. Brasil.