

Nomeação do Júri da Prova de Doutoramento de

- IVA HUMBERTA OLIVEIRA DE BRITO -

Programa Doutoral em Medicina

Nos termos do disposto do n.º 2 do art.º 17.º do Regulamento dos Terceiros Ciclos de Estudos da Universidade do Porto, a seguir se publicita o júri de doutoramento em Medicina, da licenciada Iva Humberta Oliveira de Brito, nomeado por despacho vice-reitoral de 14 de fevereiro de 2012, com a tese "Estudo da placa de crescimento após um estímulo nódico num modelo experimental de crescimento de recuperação":

Presidente: Reitor da Universidade do Porto.

Vogais: Doutora Maria do Céu Lourinho Soares Machado, professora associada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa;

Doutor Alberto António Moreira Caldas Afonso, professor auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, orientador da tese;

Doutor Tiago Alexandre Henriques Coelho, professor auxiliar convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

Doutora Helena Gil Peña, investigadora da Universidade de Oviedo, Espanha.

Divisão Académica, 2 de março de 2012

O Diretor da Faculdade



(Doutor J. Agostinho Marques)

**ESTUDO DA PLACA DE CRESCIMENTO APÓS UM ESTÍMULO
NÓXICO NUM MODELO EXPERIMENTAL DE CRESCIMENTO DE
RECUPERAÇÃO**

Iva Humberta Oliveira de Brito

Porto, 2011

Título Estudo da Placa de Crescimento Após um Estímulo
Nóxico num Modelo Experimental de Crescimento de
Recuperação

Autor Iva Humberta Oliveira de Brito

Execução Gráfica Tipografia Nunes Lda | Maia

Depósito Legal 342557/12

Ano 2011

Capa Iva Brito

*Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto*

Artigo 48, § 3:

'A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação' (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931, Decreto nº19337).

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PROFESSORES CATEDRÁTICOS EFECTIVOS

DOUTOR MANUEL ALBERTO COIMBRA SOBRINHO SIMOES

DOUTOR JORGE MANUEL MERGULHAO CASTRO TAVARES

DOUTORA MARIA AMELIA DUARTE FERREIRA

DOUTOR JOSÉ AGOSTINHO MARQUES LOPES

DOUTOR PATRÍCIO MANUEL VIEIRA ARAÚJO SOARES SILVA

DOUTOR DANIEL FILIPE LIMA MOURA

DOUTOR ALBERTO MANUEL BARROS DA SILVA

DOUTOR JOSE MANUEL LOPES TEIXEIRA AMARANTE

DOUTOR JOSE HENRIQUE DIAS PINTO DE BARROS

DOUTORA MARIA FÁTIMA MACHADO HENRIQUES CARNEIRO

DOUTORA ISABEL MARIA AMORIM PEREIRA RAMOS

DOUTORA DEOLINDA MARIA VALENTE ALVES LIMA TEIXEIRA

DOUTORA MARIA DULCE CORDEIRO MADEIRA

DOUTOR ALTAMIRO MANUEL RODRIGUES COSTA PEREIRA

DOUTOR RUI MANUEL ALMEIDA MOTA CARDOSO

DOUTOR ANTONIO CARLOS FREITAS RIBEIRO SARAIVA

DOUTOR JOSE CARLOS NEVES DA CUNHA AREIAS

DOUTOR MANUEL JESUS FALCAO PESTANA VASCONCELOS

DOUTOR JOÃO FRANCISCO MONTENEGRO ANDRADE LIMA BERNARDES

DOUTORA MARIA LEONOR MARTINS SOARES DAVID

DOUTOR RUI MANUEL LOPES NUNES

DOUTOR JOSÉ EDUARDO TORRES ECKENROTH GUIMARÃES

DOUTOR FRANCISCO FERNANDO ROCHA GONÇALVES

DOUTOR JOSE MANUEL PEREIRA DIAS DE CASTRO LOPES

DOUTOR MANUEL ANTÓNIO CALDEIRA PAIS CLEMENTE

DOUTOR ANTÓNIO ALBINO COELHO MARQUES ABRANTES TEIXEIRA

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PROFESSORES JUBILADOS E APOSENTADOS

DOUTOR ABEL JOSÉ SAMPAIO DA COSTA TAVARES

DOUTOR ABEL VITORINO TRIGO CABRAL

DOUTOR ALEXANDRE ALBERTO GUERRA SOUSA PINTO

DOUTOR AMÂNDIO GOMES SAMPAIO TAVARES

DOUTOR ANTONIO AUGUSTO LOPES VAZ

DOUTOR ANTÓNIO CARVALHO ALMEIDA COIMBRA

DOUTOR ANTÓNIO FERNANDES DA FONSECA

DOUTOR ANTÓNIO FERNANDES OLIVEIRA BARBOSA RIBEIRO BRAGA

DOUTOR ANTÓNIO GERMANO PINA SILVA LEAL

DOUTOR ANTÓNIO JOSÉ PACHECO PALHA

DOUTOR ANTÓNIO LUÍS TOMÉ DA ROCHA RIBEIRO

DOUTOR ANTÓNIO MANUEL SAMPAIO DE ARAÚJO TEIXEIRA

DOUTOR BELMIRO DOS SANTOS PATRICIO

DOUTOR CÂNDIDO ALVES HIPÓLITO REIS

DOUTOR CARLOS RODRIGO MAGALHÃES RAMALHÃO

DOUTOR CASSIANO PENA DE ABREU E LIMA

DOUTOR DANIEL SANTOS PINTO SERRÃO

DOUTOR EDUARDO JORGE CUNHA RODRIGUES PEREIRA

DOUTOR FERNANDO DE CARVALHO CERQUEIRA MAGRO FERREIRA

DOUTOR FERNANDO TAVARELA VELOSO

DOUTOR FRANCISCO DE SOUSA LÉ

DOUTOR HENRIQUE JOSÉ FERREIRA GONÇALVES LECOUR DE MENEZES

DOUTOR JOSÉ AUGUSTO FLEMING TORRINHA

DOUTOR JOSÉ CARVALHO DE OLIVEIRA

DOUTOR JOSÉ FERNANDO BARROS CASTRO CORREIA

DOUTOR JOSÉ LUÍS MEDINA VIEIRA

DOUTOR JOSÉ MANUEL COSTA MESQUITA GUIMARÃES

DOUTOR LEVI EUGÉNIO RIBEIRO GUERRA

DOUTOR LUÍS ALBERTO MARTINS GOMES DE ALMEIDA

DOUTOR MANUEL AUGUSTO CARDOSO DE OLIVEIRA

DOUTOR MANUEL MACHADO RODRIGUES GOMES

DOUTOR MANUEL MARIA PAULA BARBOSA

DOUTORA MARIA DA CONCEIÇÃO FERNANDES MARQUES MAGALHÃES

DOUTORA MARIA ISABEL AMORIM DE AZEVEDO

DOUTOR MÁRIO JOSÉ CERQUEIRA GOMES BRAGA

DOUTOR SERAFIM CORREIA PINTO GUIMARÃES

DOUTOR VALDEMAR MIGUEL BOTELHO DOS SANTOS CARDOSO

DOUTOR WALTER FRIEDRICH ALFRED OSSWALD

DOUTOR ÁLVARO JERONIMO LEAL MACHADO DE AGUIAR

Prefácio

O pequeno Francisco de nove anos, após episódio de doença que temporariamente o incapacitou, dedicou-me uma história infantil que criteriosamente adaptou e de forma sumária passo a citar:

“ Quando chegou a altura dos três passarinhos deixarem o ninho e começarem a voar, Francisco, o mais pequeno, não se sente preparado e quando decide experimentar, cai desamparado no chão...

Sente-se triste, desanimado e a noite parece-lhe muito escura... até que aparece Lourenço, o caracol que o anima a treinar, levando-o para cima de uma colina. De repente, Francisco começa a correr e levanta voo.

- Consigo voar como os outros – exclamou!

Francisco está feliz, sabe voar e tem um amigo!

Como é bom CRESCER!”

É pois na essência deste pequeno conto que fundamento o orgulho e o privilégio que sinto no exercício da Medicina e a vontade implícita de continuar a desenvolver, com zelo e entusiasmo, as minhas competências científicas, pedagógicas e pessoais.

Ao Prof. Doutor Caldas Afonso, quero de forma sentida, expressar-lhe todo o meu reconhecimento e gratidão, pelo constante empenho, incentivo e confiança demonstrada para que levasse a cabo um projeto audacioso que há muito tempo ansiava concretizar.

Agradeço-lhe também, o me ter proporcionado conhecer e trabalhar com o Prof. Doutor Fernando Santos, co-orientador deste trabalho e crucial para a sua execução.

O Prof. Doutor Fernando Santos alia ao seu reconhecido e prestigiado perfil científico a simplicidade, a humildade e afabilidade que o tornam um ser humano excepcional.

A todo o grupo do seu Laboratório de Investigação Pediátrica, e em especial à Vanessa Loredó, o meu muito obrigada pelo carinho, disponibilidade e entusiasmo que tornaram um processo de rigorosa aprendizagem, numa vivência pessoal e profissional inesquecível.

A todos aqueles que de uma forma desinteressada e entusiástica me apoiaram neste projeto, em especial à minha Família pelo incessante e incondicional estímulo e encorajamento, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Por fim, aos doentes, em particular às crianças e aos alunos desta Faculdade, força motriz do meu percurso profissional e da minha incessante vontade de aprender.

Como é bom CRESCER!

Abreviaturas

AIJ – Artrite Idiopática Juvenil

AFO – Avanço da Frente Óssea

SAL – Subunidade Ácido Lábil

ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro

BMPs – Proteínas Morfogénicas do Osso

BrdU-5 – Bromo-2' – desoxiuridina

C – Grupo Controlo

CR – Grupo com restrição dietética

CRGH – Grupo com restrição dietética, tratado com hormona de crescimento

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DRC – Doença Renal Crónica

ER α e **ER β** – Recetores α e β dos Estrogénios

FCF – Fator de Crescimento Fibroblástico

FSH – Hormona folículo-estimulante

GC – Glucocorticóides

GHRH – Hormona Libertadora da Hormona de Crescimento

HC – Hormona de Crescimento

HCBP – Proteínas de Ligação à Hormona Crescimento

IGF- I – Fator de Crescimento similar à Insulina-I

IGF- II – Fator de Crescimento similar à Insulina-II

IGFBPs – Proteínas de Ligação ao Fator de Crescimento similar à Insulina

Ihh – Indian hedgehog

IL1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina1 β

IL6 – Interleucina 6

Jak-2 – Tirosina- cinases Janus Kinase

LH – Hormona Lúteo-Estimulante

MAPK – Proteínas Mitogénicas

MMPs– Metaloproteínases

PC – Placa de Crescimento

PI3K – Cínase do inositoltrifosfato

PTHrP – Peptídeo relacionado com a Paratormona

RA – Recetor dos Androgénios

RHC – Recetor da HC

STATs – Proteínas de Transdução e Ativação de Transcrição

TNF α – Fator de Necrose Tumoral α

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Crescimento e Doença Crónica	3
1.1. Considerações Gerais	3
1.2. Fisiologia do Crescimento Ósseo; Crescimento Longitudinal do Osso.....	5
1.3. Crescimento de Recuperação (Catch-up Growth)	9
1.3.1. Aspectos Teóricos do Crescimento de Recuperação	9
1.3.2. Hipóteses Fisiopatológicas: modelos e mecanismos prováveis.....	10
2. Placa de Crescimento.....	12
2.1. Organização estrutural e funcional.....	12
2.2. Regulação Sistémica e Local	16
2.2.1. Regulação Hormonal	16
2.2.2. Regulação local	19
2.3. Placa de Crescimento na Doença Crónica	21
3. Tratamento com Hormona de Crescimento na Doença Crónica.....	25
II. OBJETIVOS	27
Objetivos Gerais	29
Objetivos específicos	29
III. RESULTADOS	31
Artigo 1	33
Artigo 2	49
IV. DISCUSSÃO	65
V. CONCLUSÕES.....	75
VI. RESUMO	79
VII. BIBLIOGRAFIA	85

I. INTRODUÇÃO

1. Crescimento e Doença Crônica

1.1. Considerações Gerais

As alterações do crescimento estatural têm sido amplamente documentadas em crianças portadoras de doença crônica e/ou submetidas a determinadas terapêuticas farmacológicas (De Luca 2006).

Estima-se que a prevalência das doenças crônicas na criança é de cerca de 10 a 20%, comportando diversas alterações no seu desenvolvimento físico, psíquico e social (Turkel and Pao 2007).

Inúmeras doenças crônicas na criança como a Doença Inflamatória Intestinal - DII (Ballinger 2002), Artrite Idiopática Juvenil - AIJ (Simon, Fernando et al. 2002; Simon, Lucidarme et al. 2002), Fibrose Cística-FC (Hardin 2002; Hardin 2002), Doença Renal Crônica - DRC (Kuizon and Salusky 1999) entre outras, estão associadas de forma variável a alterações do crescimento estatural.

O hipocrescimento nas crianças com doença crônica parece ser multifatorial. São apontados como possíveis fatores contributivos a idade de início, atividade e extensão da doença, nutrição deficiente, aumento do catabolismo, terapêuticas instituídas, sobretudo glucocorticoides - GC e o processo inflamatório subjacente, como nas DII e nas AIJ (Underwood 1999; De Luca 2006).

No entanto, os mecanismos exatos pelos quais as doenças crônicas causam atraso do crescimento são ainda amplamente desconhecidos. Sabendo que para o processamento de um crescimento normal é necessário e fundamental uma alimentação adequada, ingestão superior ao consumo e que a síntese tecidual deve ser superior à sua degradação (Underwood 1999), alterações nestes parâmetros, presentes de forma variável na doença crônica poderão, em parte, comprometê-lo.

O hipocrescimento na doença crônica é fundamentalmente devido à falência do crescimento longitudinal do osso que ocorre a

nível da Placa de Crescimento -PC, fina lâmina de cartilagem situada na extremidade dos ossos longos e vértebras (Kronenberg 2003), por ossificação endocondral.

A ossificação endocondral consta de dois processos ininterruptos e estritamente acoplados de produção contínua e vetorial de cartilagem (condrogénese) e a sua substituição por tecido ósseo (ossificação). A estrutura da PC mantém-se relativamente constante durante a formação do novo osso que ocorre na junção da PC com a metáfise óssea (Mackie, Ahmed et al. 2008).

Vários estudos demonstram que condições adversas como a má nutrição, a acidose e a uremia, bem como a inflamação mediada por citocinas, como a interleucina 6 (IL6), a interleucina 1 (IL1), o fator de necrose tumoral α (TNF α) e os GC prejudicam a dinâmica celular da condrogénese por inibição ou estimulação direta ou indireta, atuando de forma sistémica e/ou local na PC (MacRae, Farquharson et al. 2006; Macrae, Ahmed et al. 2007; Wong, MacRae et al. 2008).

A maioria dos efeitos deletérios observados na PC na doença crónica devem-se a uma relativa resistência à Hormona de Crescimento - HC e diminuição da biodisponibilidade do Fator de Crescimento Similar à Insulina - IGF1, traduzidas pelo decréscimo dos níveis dos recetores da HC - RHC, da expressão da IGF1 e das Proteínas de Ligação ao Fator de Crescimento similar à Insulina - IGF1BPs (De Luca 2006).

A falência do crescimento estatural pode, no entanto, ser revertida parcial ou totalmente se a condição inibitória desaparecer, como quando ocorre remissão da doença (Gafni and Baron 2000), havendo normalização do crescimento através de um ganho estatural acima dos valores normais para o esperado, traduzindo um fenómeno conhecido por Crescimento de Recuperação ou *Catch-up Growth* (Boersma and Wit 1997).

Este fenómeno foi demonstrado em animais e humanos subsequente a uma variedade de patologias como no Hipotiroidismo

(Pantsiouou, Stanhope et al. 1991), Síndrome de Cushing (Prader, Tanner et al. 1963), Acidose Tubular Renal (Caldas, Broyer et al. 1992) e DRC (Molinos, Santos et al. 2006).

A base fisiopatológica do Crescimento de Recuperação não é conhecida (Prader, Tanner et al. 1963; Boersma and Wit 1997), mas pensa-se na atualidade que reside na PC dos ossos longos (Nilsson and Baron 2005).

O tratamento com HC parece favorecer este fenómeno. O incremento na velocidade de crescimento traduz-se por alterações morfológicas e funcionais na PC (Molinos, Santos et al. 2006).

1.2. Fisiologia do Crescimento Ósseo; Crescimento Longitudinal do Osso

O crescimento humano ocorre de forma progressiva desde o período intrauterino até à idade adulta, numa combinação sequencial de diferentes fases biológicas dependentes de fatores fisiológicos específicos promotores do crescimento (Kronenberg 2003). Este processo é multifatorial envolvendo fatores genéticos, ambientais, nutricionais e hormonais (Robson, Siebler et al. 2002).

O crescimento embora seja progressivo, pode ser dividido em três etapas principais atendendo à velocidade com que se processa (Karlberg 1989; Karlberg 1989). No período fetal e primeiro ano de vida a velocidade de crescimento é elevada, atingindo o pico aos 2 anos de idade, desacelerando gradualmente até atingir valores estáveis por volta dos 4 anos (1ª infância). Esta fase está dependente sobretudo de fatores maternos e nutricionais. Numa 2ª fase, o crescimento é lento e regular até à puberdade, altura em que há uma nova aceleração do ganho estatural, associada à maturação do sistema reprodutor regulado pelos esteroides sexuais, atingindo-se o pico de velocidade de crescimento (pico pubertário). Após esta fase, volta a lentificar-se até que ocorre a maturação e fusão da PC com cessação de crescimento.

Ao contrário, do crescimento intrauterino (independente da ação da HC) a HC e o IGF1 são fundamentais para o crescimento pós natal (Nilsson, Marino et al. 2005). As principais hormonas reguladoras do crescimento ósseo nesta fase são a HC, a IGF1, as Hormonas Tiroideias (T3 e T4) e os GC (Nilsson, Marino et al. 2005).

Durante a puberdade o aumento da velocidade de crescimento depende fundamentalmente do eixo hormonal gonadotrófico que o estimula atuando diretamente sobre a PC, modelando a secreção de HC. De facto, verifica-se uma ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal com aumento da libertação da hormona folículo-estimulante - FSH e lúteo-estimulante -LH, das hormonas sexuais (estrogénios e androgénios), de esteroides da suprarrenal (Juul 2001) e também um aumento substancial dos níveis de HC e IGF-1 (Juul 2001).

Por tal o maior impacto condicionado pelas doenças crónicas no crescimento será nos primeiros anos de vida e na puberdade, períodos de maior crescimento longitudinal. A ocorrência mais tardia do pico pubertário nas doenças crónicas é também um fator contributivo pelo défice estatural.

Eixo HC - IGF-1

A HC é produzida na hipófise e atua diretamente na PC, estimulando a diferenciação de células estaminais em condrócitos. Por outro lado a HC amplifica a produção local de IGF-1 que promove a expansão clonal dos condrócitos e a sua diferenciação sendo este processo determinante na velocidade de crescimento (Nilsson and Baron 2005; De Luca 2006).

É no eixo HC – IGF sistémico, que atuam os fatores que exercem as suas funções no crescimento, através da regulação hipotalâmica pela hormona libertadora de HC, que é estimuladora e pela somatostatina inibidora. Esses fatores são a tiroxina, a glicagina, dopamina, hormonas sexuais e hexapéptidos sintéticos (van der Eerden, Karperien et al. 2003).

A HC exerce as suas funções mediante a sua ligação ao recetor específico (RHC), que é membro da família dos recetores das citoquinas. A ligação HC-RHC leva a alteração conformacional do recetor a fim de permitir a fosforilação dos hemi recetores e conseqüentemente das proteínas responsáveis pela sinalização intracelular. As tirosina-cinases Janus Kinase - Jak-2 sofrem assim fosforilação e são ativadas, formando locais de ligação para outras moléculas sinalizadas, como as proteínas de transdução e ativação de transcrição - STATs, as proteínas mitogénicas - MAPK e cinase do inositoltrifosfato - PI3K (O'Connor, McCusker et al. 2008).

As STATs têm um importante papel na transdução do sinal e na relação da progressão celular e apoptose (Bromberg 2002). São proteínas intercelulares recrutadas pelas JAKs fosforiladas e que após fosforilação se libertam no citoplasma, formando dímeros que vão atuar no núcleo, iniciando a transcrição génica (Levy and Darnell 2002; Levy and Lee 2002; Calo, Migliavacca et al. 2003).

A fosforilação das STATs é importante nas ações somatotróficas da HC, pois participam na regulação da IGF-1 e da IGFP-3 (Tan and Rabkin 2005).

As IGFs (IGF-1 e IGF-2) assim denominadas pelas suas semelhanças estruturais e funcionais com a insulina, são fatores de crescimento com ação endócrina, parácrina e autócrina e são encontrados em circulação como complexos ternários, sendo o mais estável, formado com a proteína transportadora - IGFBP-3 e uma subunidade ácido lábil - SAL (Firth and Baxter 2002). Os recetores de IGFs podem ser do tipo 1 (IGF-1R) e do tipo 2 (IGF-2R). O IGF-1R apresenta afinidade para o IGF 1 e 2 e apesar de ter sítios de ligação distintos é através deste recetor que são mediados a maioria das ações conhecidas das IGFs. O papel do IGF-2R não está completamente esclarecido. Assim, as IGFs podem ainda interagir com os recetores de insulina embora com menos afinidade.

As IGFBPs têm como função aumentar a semi-vida das IGFs, modular a sua ação potenciando-a ou inibindo-a. Os níveis IGFBP-3 são baixos ao nascimento e aumentam durante a infância, atingindo níveis máximos na puberdade. Pensa-se que tem ação independente na regulação do crescimento celular (Kiepe, Ulinski et al. 2002). A sua acção biológica é complexa, uma vez que se demonstrou que a IGFBP-3 pode inibir ou potenciar a proliferação dos condrócitos induzida pelo IGF-1 (Kiepe, Ulinski et al. 2002). Em relação à IGFBP-5, demonstrou-se ter um papel potenciador na proliferação dos condrócitos e na diferenciação dos osteoblastos (Kiepe, Ciarmatori et al. 2005; Kiepe, Ciarmatori et al. 2006).

Hormonas sexuais

As Hormonas sexuais (estrogénios e androgénios) têm um papel essencial no crescimento longitudinal, exercendo efeitos diretos na placa de crescimento (Vanderschueren, Vandenput et al. 2004). Numerosos estudos mostram a presença de recetores dos androgénios - RA e de ambos os recetores dos estrogénios - ER α e ER β na PC em animais e humanos, através dos quais estas hormonas atuam no controlo da aceleração e fusão da placa (Juul 2001; Vanderschueren, Vandenput et al. 2004). Androgénios não aromatizados como a dihidrotestosterona têm mostrado em estudos experimentais ação reguladora nos condrócitos da PC, por promoverem a síntese local do IGF1 e aumentar a expressão do seu recetor (Krohn, Haffner et al. 2003). De notar que os estrogénios têm um efeito bifásico na PC, estimulando a expressão genica de forma a aumentar a secreção da HC e a proliferação e expansão dos condrócitos quando em baixas doses; em altas concentrações, acarretam efeitos opostos, induzindo a apoptose dos condrócitos e a ossificação com conseqüente fusão da PC (Juul 2001; Nilsson, Marino et al. 2005).

1.3. Crescimento de Recuperação (Catch-up Growth)

1.3.1. Aspectos Teóricos do Crescimento de Recuperação

O termo Crescimento de Recuperação ou “catch – up growth” foi introduzido por Prader et al, em 1963, embora este fenómeno já tivesse sido reconhecido em estudos animais desde o início do século XX (Boersma and Wit 1997) para descrever o fenómeno pelo qual, a velocidade de crescimento longitudinal, transitoriamente fica acima dos limites estatísticos da normalidade para uma determinada idade e estado de maturação, após a remoção de uma condição inibitória do crescimento.

O mesmo fenómeno foi também demonstrado em crianças (Tanner 1981) portadoras de uma grande variedade de condições patológicas como má-nutrição, doenças endócrinas, doenças inflamatórias e tratadas com GC (Rivkees, Bode et al. 1988; Boersma and Wit 1997).

Verifica-se assim, que de forma variável, atendendo à idade de início e gravidade da doença, bem como a comorbilidades associadas, à melhoria ou remissão, se associa em parte, um ganho estatural acima do expectável, a traduzir o fenómeno de recuperação, permitindo a normalização da curva do crescimento. Nas crianças com doenças crónicas mais graves e de início precoce, o atraso estatural é mais acentuado e o pico pubertário mais tardio, resultando num défice severo da estatura final. No geral, o crescimento de recuperação tende a ser incompleto não sendo atingida na idade adulta a estatura geneticamente determinada (Rivkees, Bode et al. 1988).

O crescimento da recuperação pode processar-se de três formas distintas (Largo 1993):

1. Após suspensão do estímulo inibitório, a velocidade de crescimento aumenta de tal forma que o atraso verificado desaparece rapidamente atingindo-se o canal de crescimento prévio à nóxia (Tipo A)

2. O atraso de crescimento e do desenvolvimento somático persistem por algum tempo, após a cessação da causa inibitória, mas o crescimento prolonga-se por mais tempo (Tipo B)
3. A velocidade de crescimento aumenta transitoriamente e por período mais prolongado, após cessação do estímulo nóxico (Tipo C)

O crescimento de recuperação não traduz um crescimento compensatório, uma vez que, este ocorre após perda de massa tecidual e é controlado por um simples mecanismo de “feedback”. O mecanismo responsável pelo catch-up deve antecipar a perda de massa potencial e não pode ser explicado desta forma (Williams 1981).

Para objetivar o mecanismo do crescimento de recuperação, é necessário ter em conta os canais de percentil para os diversos grupos etários usados na previsibilidade da evolução do crescimento estato-ponderal (Waddington 1959; Boersma and Wit 1997). O crescimento de recuperação é mais facilmente identificável no período pré pubertário, fase na qual o canal de percentil é facilmente reconhecido. Na puberdade pode ser confundido com o pico de crescimento inerente a esta fase.

1.3.2. Hipóteses Fisiopatológicas: modelos e mecanismos prováveis

Os mecanismos subjacentes ao crescimento de recuperação ainda não estão claramente identificados.

Várias hipóteses têm sido formuladas embora pouco consistentes ou convincentes. Um mecanismo Neuroendócrino (Tanner 1963; Tanner 1963) atribuía ao Sistema Nervoso Central o papel de um somatostato que ao comparar a estatura apresentada pelo indivíduo com aquela que deveria ter por determinação genética, modificava a velocidade de crescimento, em função do desvio encontrado, normalizando-o por um verdadeiro mecanismo de “feedback”.

Uma outra hipótese assentando num mecanismo intrínseco à PC, surgiu posteriormente, apoiada em alguns estudos experimentais (Baron, Klein et al. 1994). De facto, observaram in vivo que a administração de corticoide numa única PC suprimia o crescimento apenas nesse local contrariando assim a hipótese neuroendócrina e sugerindo que os fatores sistémicos só atuariam como permissivos.

Atualmente, pensa-se que o fenómeno de “catch-up growth”, está intimamente relacionado com o processo de senescência da cartilagem de crescimento (Gafni, Weise et al. 2001; Nilsson and Baron 2005; Nilsson, Mitchum et al. 2005). Neste processo a PC segue uma série de alterações estruturais, normalmente programadas que ocorrem durante o crescimento: diminuição da altura total da placa, diminuição do estrato hipertrófico e do tamanho dos condrócitos hipertróficos terminais e aumento da sua apoptose.

Com o aumento da idade, o processo de senescência traduz-se por uma diminuição da velocidade de crescimento, diminuição da altura da PC e da atividade celular de cada zona estrutural e pela diminuição no ritmo de deposição óssea metafisária (Nilsson and Baron 2005; Nilsson, Mitchum et al. 2005). No fenómeno de “catch-up growth” parece assim existir um atraso neste processo de senescência. Esta hipótese foi no entanto apenas estudada em modelos animais (Gafni, Weise et al. 2001; Nilsson and Baron 2005) dadas as limitações da sua validação em modelos humanos.

A avaliação de idade óssea radiográfica pode ser um método indireto, na criança, para avaliação da PC senescente, uma vez que, é determinada pela espessura das bandas radiolucidas entre as epífises e as metáfises, determinando em parte a altura da placa de crescimento (Weise, De-Levi et al. 2001). A ideia de que a senescência da cartilagem parece depender diretamente da proliferação celular sugere pois, uma explicação plausível para a sustentabilidade deste mecanismo (Weise, Flor et al. 2004), sabendo que o atraso na idade óssea está associado a

um potencial remanescente do crescimento linear e o inverso se verifica perante uma idade óssea avançada (Preece 1988).

Se o “catch-up growth” nas crianças resultar de um atraso na senescência da PC e se idade óssea for um marcador da senescência, então poderá haver uma associação entre o crescimento de recuperação e o atraso da idade óssea. De facto, uma idade óssea atrasada é observada em múltiplas situações patológicas que alteram o crescimento (De Luca and Baron 1999).

No futuro, o aumento da resolução nas técnicas de diagnóstico imagiológico poderá permitir a avaliação dos marcadores histológicos de senescência da PC em humanos. Atualmente a extrapolação dos estudos experimentais em modelos animais facultam-nos de forma indireta estas hipóteses nas crianças (Emons, Boersma et al. 2005).

2. Placa de Crescimento

A placa de crescimento é uma estrutura cartilágnea, altamente organizada, que se encontra junto das extremidades dos ossos longos e vértebras (Kronenberg 2003). É responsável pelo crescimento longitudinal do osso, através de um processo denominado ossificação endocondral, no qual a matriz cartilágnea é substituída de forma contínua e coordenada por tecido ósseo (Hunziker 1994; Mackie, Ahmed et al. 2008).

2.1. Organização estrutural e funcional

A cartilagem de crescimento é um tecido avascular, sem terminações nervosas, cujo componente celular são os condrócitos produtores de matriz intercelular que os rodeia (fundamentalmente colagénio e proteoglicanos) (Ballock and O’Keefe 2003). Os condrócitos agrupam-se em colunas paralelas ao eixo longitudinal do osso, passando por um processo de diferenciação e maturação, mantendo a sua localização espacial fixa (Hunziker and Schenk 1989).

A cartilagem de crescimento apresenta 3 zonas distintas, quer pela sua morfologia quer pela sua função.

a. Zona de cartilagem de repouso

Formada por condrócitos pequenos, redondos, sem atividade proliferativa, isolados ou em pequenos grupos na matriz cartilaginosa densa. Atuam como células mãe, e encarregam-se do alinhamento dos condrócitos em colunas paralelas ao eixo longitudinal do osso nos estratos superiores, provavelmente por segregarem um fator de orientação na placa de crescimento (Abad, Meyers et al. 2002).

b. Zona de cartilagem proliferativa

Formada por condrócitos planos, que se dividem rapidamente em colunas paralelas ao eixo longitudinal do osso. Após o final da divisão adquirem características morfológicas intermédias entre proliferativas e hipertróficas – zona de transição (Hunziker and Schenk 1989).

c. Zona de cartilagem hipertrófica

Os condrócitos aumentam de volume com o eixo maior paralelo ao eixo longitudinal do osso. A mineralização ocorre na parte mais inferior do estrato hipertrófico (Breur, Turgai et al. 1994), refletindo o aumento na produção de matriz óssea (Buckwalter and Rosenberg 1986).

A PC é uma estrutura dinâmica com dois vetores interagindo de forma equilibrada, isto é, formando nova cartilagem no extremo epifisário e deposição de novo osso no extremo metafisário da placa (Hunziker 1994). A taxa de crescimento longitudinal do osso é determinada pela complexa interação da cinética proliferativa, da síntese da matriz e pelo aumento de volume dos condrócitos hipertróficos (Breur, VanEnkevort et al. 1991).

Os mecanismos reguladores destes processos não estão ainda completamente estabelecidos, sendo extremamente sensíveis a fatores externos capazes de alterar a sua modelação (MacRae, Farquharson et al. 2006).

Os condrócitos hipertróficos segregam grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular como colagénio tipo X, osteonectina e condrocalcina e pequenas quantidades de colagénio tipo II (Farnum and Wilsman 1987; Hunziker, Schenk et al. 1987).

A matriz dos septos longitudinais da zona hipertrófica mineraliza pela formação de cristais de fosfato de cálcio e deposição de hidroxiapatite (Mackie, Thesleff et al. 1987) e os condrócitos entram na zona terminal, sendo a matriz reabsorvida durante a invasão vascular e dos precursores dos osteoblastos e osteoclastos (Farnum and Wilsman 1987).

O destino dos condrócitos terminais diferenciados parece ser o da apoptose e autofagia, contudo a transdiferenciação dos condrócitos no fenótipo osteogénico não está ainda estabelecido (Shapiro, Adams et al. 2005).

Esta zona é caracterizada por aumento da concentração de cálcio intracelular, essencial para a produção de vesículas de matriz, pequenas partículas rodeadas por membranas produzidas pelos condrócitos e que contêm grandes quantidades de anexinas, que medeiam o transporte de cálcio para o interior das vesículas (Anderson 2003; Wang, Xu et al. 2003). As vesículas segregam fosfato de cálcio, hidroxiapatite, e metaloproteínases da matriz (MMPs) resultando na mineralização das vesículas e da matriz envolvente. Este processo em combinação com a baixa tensão do O₂, atrai os vasos sanguíneos da esponjosa primária subjacente (Schipani, Ryan et al. 2001). Subsequentemente os condrócitos mineralizados, programam a sua morte (apoptose) deixando lugar para nova formação óssea.

O processo apoptótico é entre outros fatores, regulado pelos altos níveis de cálcio intra-celulares (ativação de proteases, lipases e nucleases), ácido retinóico e Vitamina D (Boyan, Sylvia et al. 2001; Maeda, Dean et al. 2001; Wang, Xu et al. 2003). A deficiência em Vitamina D (raquitismo) está associada a falência da calcificação da placa de crescimento, vascularização e diminuição da formação óssea (Lin, Amizuka et al. 2002).

Os condrócitos nos septos longitudinais e transversais são reabsorvidos por condroblastos e osteoclastos da esponjosa primária subjacente. Simultaneamente, os osteoblastos entram na área para formar novo osso trabecular metafisário (Lewinson and Silbermann 1992). A combinação entre a proliferação condrocitária e o alongamento dos condrócitos maduros na zona hipertrófica e a produção de MEC são os maiores contributos para o crescimento osseo longitudinal (Breur, VanEnkevort et al. 1991; van der Eerden, Karperien et al. 2003).

Proteínas da matriz extra-celular

A matriz extra-celular que rodeia os condrócitos é formada por moléculas, enzimas remodeladoras e vários fatores de crescimento. As principais moléculas da matriz consistem nos colagénios do tipo II, IX e X, expressos predominantemente nas zonas proliferativas, prehipertróficas e hipertrófica (colagénio X) da PC; têm também um papel essencial no sequestro de vários fatores de crescimento que envolvem a regulação da proliferação e diferenciação dos condrócitos (Horton, Machado et al. 1993). As mutações genéticas destas moléculas podem associar-se a alteração da matriz cartiláginea (displasias espondiloepifisárias, displasia epifisária múltipla, etc.) associadas a baixa estatura (Spranger, Menger et al. 1994).

As interações entre a MEC e as respostas celulares no condrócito são feitas através de recetores de adesão da superfície da célula conhecidos por integrinas. Elas medeiam o acoplamento dos condrócitos

nas macromoléculas da MEC envolvente, aumentando a integridade da placa de crescimento (Ruoslahti 1991).

As metaloproteinases (MMP) são enzimas remodeladoras da matriz que desempenham um papel fundamental na remodelação e degradação da MEC, na preservação da integridade da matriz e início da angiogénese (Hutchings, Ortega et al. 2003; Ortega, Behonick et al. 2003).

A MMP-13 (colagenase – 3), tem mostrado ser crucial na remodelação da matriz na zona de transição da PC e a sua inibição impede a degradação do colagénio II (predominante na zona proliferativa) e suprime a expressão do colagénio X (o colagénio predominante na zona hipertrófica) (Wu, Tchetina et al. 2002).

O papel da MEC parece ser crucial na integridade da cartilagem e no normal crescimento linear, mas a interação entre os colagénios, MMPs, integrinas e a variedade de fatores de crescimento na MEC, ainda estão longe de ser compreendidos.

2.2. Regulação Sistémica e Local

2.2.1. Regulação Hormonal

As principais hormonas que regulam o crescimento ósseo na criança são a HC, a IGF-1, as Hormonas Tiróideas (T₃ e T₄) e os GC (van der Eerden, Karperien et al. 2003). Na puberdade os esteróides sexuais (androgénios e estrogénios) contribuem largamente para este processo (Nilsson, Marino et al. 2005; Phillip and Lazar 2005).

A HC é um importante modulador do crescimento longitudinal do osso e conjuntamente com a IGF-1 parece ter um papel chave na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-placa de crescimento (van der Eerden, Karperien et al. 2003).

A secreção da HC pela hipófise está intimamente controlada pelo GHRH (estimuladora) e pela somatostatina (inibidora), ambas libertadas pelo hipotálamo.

A HC atua no crescimento, de forma direta (Isaksson, Jansson et al. 1982) e indireta através da IGF-I e IGF-II. A IGF I é um ligando com função contínua durante o desenvolvimento e idade adulta (van der Eerden, Karperien et al. 2003). A IGF II é essencial no desenvolvimento embrionário, sendo a sua ação menos clara no período pós-natal devido a diferenças da expressão deste mediador no osso, nas diferentes espécies (Le Roith, Bondy et al. 2001; Le Roith, Scavo et al. 2001).

Vários estudos têm vindo a contrariar a hipótese da somatomedina, na qual a ação da HC se atribuía à estimulação da síntese de IGF-1 no fígado, que por sua vez ativava a proliferação dos condrócitos na PC (Daughaday 2000). Demonstrou-se que a injeção local de HC ou IGF-1 (tíbia de rato) estimulava o crescimento ósseo, de forma significativa (Isaksson, Jansson et al. 1982; Isgaard, Nilsson et al. 1986), nomeadamente através do aumento da expressão de IGF-1 pelos condrócitos (Salmon and Burkhalter 1997). Isaksson e colaboradores demonstraram também que a HC atua diretamente na zona de repouso da PC, aumentando a produção local de IGF-1 e estimulando a expansão e proliferação dos condrócitos de forma autócrina / parácrina (Isaksson, Ohlsson et al. 1991). A IGF-I foi detetada em todas as zonas da PC com mais expressividade na camada proliferativa e prehipertrófica (Yakar, Rosen et al. 2002). Recetores da HC (RHC) foram também identificados nos condrócitos na PC, apoiando o efeito direto da HC a este nível. (Gevers, van der Eerden et al. 2002).

No que concerne às Hormonas Tiroideias verifica-se que tanto a T₃ quanto o seu precursor T₄, são essenciais para a normal maturação do osso, apresentando importante ação na proliferação, diferenciação e invasão vascular na PC (van der Eerden, Karperien et al. 2003). Alterações na homeostasia destas hormonas relacionam-se com atraso severo do crescimento, no caso de hipotiroidismo. Em situações de hipertiroidismo, apesar do aumento da velocidade de crescimento, verifica-se fusão prematura da PC, resultando em pequena estatura final (Rivkees, Bode et al. 1988; Segni, Leonardi et al. 1999).

Os efeitos das hormonas tiroideias no crescimento longitudinal podem ser diretos e indiretos. Estas hormonas atuam indiretamente, por exemplo, através do aumento da estimulação da secreção de HC. Atuam diretamente através do estímulo para recrutamento de células da zona germinativa para a zona proliferativa da PC facilitando a diferenciação dos condrócitos (Wakita, Izumi et al. 1998; Robson, Siebler et al. 2002).

Além de influenciarem a secreção de HC, as hormonas tiroideias, sobretudo a T₃, interagem com o eixo HC-IGF-1 ao nível da PC, verificando-se que aumentam a expressão de ARNm IGF-1 (Ohlsson, Nilsson et al. 1992). Pensa-se que também possam regular a expressão de RHC na PC (Gevers, van der Eerden et al. 2002).

Em relação aos GC (endógenos e exógenos), verifica-se que levam a várias complicações na criança, entre as quais diminuição da massa óssea e atraso no crescimento, como acontece em determinadas doenças endócrinas ou quando usados cronicamente em várias patologias, como no caso da AIJ, asma crónica, pós-transplante renal entre outras (Travis, Chesney et al. 1978; Oberger, Engstrom et al. 1990; Danes and Agusti 2000; Gradman and Wolthers 2006). Os GC levam à supressão do crescimento através de modificações no eixo HC-IGF-1 a vários níveis: além de inibirem a libertação de HC pela hipófise, reduzem o IGF-1, o RHC, e o IGF-IR na PC e inibem a síntese basal de DNA pelos condrócitos induzida pela IGF-1 (Siebler, Robson et al. 2001; Smink, Buchholz et al. 2003).

A supressão da IGFBP-5, importante mediador mitogénico da IGF-1, e o aumento de IGFBP-3, potencial inibidor do crescimento, foram também relacionadas com os GC, especialmente com a dexametasona, à qual também se atribui a diminuição da expressão de RHC e HCBP na PC (Koedam, Hoogerbrugge et al. 2000).

Os GC podem ainda contribuir para o controlo dos níveis de T₃ na PC, sendo assim importante reconhecer que não atuam apenas através

do eixo HC-IGF-1, mas também através da interação com outras vias moduladoras do crescimento (van der Eerden, Karperien et al. 2003).

As hormonas esteroides são essenciais ao crescimento longitudinal, sobretudo na puberdade. Os estrogénios parecem ter efeitos diretos nos condrócitos através dos recetores α/β na PC. Em baixos níveis têm efeito promotor do crescimento atuando sobre o eixo HC-IGF1. Por outro lado, quando em níveis elevados, os estrogénios têm efeito inibidor do crescimento longitudinal por promoverem a fusão da PC, provavelmente pela paragem da proliferação dos condrócitos. No entanto o papel exato destas hormonas na diferenciação terminal e proliferação dos condrócitos não está claramente estabelecido (Juul 2001; Weise, De-Levi et al. 2001).

Os androgénios também têm um importante papel na modulação do crescimento pubertário. Estudos nos quais foram administrados androgénios não-aromatizáveis a rapazes com atraso de crescimento determinaram que o crescimento longitudinal aumenta significativamente sem aumento da idade óssea, sugerindo que os androgénios podem estimulá-lo diretamente, mas não são capazes por si sós de promover a maturação esquelética e a mineralização óssea (Zung, Phillip et al. 1999). Verifica-se que estas hormonas podem aumentar os níveis de IGF-1 e a expressão de IGF-IR na PC (Phillip, Maor et al. 2001). A demonstração na PC de recetores de alta afinidade para os androgénios é também a favor da sua ação direta no crescimento (van der Eerden, van Til et al. 2002; Nilsson, Chrysis et al. 2003).

2.2.2 Regulação local

Vários fatores de crescimento tem sido implicados na regulação local do crescimento da PC, como verificado em inúmeros estudos experimentais (Kronenberg 2003). Além da IGF-1, os fatores de crescimento local identificados como de maior importância neste processo são: Ihh (Indian hedgehog), o PTHrP, FGF e BMPs, VEGF

(moléculas de ativação ou sinal). Outros fatores como metabolitos da vitamina D, retinóides, colesterol, lectina e condromulina, parecem contribuir para a regulação local de crescimento ósseo na placa de crescimento (De Luca, Uyeda et al. 2000; De Luca, Barnes et al. 2001; Boyan, Sylvia et al. 2002; Rosado, Schwartz et al. 2002; Schwartz, Ehland et al. 2002; van der Eerden, Karperien et al. 2003; Wu and De Luca 2004; Wu, Palese et al. 2004; Nilsson, Marino et al. 2005; Wu and De Luca 2006; Wu, Yoshiko et al. 2006; Wu, Flint et al. 2007).

As BMPs (2, 4 e 6) contribuem para a homeostasia esquelética induzindo a diferenciação e maturação de células osteoblásticas (Hughes, Collyer et al. 1995) e aumentando secundariamente a osteoclastogênese, induzindo assim a ossificação endocondral (Abe. 2000). Incrementam também a proliferação, maturação e apoptose do condrócito (Anderson, Hodges et al. 2000), aumentando a expressão do colagénio II e X (De Luca, Barnes et al. 2001). As BMPs aumentam os níveis de ARNm IGFI e II em culturas de osteoblastos, aumentando a sua diferenciação e função (Canalis and Gabbitas 1994). Regulam também os níveis de IGFBPs nas células esqueléticas (Canalis, Economides et al. 2003).

O VEGF importante fator de crescimento para as células endoteliais expressa-se nos condrocitos hipertróficos como promotor da angiogénese. Atua na fase final da ossificação endocondral induzindo a diferenciação terminal dos condrocitos, invasão vascular da cartilagem, apoptose e osteogénese (Gerber, Vu et al. 1999).

Evidências experimentais mostram, no entanto, que existe uma interação entre a regulação hormonal e os fatores locais na regulação da PC (van der Eerden, Karperien et al. 2003). Recetores na PC para a HC, T3, T4, GC e hormonas sexuais, indicam que estas também atuam diretamente, influenciando a expressão e/ou a atividade de fatores de crescimento locais como a PTHrP, BMPs FCFs e VEG, entre outros (Parker, Hegde et al. 2007; Lui, Andrade et al. 2010; Spath, Andrade et al. 2011).

Os mecanismos moleculares subjacentes ao controlo da atividade da PC são ainda maioritariamente desconhecidos.

Figura 1. Regulação da placa de crescimento

Hormonas: :GH / IGFs, PTH / Vitamina D, T₃ / T₄, Hormonas Sexuais, Glucocorticóides
Factores Locais: IGF-I, FGF, Ihh, BMP 2-4-7, PTHrP, TGFβ2, VEGF
Outros factores locais: Condromodulina I, Leptina, Integrinas, Prostaglandinas



- Osso Epifisário

- Células estaminais

- Condrócitos Proliferativos

- Condrócitos pré-Hipertrofos

- Condrócitos Hipertrofos

- Osso Metafisário

2.3. Placa de Crescimento na Doença Crónica

A interação complexa dos sinais moleculares envolvidos na condrogénese da PC, está frequentemente desregulada na Doença Crónica, traduzindo-se por alterações do normal crescimento longitudinal (De Luca 2006).

O processo inflamatório, como acontece na AIJ e DII, é principalmente mediado por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral (TNF α) e interleucina 6 (IL6), cujos efeitos inibitórios na dinâmica do crescimento do condrócito articular tem sido demonstrada (MacRae, Farquharson et al. 2006; MacRae, Wong et al. 2006; Wong, Macrae et al. 2006).

Os efeitos destas citocinas a nível da PC não são suficientemente conhecidos. Alguns estudos prévios mostraram que concentrações elevadas de IL1 e TNF α , inibiam a diferenciação celular e induziam a apoptose dos condrócitos a nível da PC, e que a IL6 não parecia afetar a atividade celular e o crescimento (Horan, Dean et al. 1996; Martensson, Chrysis et al. 2004). Outros estudos sugerem que a IL6, a IL1 e o TNF α , inibem a condrogénese e o crescimento longitudinal no osso, por ações diretas na PC ou por reduzirem os efeitos sistémicos da IGF-1. Num modelo experimental de DII, as citocinas pareciam inibir o crescimento através de mecanismos mediados pela IGF-1 (Ballinger, Azooz et al. 2000). A morfologia da PC mostrava aumento da zona de repouso e diminuição da proliferativa e hipertrófica, num modelo experimental de colite (Koniaris, Fisher et al. 1997).

O deficit nutricional, quer seja por má-nutrição ou por má-absorção, diminui o crescimento estatural, por afetação do eixo HC-IGF-1, do qual resulta diminuição da síntese de HC e da sensibilidade hepática da HC e da IGF-1 circulante (Lowe, Adamo et al. 1989; Lowe, Adamo et al. 1989).

A nível da PC evidências experimentais mostraram diminuição marcada da altura total da Placa e diminuição do número e tamanho dos condrócitos em todas as zonas celulares com uma redução no crescimento longitudinal de cerca de 30% nos animais com restrição dietética, em relação aos controlos (Farnum, Lee et al. 2003).

O hipocrescimento, na doença renal crónica, tem sido amplamente investigado sobretudo em modelos experimentais de uremia

(Hanna, Santos et al. 1995; Cobo, Lopez et al. 1999; Fernandez-Fuente, Santos et al. 2004; Santos, Carbajo-Perez et al. 2005). As alterações na morfologia da PC têm mostrado diferentes resultados nos vários estudos, com aumento marcado na altura da placa, sobretudo à custa da camada hipertrófica (Cobo, Carbajo et al. 1996; Fernandez-Fuente, Santos et al. 2004), diminuição da altura da PC (Sanchez, Salusky et al. 1998) ou altura idêntica (Sanchez and He 2003; Sanchez and He 2004) relativamente aos controlos. Esta discrepância nos resultados pode ser devida ao grau de uremia e duração da doença renal ou ao grau de hiperparatiroidismo secundário (Sanchez, Salusky et al. 1998).

Um achado convincente para o aumento da PC nos ratos urémicos, parece dever-se à expansão da zona hipertrófica com alteração da sua normal organização espacial, sobretudo a nível da união osteocondral (Carbajo, Lopez et al. 2001). A expressão do recetor da HC e do IGF está visivelmente reduzida, traduzindo uma menor proliferação dos condrócitos (Hanna, Santos et al. 1995; Sanchez and He 2002). Estas alterações morfológicas associam-se a uma menor remodelação e aposição óssea e, portanto, menor ossificação endocondral (Santos, Fernandez Fuente et al. 2003).

Os corticóides ministrados por via sistémica reduzem a altura total da PC, atrasando o crescimento. Morfologicamente verifica-se diminuição do número de condrócitos proliferativos e aumento da apoptose dos condrócitos hipertróficos (Chrysis, Ritzen et al. 2003; Smink, Buchholz et al. 2003; Smink, Gresnigt et al. 2003). O efeito apoptótico dos corticóides na PC é corroborado pelo aumento de expressão de proteínas apoptóticas, como a caspase -3 (Chrysis, Ritzen et al. 2003) e diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Mocetti, Silvestrini et al. 2001).

As alterações no eixo HC-IGF1 parecem ser o principal mecanismo subjacente à falência de crescimento estatural na criança pelos efeitos diretos da HC nos condrócitos e indiretos, através de modulação do

IGF-1. Em relação às alterações induzidas pela doença crónica na PC, pela afetação do eixo HC-IGF-1, estas parecem dever-se aos efeitos diretos da HC, alterando a proliferação dos condrócitos (Hunziker 1994), e aos efeitos indiretos, através de modulação do IGF1, alterando a proliferação e a hipertrofia (Wang, Zhou et al. 1999).

Sumariamente, os mecanismos subjacentes ao hipocrescimento na doença crónica e respetivos efeitos nos processos celulares de condrogénese e ossificação na PC, estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Mecanismos subjacentes ao atraso do crescimento das doenças crónicas e os seus efeitos nos processos celulares da condrogénese e ossificação da PC (adaptado de (De Luca 2006)

	Condrogénese			
	Proliferação	Hipertrofia	Apoptose	Ossificação
IL-6	(-)*	(-)*		
IL1, TNF	-		+	
Défice nutricional	(-)*†	(-)*		
Uremia	(-)*†	(-)*		-
Acidose metabólica	(-)*†	(-)*		
Corticóide	- (-)*†	(-)*	+	

Legenda: -, inibição; +, estimulação; (-) ou (+) o efeito é indireto, mediado pela IGF1 (*) e/ou HC (†)

3. Tratamento com Hormona de Crescimento na Doença Crónica

A aplicação em idade pediátrica da H.C. tem sido amplamente expandida em crianças com diversas doenças, que de forma primária ou secundária afetam o crescimento estatural (Czernichow 2001; Jovanovic 2002; Saha, Haapasaari et al. 2004; Grote, Van Suijlekom-Smit et al. 2006).

De um modo geral, a má-nutrição, acidose metabólica, anemia, uremia e o atraso no pico pubertário podem contribuir para uma resistência combinada à HC e IGF (Simon, Prieur et al. 2007). Estudos clínicos têm mostrado um efeito benéfico do tratamento com HC em crianças com DRC (Lippe, Fine et al. 1988; Fine, Pyke-Grimm et al. 1991; Fine, Kohaut et al. 1994).

Eficácia clínica a curto e médio prazo tem sido reportada na DRC, mostrando um crescimento duas vezes superior em crianças pré-puberes tratadas com H.C. relativamente aos controlos, enquanto que o ganho ponderal foi similar nos dois grupos durante a fase pubertária, resultando num tamanho final cerca de 30% inferior às crianças com função renal normal (Haffner, Schaefer et al. 2000). A resposta ao tratamento com HC depende da duração do tratamento, tendo também mais impacto na melhoria da estatura final se utilizado na pré-puberdade (Haffner and Schaefer 2001).

O conhecido efeito anabólico da H.C. fundamenta o seu uso em crianças com doenças crónicas, nas quais processos catabólicos estão maioritariamente presentes, como por exemplo, em doenças como AIJ, FC.

Estudos na AIJ mostram que o crescimento está prejudicado não só pela inflamação, mas também pelo uso de glucocorticóides (Falcini, Taccetti et al. 1991). Estas crianças quando tratadas com HC durante dois anos apresentam aumento na velocidade de crescimento relativamente aos controlos (Bechtold, Ripperger et al. 2001).

Sabendo que o crescimento estatural depende fundamentalmente do eixo hormonal HC-IGF 1, que em doentes com patologia crónica existe uma resistência periférica parcial à ação promotora da HC, resistência à IGF1, perfil plasmático diminuído do componente secretor e alteração do padrão pulsátil da HC e uma vez que a H.C. pode atuar independentemente na placa de crescimento, aumentando a proliferação condrocitária e estimulando a produção de IGF 1 (Underwood 1999; Underwood, Backeljauw et al. 1999; Nilsson, Marino et al. 2005), a terapêutica com HC na doença crónica pode ser útil para melhorar o crescimento ósseo e até a evolução da doença (Simon, Prieur et al. 2000).

A HC, atua diretamente na PC induzindo a proliferação dos condrócitos na zona de repouso e a síntese de IGF-1 que por sua vez leva à expansão dos condrócitos proliferativos, atuando como fatores autócrinos-parácrinos (Isaksson, Lindahl et al. 1987).

Vários estudos demonstraram que a HC aumenta a expressão e proliferação dos condrócitos de forma independente (Hunziker 1994), e que a IGF-1 atua estimulando a proliferação e também a hipertrofia dos condrócitos. (Wang, Zhou et al. 1999).

II. OBJETIVOS

Objetivos Gerais

O objectivo principal deste trabalho foi o de avaliar, a nível da placa de crescimento, alterações morfológicas e moleculares ocorridas durante o crescimento de recuperação num modelo experimental de restrição dietética como estímulo nóxico, bem como a sua modulação pelo tratamento com HC.

Objetivos específicos

1. Avaliar modificações génicas e proteicas ocorridas na placa de crescimento, durante o crescimento de recuperação, nomeadamente o eixo HC-IGF-1, por técnicas de imunohistoquímica, hibridização “in situ” e PCR.

2. Avaliar o efeito da HC na potencialização do crescimento de recuperação e na modulação de eixo HC-IGF-1 ao nível da placa de crescimento

3. Estudar marcadores de apoptose, angiogénese e de remodelação da matriz durante o crescimento de recuperação

4. Avaliar o efeito da HC na modulação destes processos ao nível da placa de crescimento

III. RESULTADOS

Artigo 1

Growth cartilage expression of growth hormone / insulin-like growth factor I axis in spontaneous and growth hormone induced catch-up growth

Iva Brito^{1,2}, Helena Gil-Peña³, Inés Molinos³, Vanessa Loredó³, Tiago Henriques-Coelho^{2,4}, Alberto Caldas-Afonso^{2,4}, Fernando Santos³.

Growth Hormone & IGF Research (aceite para publicação)

1 Pediatric Rheumatology Unit, Pediatric Department, Hospital São João, Porto, Portugal

2 Faculty of Medicine, Porto, Portugal

3 Department of Pediatrics, Hospital Universitario Central de Asturias and University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain

4 Department of Pediatrics, Hospital São João, Porto, Portugal

Corresponding author:

Iva Brito

Pediatric Rheumatology Unit, Department of Pediatrics

Hospital São João

Porto, Portugal

Email: ivaobrito@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: Catch-up growth following the cessation of a growth inhibiting cause occurs in humans and animals. Although its underlying regulatory mechanisms are not well understood, current hypothesis confer an increasing importance to local factors intrinsic to the long bones' growth plate (GP).

Aim: The present study was designed to analyze the growth-hormone (GH)- insulin-like growth factor I (IGF-I) axis in the epiphyseal cartilage of young rats exhibiting catch-up growth as well as to evaluate the effect of GH treatment on this process.

Material and Methods: Female Sprague-Dawley rats were randomly grouped: controls (group C), 50% diet restriction for 3 days + refeeding (group CR); 50% diet restriction for 3 days + refeeding & GH treatment (group CRGH). Analysis of GH receptor (GHR), IGF-I, IGF-I receptor (IGF-IR) and IGF binding protein 5 (IGFBP5) expressions by real-time PCR was performed in tibial growth plates extracted at the time of catch-up growth, identified by osseous front advance greater than that of C animals.

Results: In the absence of GH treatment, catch-up growth was associated with increased IGF-I and IGFBP5 mRNA levels, without changes in GHR or IGF-IR. GH treatment maintained the overexpression of IGF-I mRNA and induced an important increase in IGF-IR expression.

Conclusions: Catch-up growth that happens after diet restriction might be related with a dual stimulating local effect of IGF-I in growth plate resulting from overexpression and increased bioavailability of IGF-I. GH treatment further enhanced expression of IGF-IR which likely resulted in a potentiation of local IGF-I actions. These findings point out to an important role of growth cartilage GH/IGF-I axis regulation in a rat model of catch-up growth.

INTRODUCTION

Longitudinal growth may be impaired in several chronic disorders like inflammatory bowel diseases, juvenile idiopathic arthritis and malnutrition as well as by exposure to some drugs. The term catch-up growth, introduced by Prader et al. [1], describes the phenomenon by which longitudinal growth velocity transiently stands above the statistical limits of normality for age and/or maturity after the removal of a growth-inhibiting condition. Catch-up growth occurs in humans and animals and its underlying pathogenic mechanism is not clear [2, 3]. A recent hypothesis proposes an intrinsic essential mechanism for catch-up growth in the long bones' growth plate [4].

Linear bone growth results from proliferation, hypertrophy and matrix production of cartilage cells in growth plate, on whose metaphyseal end, bone replaces the cartilage [5]. Growth plate of endochondral bones is comprised of cells representing various states of differentiation: the resting zone, the proliferative zone with actively dividing cells, and the hypertrophic zone with maturing cells enlarging and ultimately dying [6]. These proliferative and maturation processes are induced by numerous systemic endocrine effectors such as circulating growth hormone (GH). The effects of GH are to a great extent mediated by the actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I), a peptide growth factor produced in great abundance by hepatic tissue, source of the circulating plasma IGF-I [7], but also locally produced by chondrocytes. Likewise, growth hormone receptor (GHR) [8-10] have been localized in several regions of the growth cartilage, demonstrating that chondrocytes are capable of responding directly to GH in a paracrine way. Cellular proliferation and apoptosis are carefully coordinated processes within the growth plate. The GH axis is known to play a critical role in proliferation and IGF-I is an identified regulator of apoptosis in many tissues [11, 12]. The interplay of proliferation and apoptosis in the developing growth plate has only recently been

investigated and has focused on the hypertrophic chondrocytes which are known to undergo apoptosis [13-18].

The regulation of longitudinal growth is influenced by numerous systemic and local factors. Although the interplay among these factors is still unclear [6], GH and IGF-I are crucial. Circulating GH can act directly on growth plate stimulating the local IGF-I synthesis, which in turns induces chondrocyte expansion [19]. Additionally, there are some evidences that systemic IGF-I could also stimulate growth plate chondrocytes [20]. However, locally derived IGF-I seems to be more important in longitudinal growth than systemic IGF-I [21]. Abnormalities of the GH/IGF-I axis are one of the major determinants of growth retardation in children with chronic illnesses [22]. There are experimental and clinical evidences demonstrating important alterations in GH/IGF-I axis during chronic diseases, like chronic renal failure [23], chronic bowel inflammatory diseases [24] and juvenile idiopathic arthritis [25]. It is well known that treatment with GH potentiates catch-up growth in several conditions [5, 26]. The GH/IGF-I axis in the growth plate at the time of catch-up growth was previously implicated by Gat-Yablonski in a rodent model of food restriction [9]. Nevertheless, how catch-up growth is influenced by GH treatment is largely unknown.

A previous experimental study of our group [5] examined the pattern of catch-up growth in young rats after an inhibitory growth condition. The existence of a growth recovery implies the return to the previous growth path after noxious stimulus suppression. Our experimental model showed that growth rate acceleration inherent to a spontaneous catch-up, was associated with enhancement of proliferative activity, and specially, to an expansion of the hypertrophic zone of the cartilage. GH administration started at the time of noxious stimulus suppression, further accelerated catch-up growth velocity, this effect being likely related to a greater enlargement of the terminal chondrocyte height [5]. The study presented here used the above

mentioned animal model to determine if the ability to exhibit catch-up growth and the effect of GH treatment on this process are related to alterations in the growth plate GH-IGF-I axis modulation.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Protocol

Samples from animals used in a formerly published study were utilized [5]. Briefly, young female Sprague-Dawley rats (Harlan Iberia, Barcelona, Spain) were acclimatized to the experimental area and randomly grouped as follows: controls fed ad libitum (group C), diet restriction for 3 days + refeeding (group CR), diet restriction for 3 days + refeeding & GH treatment (group CRGH). On days 11, 12 and 13 of the protocol, groups CR y CRGH received 50% of the average daily food consumed by the same animals the previous three days. CRGH animals were treated with 3.3mg/kg/day recombinant human GH (Norditropin, Novo Nordisk Pharm, Madrid-Spain) given by intraperitoneal route from day 14 on. Untreated animals received the same volume of vehicle (saline). Rats were killed at different time points after refeeding (n= 5 rats each time). Catch-up growth, assessed by measurement of osseous front advance by calcein labeling, was found in CR and CRGH groups on day 21 (C: 164.5±7.7 µm; CR: 186.1±6.1 µm; CRGH: 201.1±4.4 µm). Therefore, samples extracted on day 21 were used for the study presented here. The study complied with current legislation on animal experiments in the European Union and was approved by our Institution Ethics Committee for Investigation with animals.

Samples

The proximal ends of both tibiae were obtained after sacrifice by exsanguination under anesthesia. The dissection of growth plate was performed with magnifying lens and a scalpel to allow removing

the adjacent bone zones accurately. The right tibiae were immediately frozen in liquid nitrogen for mRNA studies and the left tibiae were embedded in methylmethacrylate, fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA) and used for immunohistochemistry and in situ hybridization studies on growth plate as previously described [27-29].

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed in PFA-fixed frontal sections (5µm thick) of proximal tibiae, using IGF-I and IGF binding protein 5 (IGFBP5) polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) as described elsewhere [27].

***In situ* Hybridization**

IGF-I, GHR, IGF-I receptor (IGF-IR) and IGFBP-5 antisense and sense RNA probes were supplied by Genedect (Genedetect.com, Bradenton, FL, USA). The hybridization procedure was carried out as described elsewhere [27]. Two parallel sections served as negative controls. One section hybridized with a labeled sense riboprobe and a second section was incubated adding a negative control probe to the hybridization mixture. No hybridization signal was found in any of these negative controls.

Real-time PCR

mRNA was extracted from frozen tibiae samples using modified Chomczynski method [30]. RNA purity and integrity were assessed by 260/280 ratio measurement using an ultra violet spectrophotometer (Gene Quant Pro, Amersham Biosciences, GE Healthcare Spain) and an 1,5% agarose gel respectively. Samples were diluted to 1mg/ml, before reverse transcription, with a commercial kit (Qiagen Iberia, Madrid, Spain).

GHR, IGF-I, IGF-IR and IGFBP5 expressions were quantified by real-time PCR system (One-Step, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR Green (ABgene Products, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) as fluorophore and β -actin as a housekeeping gene. For all the qPCR experiments, melting curve showed a unique product that corresponded with an exclusive temperature of DNA dissociation. Oligonucleotide primer pairs were as follows: for β -actin, forward: ACCAGGGTGTGATGGTGGGTAT and reverse: CGTCCCAGTTGACAATGC; for GHR, forward: AATTAATCCAAGCCTGAGGGAAA and reverse: GGAACGACACTTGGT GAATCG; for IGF-I, forward TACCAGCTCGGCCAC AGC and reverse: GTGGGCTTGTGAAGTAAAAGC; for IGF-IR, forward: GCTGCTGGACCACAAATCG and reverse: TCGCTTCCCACACACACTTG; for IGFBP5, forward: GACCAAGGCCCTGCCGCA and reverse: CACAGTTGGGAGGTACACGGC. Primer sequences were designed with the Primer Express software (Perkin –Elmer Applied Biosystems) and synthesized by Invitrogen (Fisher-Invitrogen, Barcelona, Spain). Standard curves were obtained for each primer pair with efficiency near to 0.99. Afterwards, qPCR analysis was performed by $\Delta\Delta C_t$ values.

Statistical Analysis

Results are given as mean \pm SEM and groups were compared using one-way ANOVA. When the normality test failed, ANOVA on ranks was used. When treatments were significantly different, Dunn's test and the Holm-Sidak method were used to perform pairwise multiple comparisons. Statistical significance was set at a two-tailed value of $P < 0.05$.

RESULTS

C and CR groups

Immunohistochemical analysis

Analysis of IGF-I and IGFBP5 by immunohistochemical technique showed no variations between C and CR groups for the distribution pattern. The positive signals for both peptides were largely restrained to the hypertrophic zone (HZ) although IGF-I positive cells were found in the lower part of the proliferative zone (LPZ) only in the CR group (Figure 1.).

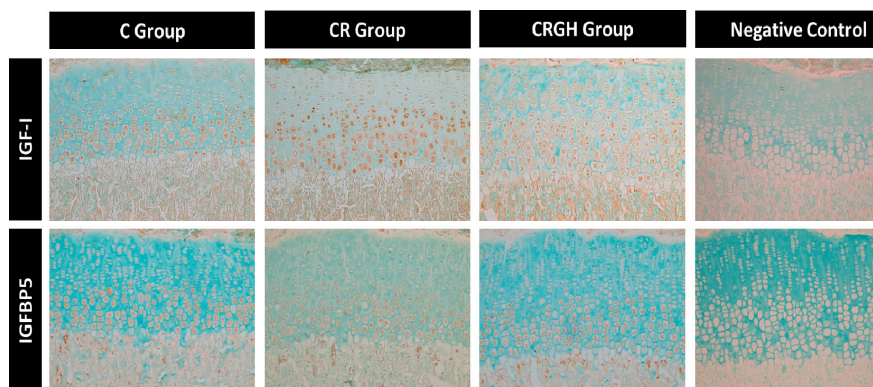


Figure 1.

Representative examples of *immunohistochemistry* for IGF-I and IGFBP5 for the three studied groups: control animals (C group), animals submitted to the noxious stimulus (CR group), and animals submitted to the noxious stimulus treated with growth hormone (CRGH group). A negative control is also presented
IGF-I: Insulin-like Growth Factor-I; IGFBP5: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5.

In situ Hybridization assay

The pattern of mRNA signaling distribution in C and CR groups for IGF-I, IGF-IR and IGFBP5 was similar to that described for the peptides. Positive cells were mostly present in the HZ stratum. Some cells sited in the LPZ were positive for IGF-I mRNA in the CR group (Figure 2). GHR mRNA was located in the entire growth plate with no differences between groups (data not shown).

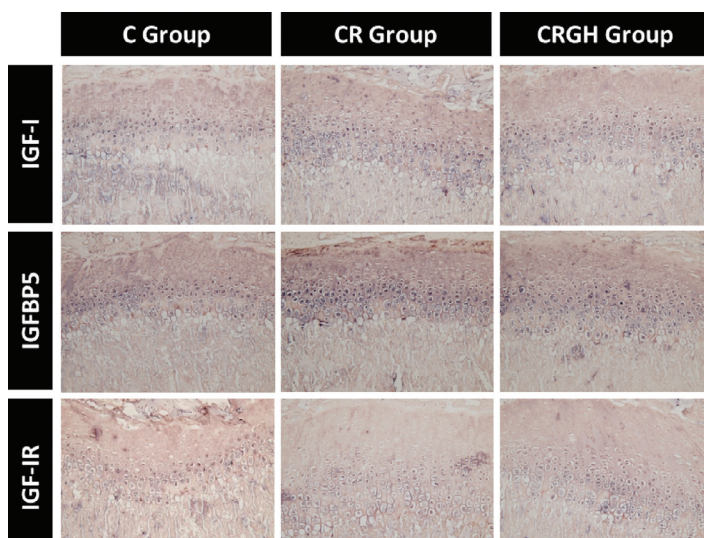


Figure 2.

Representative examples of *in situ* hybridization for IGF-I, IGFBP5 and IGF-IR mRNAs for the three studied groups: control animals (C group), animals submitted to the noxious stimulus (CR group), and animals submitted to the noxious stimulus treated with growth hormone (CRGH group). IGF-I: Insulin-like Growth Factor-I; IGFBP5: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5; IGF-IR: Insulin-like Growth Factor-I Receptor.

Real time PCR

Relative quantification of GHR and IGF-IR mRNA revealed no changes in CR group compared with C animals. However, levels of IGF-I and IGFBP5 mRNAs were higher in CR than C rats (Table 1).

Table 1. Relative fold change obtained by *real time* PCR for GHR, IGF-I, IGF-IR and IGFBP5 mRNAs in the tibial growth plate of the three groups of rats

	GHR	IGF-I	IGF-IR	IGFBP5
C	1.00 ± 0.176	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.10
CR	0.87 ± 0.116	2.32 ± 0.78 ^α	0.85 ± 0.28	1.47 ± 0.23 ^α
CRGH	0.87 ± 0.102	2.53 ± 0.57 ^α	2.34 ± 0.12 ^{α,β}	1.36 ± 0.21 ^α

Legend: C group - control animals; CR group - animals submitted to the noxious stimulus; CRGH group - animals submitted to the noxious stimulus treated with growth hormone; GHR: Growth Hormone Receptor; IGF-I: Insulin-like Growth Factor-I; IGF-IR: Insulin-like Growth Factor-I Receptor; IGFBP5: Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5. Data are mean±SEM. Superscripts α and β mean significantly different ($P < 0.05$) from C and CR group, respectively.

Effect of GH treatment

No variations were found in the distribution pattern observed by immunohistochemical or in situ hybridization assays for IGF-I, IGF-IR, GHR or IGFBP5, compared with the CR group. However, GH treatment induced a significant overexpression of IGF-IR mRNA compared with CR group (Table 1).-

DISCUSSION

Several experimental models of catch-up growth have been described, differing in the timing and nature of the noxious stimulus for growth retardation. Food restriction is a widely used model in rodents. In the present study we used catch-up growth after diet restriction during 3 days. We previously demonstrated that this period of food restriction was associated with stimulated proliferation and greater hypertrophy of growth cartilage chondrocytes, as formerly described [16]. The present study characterizes local expression of GHR, IGF-I, IGF-IR, IGFBP5 during catch-up growth phenomenon and its modulation by growth hormone treatment. Moreover, the study offers some insight into the molecular mechanisms underlying catch-up growth. Our findings indicate that IGF-I and IGFBP5 mRNAs were overexpressed in the tibial growth plates of the group of rats exhibiting catch-up growth. These results are in agreement with the findings from Gat-Yablonski et al that demonstrated that catch-up growth after 10 days of food restriction was associated with an increase in local protein levels of IGF-IR and in serum levels of IGF-I [9, 31].

It has been described that IGFBP5, enhances IGF-I-driven chondrocyte proliferation, thereby better presenting it to its receptor [32]. Delivery of IGF-I from pools of IGF-I bound to low-affinity IGFBP-5 in extracellular matrix could potentiate the binding of ligand to the IGF-IR on the cell surface, enhancing the differentiation process mediated by the IGF-I. The observed coexistent elevation of IGFBP5 and IGF-I likely facilitates bioavailability of local IGF-I [33] so that it can be hypothesized that stimulated paracrine and autocrine actions of IGF-I are linked to the morphological and dynamic changes that take place in the chondrocytes at the time of catch-up growth and to the ensuing acceleration of longitudinal growth velocity.

The present study also shows that catch-up growth was not associated with significant modifications in the pattern of expression of

GH-IGF-I growth plate axis when assessed by immunohistochemistry or *in situ* hybridization. This lack of appreciable differences in the positive signaling between C and CR groups does not invalidate the quantitative changes detected by real time PCR because immunohistochemistry and *in situ* hybridization are good techniques for exploring changes in the spatial distribution of peptides and mRNAs, respectively, but not for measuring modifications in the magnitude of expression. For RNA extraction of the growth plate, we used manual microdissection. This is a simple and reliable method that minimized the contamination from surrounding tissues that can also express genes from GH/IGF-I axis [34].

Treatment with recombinant human GH has been widely used in several pediatric diseases associated with short stature and poor growth [35]. GH effects on epiphyseal cartilage chondrocyte proliferation are still controversial. GH can act directly on growth plate by increasing chondrocyte proliferation and stimulating local production of IGF-I [36]. In the present study we demonstrated that GH treatment did not modify the overexpression of IGF-I mRNA in the growth cartilage chondrocytes associated to the spontaneous catch-up growth of CR group. By contrast, we found that GH treatment induced an important increase in the growth plate IGF-IR expression. These results reinforce the theory that therapy with GH potentiates catch-up growth by activating local IGF-I axis and support the crucial role of IGF-I locally produced in the long bones' growth plate in the postnatal growth [21].

The role of GH in the proliferation of epiphyseal cartilage chondrocytes is a matter of debate [37, 38]. The microscopic examination of the *in situ* hybridization specimens suggested that the expression of IGF-I mRNA extended to the proliferative zone in the CR and CRGH groups. These findings together with the results of the real time PCR analysis indicate that the phenomenon of catch-up growth, either spontaneous or magnified by GH treatment, is associated with local

stimulation of IGF-I in the growth plate. This is also in agreement with Isaksson et al who demonstrated that local IGF-I amplification by GH stimulates chondrocyte proliferation and hypertrophy, contributing to bone growth. [19].

In summary, the present study shows for the first time that catch-up growth that occurs after a short period of food restriction is associated with an increased expression of IGF-I and IGFBP5 in the long bones' growth plate. GH treatment preserves these changes and presumably potentiates local IGF-I actions by increasing IGF-IR expression in the chondrocytes.

REFERENCES

1. Prader, A., J.M. Tanner, and H.G. von, *Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man.* J Pediatr, 1963. **62**: p. 646-59.
2. Boersma, B. and J.M. Wit, *Catch-up growth.* Endocr Rev, 1997. **18**(5): p. 646-61.
3. Farnum, C.E., et al., *Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats.* Pediatr Res, 2003. **53**(1): p. 33-41.
4. Baron, J., et al., *Catch-up growth after glucocorticoid excess: a mechanism intrinsic to the growth plate.* Endocrinology, 1994. **135**(4): p. 1367-71.
5. Molinos, I., et al., *Catch-up growth follows an abnormal pattern in experimental renal insufficiency and growth hormone treatment normalizes it.* Kidney Int, 2006. **70**(11): p. 1955-61.
6. van der Eerden, B.C., M. Karperien, and J.M. Wit, *Systemic and local regulation of the growth plate.* Endocr Rev, 2003. **24**(6): p. 782-801.
7. Le Roith, D., et al., *The somatomedin hypothesis: 2001.* Endocr Rev, 2001. **22**(1): p. 53-74.
8. Oberbauer, A.M. and R. Peng, *Growth hormone and IGF-I stimulate cell function in distinct zones of the rat epiphyseal growth plate.* Connect Tissue Res, 1995. **31**(3): p. 189-95.
9. Gat-Yablonski, G., et al., *Nutrition-induced catch-up growth at the growth plate.* J Pediatr Endocrinol Metab, 2008. **21**(9): p. 879-93.
10. Werther, G.A., et al., *Identification of growth hormone receptors on human growth plate chondrocytes.* Acta Paediatr Suppl, 1993. **82 Suppl 391**: p. 50-3.
11. Grimberg, A. and P. Cohen, *Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis.* J Cell Physiol, 2000. **183**(1): p. 1-9.
12. Murray, S.A., et al., *IGF-1 activates p21 to inhibit UV-induced cell death.* Oncogene, 2003. **22**(11): p. 1703-11.
13. Chrysis, D., et al., *Apoptosis is developmentally regulated in rat growth plate.* Endocrine, 2002. **18**(3): p. 271-8.

14. Farnum, C.E. and N.J. Wilsman, *Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage*. *Anat Rec*, 1987. **219**(3): p. 221-32.
15. Gibson, G.J., W.J. Kohler, and M.B. Schaffler, *Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna*. *Dev Dyn*, 1995. **203**(4): p. 468-76.
16. Lewinson, D. and M. Silbermann, *Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption*. *Anat Rec*, 1992. **233**(4): p. 504-14.
17. Roach, H.I., *New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix*. *J Bone Miner Res*, 1997. **12**(5): p. 795-805.
18. Zenmyo, M., et al., *Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate*. *J Pathol*, 1996. **180**(4): p. 430-3.
19. Isaksson, O.G., J.O. Jansson, and I.A. Gause, *Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly*. *Science*, 1982. **216**(4551): p. 1237-9.
20. Reinecke, M., et al., *Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) on the expression of IGF-I messenger ribonucleic acid and peptide in rat tibial growth plate and articular chondrocytes in vivo*. *Endocrinology*, 2000. **141**(8): p. 2847-53.
21. Yakar, S., et al., *Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(6): p. 771-81.
22. De Luca, F., *Impaired growth plate chondrogenesis in children with chronic illnesses*. *Pediatr Res*, 2006. **59**(5): p. 625-9.
23. Gil-Pena, H., et al., *Alterations of growth plate and abnormal insulin-like growth factor I metabolism in growth-retarded hypokalemic rats: effect of growth hormone treatment*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. **297**(3): p. F639-45.
24. Ballinger, A., *Fundamental mechanisms of growth failure in inflammatory bowel disease*. *Horm Res*, 2002. **58 Suppl 1**: p. 7-10.
25. Tsatsoulis, A., et al., *Study of growth hormone secretion and action in growth-retarded children with juvenile chronic arthritis (JCA)*. *Growth Horm IGF Res*, 1999. **9**(2): p. 143-9.
26. Crabbe, R., et al., *Recombinant human growth hormone for children born small for gestational age: meta-analysis confirms the consistent dose-effect relationship on catch-up growth*. *J Endocrinol Invest*, 2008. **31**(4): p. 346-51.
27. Alvarez-Garcia, O., et al., *Rapamycin induces growth retardation by disrupting angiogenesis in the growth plate*. *Kidney Int*, 2010. **78**(6): p. 561-8.
28. Alvarez-Garcia, O., et al., *Rapamycin retards growth and causes marked alterations in the growth plate of young rats*. *Pediatr Nephrol*, 2007. **22**(7): p. 954-61.
29. Carbajo, E., et al., *Histologic and dynamic changes induced by chronic metabolic acidosis in the rat growth plate*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(6): p. 1228-34.
30. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(2): p. 581-5.
31. Even-Zohar, N., et al., *Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1alpha RNA levels in the growth plate*. *Bone*, 2008. **42**(3): p. 505-15.

32. Kiepe, D., et al., *Differential expression of IGF system components in proliferating vs. differentiating growth plate chondrocytes: the functional role of IGFBP-5*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(2): p. E363-71.
33. Jones, J.I. and D.R. Clemmons, *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. Endocr Rev, 1995. **16**(1): p. 3-34.
34. Parker, E.A., et al., *Spatial and temporal regulation of GH-IGF-related gene expression in growth plate cartilage*. J Endocrinol, 2007. **194**(1): p. 31-40.
35. Hindmarsh, P.C. and M.T. Dattani, *Use of growth hormone in children*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2006. **2**(5): p. 260-8.
36. Nilsson, O., et al., *Endocrine regulation of the growth plate*. Horm Res, 2005. **64**(4): p. 157-65.
37. Madsen, K., et al., *Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage*. Nature, 1983. **304**(5926): p. 545-7.
38. Hutchison, M.R., M.H. Bassett, and P.C. White, *Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone, affect growth plate chondrocyte proliferation*. Endocrinology, 2007. **148**(7): p. 3122-30.

Artigo 2

Osteoclastic activity and vascular invasion in growth plate during catch-up growth and its modulation by growth hormone administration

Iva Brito^{1,2}, Helena Gil-Peña³, Inés Molinos³, Vanessa Loredó³,
Tiago Henriques-Coelho^{2,4}, Alberto Caldas-Afonso², Fernando Santos³

Journal of Bone and Mineral Metabolism (submetido)

**1 Pediatric Rheumatology Unit, Department of Pediatrics,
Hospital São João, Porto, Portugal**

2 Department of Pediatrics, Hospital São João, Porto, Portugal

**3 Department of Pediatrics, Hospital Universitario Central de
Asturias and University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain**

4 Physiology Department, Faculty of Medicine, Porto, Portugal

Corresponding author:

Iva Brito

Pediatric Rheumatology Unit, Department of Pediatrics

Hospital São João

Porto, Portugal

Email: ivaobrito@hotmail.com

ABSTRACT

The underlying mechanisms of catch-up growth are largely unknown. The mineralization pattern, osteoclastic activity and vascular invasion at the tibial growth plate during catch-up growth and the modulation by GH administration were analyzed.

Female Sprague-Dawley rats were randomly grouped: controls (C group), 50% diet restriction for 3 days + refeeding (CR group); 50% diet restriction for 3 days + refeeding and GH treatment (CRGH group). At the time of catch-up growth, tibial sections were stained with tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) for osteoclast identification and Von Kossa for analysis of mineralization area. Collagen type X, caspase-3 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions were quantified by real-time PCR system and immunostaining for caspase-3 and VEGF was performed.

Catch-up growth secondary to food restriction was associated by up-regulation of VEGF gene expression and decreased caspase-3 mRNA levels in the growth cartilage. In this animal model of catch-up growth, administration of GH treatment resulted in additional effects such as increase of collagen X and BMP-2 mRNA levels, likely related to facilitation of the process of chondrocytes' maturation, and stimulation of the osteoclastic activity.

INTRODUCTION

Longitudinal growth may be impaired in several chronic disorders like inflammatory bowel diseases, juvenile idiopathic arthritis and malnutrition as well as by exposure to some drugs. The term catch-up growth, introduced by Prader et al. [1], describes the phenomenon by which longitudinal growth velocity transiently stands above the statistical limits of normality for age and/or maturity after the removal of a growth-inhibiting condition. Catch-up growth has been observed

in humans and animals although its underlying pathophysiological mechanism is not clear [2, 3]. A recent hypothesis proposes an intrinsic essential mechanism for catch-up growth in the long bones' growth plate [3].

Longitudinal growth occurs by endochondral bone formation which takes place at the growth plate of long bones. Growth cartilage size depends on the balance between two virtual vectors with opposite directions: one that goes from epiphysis to metaphysis and represents the production, proliferation and hypertrophy of chondrocytes and another one that goes from metaphysis to epiphysis and corresponds to the apoptosis of terminal chondrocytes [4-9], vascular invasion and replacement of cartilage by new bone [10]. This apposition bone vector reflects longitudinal growth rate. A positive correlation between longitudinal growth velocity and terminal chondrocytes' height has been described [11].

A previous study of our group [12] described the growth cartilage changes associated with catch-up growth that takes place in young rats after an inhibitory growth condition (a noxious stimulus). That experimental model showed that growth rate acceleration inherent to spontaneous catch-up is associated with enhancement of proliferative activity and expansion of the hypertrophic zone of the cartilage. It was also observed that growth hormone (GH) administration increased catch-up growth velocity, a phenomenon that to a great extent resulted from enlargement of the terminal chondrocyte height [5]. As a continuation of our previous experiment [12] we designed this study to analyze the changes in the mineralization pattern, osteoclastic activity and vascular invasion that occur at the tibial growth plate in association with catch-up growth and the effect of GH administration on these processes.

MATERIALS AND METHODS

Experimental protocol

Samples from female Sprague-Dawley rats of three weeks of age and 45 ± 5 g of weight used in a previous study were now analyzed [12]. Three groups of rats were studied: control animals fed ad libitum (group C), animals with diet restriction (group CR) and animals with diet restriction and GH treatment (group CRGH). Diet restriction consisted in administration on days 11, 12 and 13 of the protocol of the 50% of the mean amount of food consumed daily by the same animals during the 3 previous days (days 8, 9 and 10). From day 14 on, all rats were allowed to eat ad libitum. CRGH rats were treated with 3.3mg/kg/day of recombinant human GH (Norditropin, Novo Nordisk Pharma, Madrid, Spain) administered intraperitoneally from day 14 of the protocol on. Untreated animals received the same volume of vehicle (saline). Samples collected from animals killed on day 21 were used because, at that moment, the catch-up growth was demonstrated by an osseous front advance rate greater in CR and CRGH rats. Bone samples were obtained after sacrifice by exsanguination under anesthesia. Experimental conducted complied with current legislation on animal experiments in the European Union and were approved by our Institution Ethics Committee for Investigation with animals.

Samples

Proximal end of the tibiae, including the growth plate, was dissected out. The right tibiae were immediately frozen in liquid nitrogen for mRNA studies and the left tibiae were fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA), embedded in methyl methacrylate and used for immunohistochemistry and in situ hybridization studies as previously described [13].

Growth plate histology

Frontal sections (5µm thick) of proximal tibiae fixed in PFA were stained with tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) for osteoclast identification and Von Kossa stain was used for analysis of mineralization area. The number of TRAP+ cells at the vascular invasion front was measured in the metaphyseal area immediately adjacent to the growth cartilage, extending from 50 to 100 µm of the chondro-osseous union. The number of TRAP positive cells and terminal chondrocytes were counted in all sections. Six fields per section and two sections per animal and five animals per group, were measured. For each animal, osteoclastic activity was expressed as a percentage of the number of TRAP positive cells per 100 terminal chondrocytes. Mineralization of the osteochondral junction was assessed by measuring the height of the Von Kossa stained area in two slides per animal, five animals per group.

Immunohistochemistry

Immunodetection was carried out using polyclonal Caspase-3 and VEGF antibodies (Neomarkers, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) as described elsewhere [13]. Data are expressed as percentage of positive cells at whole growth cartilage, counted on two slices per animal and five animals per group.

Real-time PCR

Growth cartilage of the proximal ends of tibia samples from five rats per group, was dissected and mRNA was extracted using modified Chomczynski method [14]. The dissection method used was the same employed before in our studies, dissecting the growth plate with a scalpel and a magnifying glass, removing the adjacent

bone zones accurately [12]. RNA purity and integrity were assessed by 260/280 ratio measurement using an ultra violet spectrophotometer (Gene Quant Pro, GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) and an 1.5% agarose gel respectively. Samples were diluted to 1µg/µl, before reverse transcription, with a commercial kit (Qiagen Iberia, Madrid, Spain). Collagen type X, caspase-3 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions were quantified by real-time PCR system (One-Step, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with SYBR Green (ABgene Products, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) as fluorophore and β-actin as a housekeeping gene. Oligonucleotide primer pairs were as follows: for β-Actin, forward: ACCAGGGTGTGATGGTGGGTAT and reverse: CGTCCCAGTTGACAATGC; for collagen type X, forward: CTATAAAGGGTAAAGAGATTTCA and reverse: CTGGCTTTCCTGGAGGTCCTGA; for caspase-3, forward: TTTGAAACAAACAAAGACTAT and reverse: ATTATTATACACAAGCCCATT and for VEGF, forward: AAAGCCCATGAAGTGGTGAA and reverse TCTCAATTGGACCGCAATAG. Primer sequences were designed with the Primer Express software (Perkin –Elmer Applied Biosystems) and synthesized by Invitrogen (Fisher-Invitrogen, Barcelona, Spain).

Statistical Analysis

Results are given as mean±SEM and groups were compared using one-way ANOVA. When the normality test failed, ANOVA on ranks was used. When treatments were significantly different, Dunn's test and the Holm-Sidak method were used to perform pair wise multiple comparisons. Statistical significance was set at a two-tailed value of $P < 0.05$.

RESULTS

Data from our previous study [12] indicated that catch-up growth, as assessed by a greater osseous front advance in CR and CRGH rats (186.1 ± 6.1 and 201.1 ± 4.4 $\mu\text{m}/\text{day}$, respectively) than in C rats (164.5 ± 7.7 $\mu\text{m}/\text{day}$), was associated with stimulated chondrocyte proliferation, (C: 181 ± 14 cells/100 columns; CR: 282 ± 15 cells/100 columns; CRGH: 296 ± 12 cells/100 columns). In addition, GH treatment resulted in increase of the terminal chondrocytes' height (C: 30 ± 0 μm ; CR: 30 ± 1 μm ; CRGH: 32 ± 1 μm).

Mineralization and bone reabsorption

As graphically shown in Figure 1A, no significant differences in the longitudinal mineralization measured at the osteochondral junction were found among the three groups (C: 69.75 ± 8.51 , CR: 89.79 ± 22.82 , CRGH: 93.97 ± 14.08 μm). The group of rats treated with GH exhibited greater osteoclastic activity than the C and CR groups (29.57 ± 4.2 vs 24.94 ± 1.1 and 23.38 ± 3.5 TRAP positive cells per 100 terminal chondrocytes, in CRGH, C and CR groups, respectively) (Figure 1A). Figure 1B illustrates the microscopic images obtained by Von Kossa and TRAP techniques in representative examples from all three groups.

Figure 1A

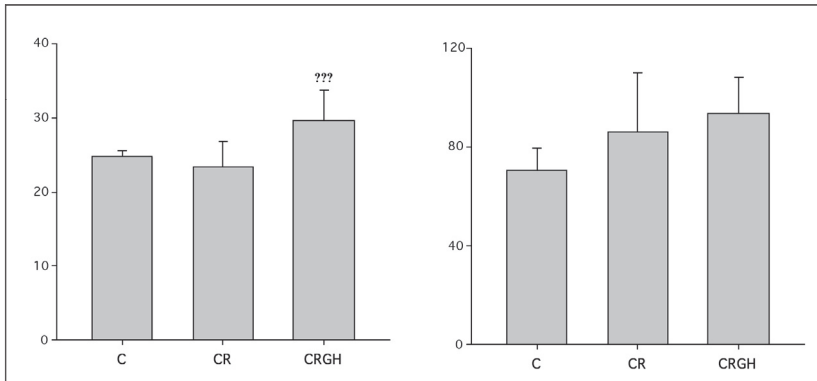


Figure 1B

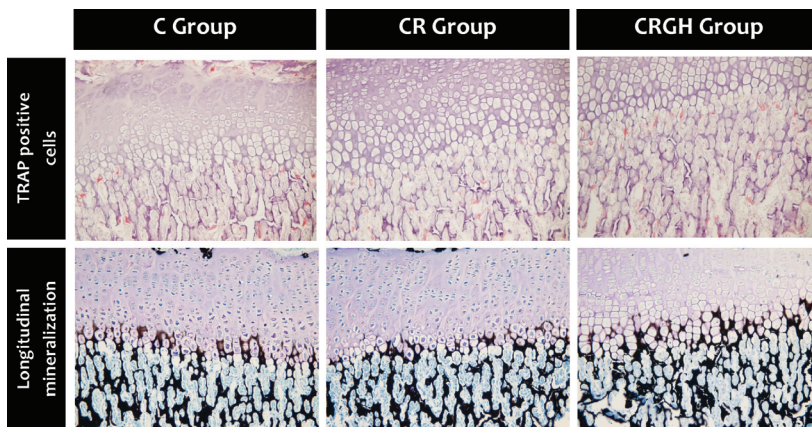


Figure 1

Histological analysis (A) and representative examples (B) of mineralization by von Kossa technique and osteoclasts with activity measured by expression of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) among the three studied groups: control animals (C group), diet restriction animals (CR group), and diet restriction animals treated with growth hormone (CRGH group). Data are mean \pm SEM. $P < 0.05$, α significant different from C; β significant different from CR.

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemistry for caspase-3 disclosed positive staining of cells confined to the hypertrophic zone (HZ) in the 3 groups of animals. The percentage of positive cells was higher in the C Group (96 \pm 1%) than in CR (93 \pm 1%) and CRGH (93 \pm 3%) (Figure 2A). Immunohistochemistry for

VEGF disclosed positive staining of cells confined to HZ in the 3 groups of animals. The percentage of positive cells was lower in the CRGH Group ($84\pm 6\%$) than in CR group ($91\pm 1\%$) and C group ($89\pm 1\%$) (Figure 2A). Figure 2B illustrates the microscopic images obtained for caspase-3 and VEGF immunohistochemistry in representative examples from all three groups.

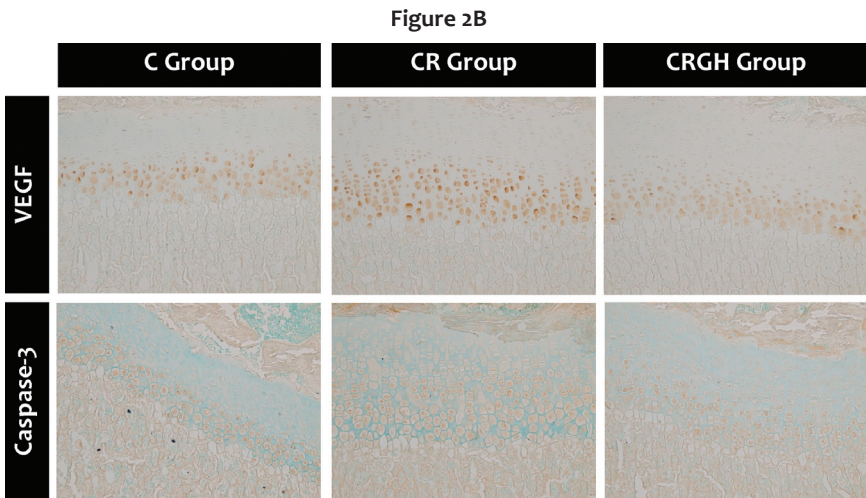
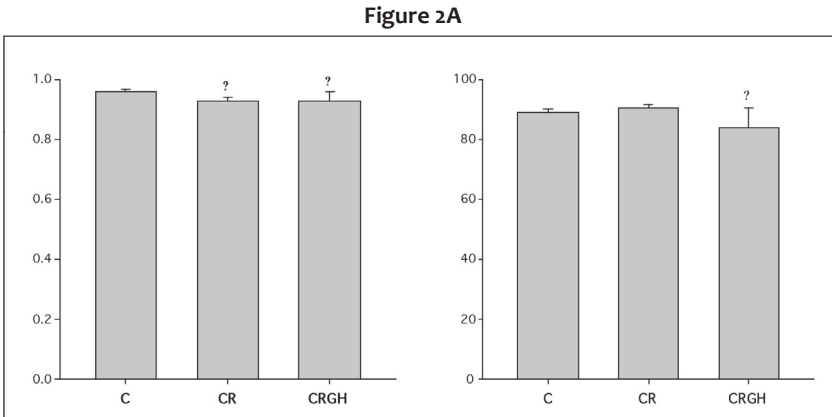


Figure 2 Immunohistochemical analysis (A) and representative examples (b) of labeled cells for Caspase-3 and VEGF among the three studied groups: control animals (C group), diet restriction animals (CR group), and diet restriction animals treated with growth hormone (CRGH group). Data are mean \pm SEM. $P < 0.05$, α significant different from C; β significant different from CR.

mRNA analysis

The Table 1 summarizes the results of real time PCR experiments in the 3 groups of rats. In the CR group, caspase-3 was downregulated and VEGF was upregulated in comparison with the control animals. GH treatment markedly increased collagen X and BMP2 mRNA levels whereas resulted in further decrease of caspase-3 mRNA.

Table 1. mRNA levels quantification.

	Col X	BMP2	Casp 3	VEGF
C Group	1,00 ± 0,163	1,00 ± 0,190	1,00 ± 0,125	1,00 ± 0,103
CR Group	0,90 ± 0,149	1,48 ± 0,318	0,23 ± 0,026 ^α	3,97 ± 0,264 ^α
CRGH Group	10,97 ± 1,579 ^{α,β}	4,08 ± 0,861 ^{α,β}	0,09 ± 0,015 ^{α,β}	1,58 ± 0,215 ^{α,β}

Legend: C group - control animals; CR group – diet restriction animals; CRGH group – diet restriction animals s treated with growth hormone. Col-X- Collagen type X; Casp-3 - Caspase 3; BMP-2 – bone morphogenic protein 2; VEGF – vascular endothelial growth factor. Data are mean±SEM. P<0.05, α significant different from C; β significant different from CR.

DISCUSSION

The growth plate can be divided into three main zones of chondrocyte differentiation, namely, resting, proliferative, and hypertrophic zone [15]. Chondrocytes in the resting zone originate the proliferating cells that ultimately differentiate into hypertrophic chondrocytes. These hypertrophic cells produce extracellular matrix and are replaced by osteoblasts. The cartilaginous growth plate is an avascular area that receives oxygen by diffusion creating hypoxic environment [16]. Decrease in intracellular O₂ tension induces changes in gene transcription mediated by hypoxia-inducible factor (HIF) [17]. In this sequence, attention is being done to the role of hypoxia-inducible factor (HIF) at growth plate level. Genes transcriptionally activated by HIF mediate several cellular processes, such as genes involved in glucose transport and glycolysis, pro-angiogenic factors to promote vessel formation (VEGF, Flt-1, bFGF, among other) and genes that regulate cell proliferation and survival [17]. Even-Zohar and collaborators, using DNA microarrays technology demonstrated that HIF-1 α and several of its downstream targets are increased during catch-up growth in an experimental model of food restriction [18]. In the present study, we used a model of catch-up growth after a 50% food restriction for 3 days. We demonstrated that this catch-up growth phenomenon, disclosed by an osseous front advance rate greater than that found in control animals, occurred in young rats one week after the removal of the diet restriction and it was associated with expansion of the tibial growth cartilage and its hypertrophic zone, increment of the chondrocyte proliferating activity, and no increase in the terminal chondrocyte height [12]. In the untreated animals, catch-up growth was associated with up-regulation of VEGF gene expression. These results are in accordance to the work of Even-Zohar and indicate that the process of catch-up growth seems to involve the activation of local

VEGF. This activation might result in invasion of the calcified cartilage by new blood vessels [15]. HIF-1 α is also a well-recognized factor to chondrocytes survival, especially in the hypoxic regions of the growth plate [16]. In the present study, we demonstrate that catch-up growth induced by food restriction induced a reduction of caspase-3 mRNA levels. Although we did not perform any technique to identify apoptotic cells, it is tempting to speculate that catch-up growth in these animals was linked to a decreased rate of chondrocyte death by apoptosis.

Growth hormone treatment is has been used for several years in newborns born small for gestational age [19, 20] as well as in children and adolescents with decreased growth velocity secondary to chronic diseases or long-term steroid therapy [21]. However, the response to GH treatment is highly variable because in some cases, GH induces catch-up growth but in others, only restores linear growth. This variability in the response seems to be dependent on the time of GH administration and in the type and the severity of the underlying disease [21]. GH acts locally at the growth plate by recruiting directly resting chondrocytes into a proliferative state and stimulating local production of IGF-1, which stimulates proliferation of chondrocytes in the proliferative zone [22]. The local effectors of GH at growth plate level are largely unknown. Collagen X and BMP-2 are both markers of chondrocyte differentiation. Whereas all growth cartilage cells in their different stages of differentiation express collagen II, only mature chondrocytes located in the hypertrophic stratum express collagen X [23, 24]. On the other hand, BMPs are a group of polypeptides with important functions in the endochondral bone formation, namely BMP-2 and BMP-7 [25]. In the present study, GH administration induced a marked up-regulation of collagen X and BMP-2 mRNA levels at the growth plate. Likewise, GH stimulated increased the number of TRAP + cells. Taken together, these findings indicate that GH promoted

catch-up growth in the animal model here presented by facilitating the process of chondrocyte maturation and by stimulating the osteoclastic activity at the osteochondral junction.

In conclusion, in this experimental study we demonstrated that catch-up growth secondary to diet restriction is accompanied by modifications in the expression of VEGF and caspase-3 mRNAs in the rat's growth plate. We also demonstrated that catch-up growth induced by GH treatment is associated with stimulation of both the process of chondrocyte maturation and the coupled osteoclastic activity of metaphyseal bone. These findings might also occur in children with growth impairment secondary to chronic disorders treated with GH and be relevant in the beneficial effect of GH administration found in these patients.

REFERENCES

1. Prader, A., J.M. Tanner, and H.G. von, Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man. *J Pediatr*, 1963. 62: p. 646-59.
2. Boersma, B. and J.M. Wit, Catch-up growth. *Endocr Rev*, 1997. 18(5): p. 646-61.
3. Farnum, C.E., et al., Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats. *Pediatr Res*, 2003. 53(1): p. 33-41.
4. Chrysis, D., et al., Apoptosis is developmentally regulated in rat growth plate. *Endocrine*, 2002. 18(3): p. 271-8.
5. Farnum, C.E. and N.J. Wilsman, Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *Anat Rec*, 1987. 219(3): p. 221-32.
6. Gibson, G.J., W.J. Kohler, and M.B. Schaffler, Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. *Dev Dyn*, 1995. 203(4): p. 468-76.
7. Lewinson, D. and M. Silbermann, Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption. *Anat Rec*, 1992. 233(4): p. 504-14.
8. Roach, H.I., New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. *J Bone Miner Res*, 1997. 12(5): p. 795-805.
9. Zenmyo, M., et al., Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. *J Pathol*, 1996. 180(4): p. 430-3.
10. Santos, F., et al., Alterations of the growth plate in chronic renal failure. *Pediatr Nephrol*, 2005. 20(3): p. 330-4.

11. Breur, G.J., et al., Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res*, 1991. 9(3): p. 348-59.
12. Molinos, I., et al., Catch-up growth follows an abnormal pattern in experimental renal insufficiency and growth hormone treatment normalizes it. *Kidney Int*, 2006. 70(11): p. 1955-61.
13. Alvarez-Garcia, O., et al., Rapamycin induces growth retardation by disrupting angiogenesis in the growth plate. *Kidney Int*, 2010. 78(6): p. 561-8.
14. Chomczynski, P. and N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 2006. 1(2): p. 581-5.
15. van der Eerden, B.C., M. Karperien, and J.M. Wit, Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev*, 2003. 24(6): p. 782-801.
16. Schipani, E., et al., Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev*, 2001. 15(21): p. 2865-76.
17. Liu, L. and M.C. Simon, Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol Ther*, 2004. 3(6): p. 492-7.
18. Even-Zohar, N., et al., Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1alpha RNA levels in the growth plate. *Bone*, 2008. 42(3): p. 505-15.
19. Labarta, J.I., et al., Growth and growth hormone treatment in short stature children born small for gestational age. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2009. 6 Suppl 3: p. 350-7.
20. Phillip, M., et al., European multicentre study in children born small for gestational age with persistent short stature: comparison of continuous and discontinuous growth hormone treatment regimens. *Horm Res*, 2009. 71(1): p. 52-9.
21. Simon, D., rhGH treatment in corticosteroid-treated patients. *Horm Res*, 2007. 68(1): p. 38-45.
22. Nilsson, O., et al., Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res*, 2005. 64(4): p. 157-65.
23. Gerstenfeld, L.C. and F.D. Shapiro, Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem*, 1996. 62(1): p. 1-9.
24. Nagamoto, N., et al., Rapid expression of collagen type X gene of non-hypertrophic chondrocytes in the grafted chick periosteum demonstrated by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, 1993. 41(5): p. 679-84.
25. Steinert, A.F., et al., Hypertrophy is induced during the in vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene transfer. *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(5): p. R148.

IV. DISCUSSÃO

O crescimento é um processo chave na infância extraordinariamente sensível à ação de fármacos e condições adversas à saúde da criança. As doenças crônicas diminuem, em grau variável, o potencial do crescimento longitudinal e a estatura determinada geneticamente (Underwood 1999; MacRae, Farquharson et al. 2006). Após um período de inibição do crescimento, a velocidade no crescimento longitudinal fica transitoriamente acima dos limites estatísticos da normalidade, fenómeno conhecido por crescimento de recuperação ou *catch-up growth* e documentado em várias doenças crônicas (Prader, Tanner et al. 1963; Boersma and Wit 1997).

O crescimento ósseo longitudinal ocorre na placa de crescimento por ossificação endocondral, processo durante o qual se forma cartilagem que é remodelada para osso. A placa de crescimento é constituída por condrócitos em diferentes estádios de diferenciação, podendo ser identificadas três camadas de células histologicamente distintas: zona de repouso, zona proliferativa e zona hipertrófica. As células da zona de repouso replicam-se a um ritmo lento funcionam como uma fonte de células estaminais para a zona proliferativa. Os condrócitos da zona proliferativa, por outro lado, replicam-se a um ritmo muito elevado e distribuem-se ao longo do maior eixo do osso, resultando na formação de clones de condrócitos dispostos em colunas paralelas a esse eixo. A zona hipertrófica contém condrócitos terminais que iniciam a calcificação da matriz extracelular, entrando depois num processo de apoptose e invasão de neo-vasos com formação de matriz óssea, processo chave no crescimento longitudinal do osso (Spath, Andrade et al. 2011).

A base fisiopatológica do crescimento de recuperação não é totalmente conhecida e as várias hipóteses propostas apenas explicam parte do processo (Tanner 1981; Wi and Boersma 2002; Nilsson, Marino et al. 2005). Actualmente pensa-se que os mecanismos subjacentes a este fenómeno são intrínsecos à placa de crescimento (Nilsson,

Marino et al. 2005). Vários estudos experimentais têm sugerido que o mecanismo de crescimento de recuperação se baseia num atraso da senescência da placa de crescimento (Emons, Boersma et al. 2005; Nilsson and Baron 2005; Lui, Nilsson et al. 2011). A senescência da placa de crescimento refere-se a um processo programado que se inicia na vida pós-natal e durante o qual esta vai perdendo capacidade proliferativa, diferenciando-se em condrócitos maduros que entram no processo apoptótico, favorecendo a ossificação da placa até à sua fusão definitiva (Walker and Kember 1972; Walker and Kember 1972). Os condrócitos da placa de crescimento parecem ter uma capacidade proliferativa limitada que se vai esgotando à medida que o indivíduo vai envelhecendo. Deste modo, condições ou doenças que atrasem o crescimento ósseo estão a induzir uma alteração da cinética celular da placa, atrasando a senescência (Gafni, Weise et al. 2001). Quando o estímulo inibitório é removido, a placa de crescimento apresenta-se menos senescente, com maior capacidade proliferativa permitindo o crescimento de recuperação (Nilsson and Baron 2005; Marino, Hegde et al. 2008).

O atraso de crescimento é uma característica presente em grande parte das doenças crónicas na infância. Os mecanismos subjacentes e implícitos nas alterações da condrogénese incluem, entre outros, o défice proteico-calórico, a inflamação e a acidose metabólica / uremia. Estes mecanismos parecem perturbar o eixo HC / IGF-I, crucial para o normal crescimento estatural (De Luca 2006). Os GC endógenos e/ou exógenos têm também um papel relevante nas alterações de crescimento e da mineralização óssea por atuarem direta ou indiretamente sobre o eixo HC / IGF-I (Sanchez and He 2002; Chrysis, Ritzen et al. 2003). Vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de explicar os mecanismos pelos quais se processa o atraso de crescimento nas doenças crónicas da criança (Andrade, Chrysis et al. 2011).

A privação calórico-proteica secundária à mal absorção ou desnutrição é um importante fator inibitório do crescimento longitudinal

ósseo. Encontram-se descritos modelos experimentais de restrição dietética, quer em ratos quer em coelhos, que cursam com uma diminuição do número e da altura dos condrócitos em todas as zonas da placa de crescimento (Heinrichs, Colli et al. 1997; Farnum, Lee et al. 2003). A desnutrição parece ser acompanhada de alterações do eixo sistémico da HC / IGF-1 (Tannenbaum, Rorstad et al. 1979).

Patologias como a atrite idiopática juvenil, a doença de Chron e a colite ulcerosa cursam com intensa atividade inflamatória, com aumento de várias citocinas pró-inflamatórias como IL-6, a IL-1 e o TNF α (Mangge, Kenzian et al. 1995; Funakoshi, Sugimura et al. 1998; Ji, Pettit et al. 2002). Ratos transgénicos com hiperexpressão de IL-6 apresentaram metade da estatura dos respetivos controlos bem como uma diminuição dos níveis circulantes de IGF-1 (De Benedetti, Alonzi et al. 1997; Lieskovska, Guo et al. 2003). Demonstrou-se também num modelo experimental de doença de Crohn que a inflamação inibe o crescimento linear através da diminuição da via do IGF-1, de modo independente da doença intestinal (Ballinger, Azooz et al. 2000).

Estudos experimentais têm demonstrado que a acidose metabólica se acompanha de uma redução da taxa de crescimento longitudinal do osso e da espessura da placa de crescimento, bem como uma diminuição da secreção de HC e dos níveis circulantes de IGF-1 (Green and Maor 2000; Carbajo, Lopez et al. 2001). O modelo experimental de uremia em ratos tem sido amplamente utilizado para estudar o atraso de crescimento na insuficiência renal crónica. A morfologia da placa de crescimento nestes modelos parece variar com o grau de hiperparatiroidismo secundário (Sanchez, Salusky et al. 1998; Sanchez and He 2002; Santos, Carbajo-Perez et al. 2005).

A administração sistémica de GC é outro modelo de atraso de crescimento descrito em várias espécies animais. Nestes modelos há uma redução da largura da placa de crescimento e do comprimento da tibia, devido a uma redução do número de condrócitos da zona

proliferativa e do aumento da apoptose dos condrócitos hipertróficos (Altman, Hochberg et al. 1992; Annefeld 1992; Silvestrini, Ballanti et al. 2000).

A regulação do crescimento longitudinal ao nível da placa de crescimento é um processo extremamente complexo e amplamente regulado por factores hormonais sistémicos e locais (Spath, Andrade et al. 2011). As evidências atuais favorecem a hipótese de que o crescimento de recuperação depende sobretudo de mecanismos intrínsecos da placa de crescimento, pelo que o objetivo principal deste trabalho foi o de avaliar alterações morfológicas e a expressão génica do eixo local da HC / IGF-1, bem como os mecanismos apoptóticos e angiogénicos subjacentes ao processo de crescimento de recuperação secundário a um estímulo nómico – restrição dietética.

No modelo experimental de crescimento de recuperação utilizado, o efeito nómico consistiu numa restrição dietética transitória de 50% durante 3 dias em ratos fêmea pré-pubescentes (Amil, Fernandez-Fuente et al. 2004; Fernandez-Fuente, Santos et al. 2004; Santos, Carbajo-Perez et al. 2005; Molinos, Santos et al. 2006). Demonstrou-se previamente neste modelo que, uma semana após a re-alimentação (remoção do estímulo nómico), os animais apresentaram evidências de crescimento de recuperação, traduzidas por: i) maior frente óssea ao nível da placa de crescimento, mensurada através da altura entre a união osteocondral e o limite da marcação com calceína; ii) aumento da altura total da cartilagem de crescimento; iii) aumento da atividade proliferativa e do número de condrócitos hipertróficos; iv) aumento da altura da zona hipertrófica (Molinos, Santos et al. 2006).

Os nossos resultados indicam que os animais que experimentaram crescimento de recuperação exibiram um aumento da expressão de ARNm de IGF-1 e de IGFBP5 ao nível da placa de crescimento. Estes resultados parecem corroborar outros estudos que demonstraram que os níveis de proteínas locais de IGF-IR aumentaram após a restrição ali-

mentar (Gat-Yablonski, Shtaif et al. 2008). Ao contrário de que classicamente se pensava, a produção local de IGF-1 é um dos principais fatores de crescimento dos condrócitos da placa de crescimento (Yakar, Rosen et al. 2002). A IGFBP-5 presente na matriz extracelular é um importante co-fator para a actividade do IGF-1 uma vez que potencia a ligação deste ao seu recetor IGF-R (Jones and Clemmons 1995). Esta maior biodisponibilidade local de IGF-1 parece favorecer a aceleração do crescimento longitudinal através do aumento da proliferação dos condrócitos.

A placa de crescimento cartilaginosa é uma área avascular uma vez que recebe o oxigénio por difusão (van der Eerden, Karperien et al. 2003). Este ambiente hipóxico leva à produção do fator 1α induzido pela hipóxia (HIF), o qual controla inúmeros genes tais como, aqueles envolvidos na formação de novos vasos (como o VEGF e o seu recetor Flt-1), e na proliferação e sobrevivência celular (Even-Zohar, Jacob et al. 2008). No presente estudo, demonstramos que o crescimento de recuperação se associou a um aumento da expressão de ARNm do VEGF. Estes resultados estão de acordo com outros estudos e parecem indicar que o processo de crescimento de recuperação envolve a ativação local de VEGF, promovendo a invasão da cartilagem calcificada por novos vasos (Even-Zohar, Jacob et al. 2008). Por outro lado, estes animais com crescimento de recuperação apresentaram uma redução dos níveis de ARNm da caspase-3, um marcador da apoptose (Wang, Liu et al. 2000). Estes resultados parecem indicar que o fenómeno de crescimento de recuperação se associa a uma diminuição da apoptose dos condrócitos, atrasando, desta forma, a senescência da placa.

O tratamento com HC tem sido utilizado em crianças e adolescentes com atraso de crescimento secundário a doenças crónicas ou a terapia com GC (Hindmarsh and Dattani 2006). A resposta terapêutica ao tratamento com HC é, no entanto, muito variável, uma vez que nalguns casos a HC induz crescimento de recuperação, enquanto que noutros, só normaliza a velocidade do crescimento, não

corrigindo a estatura final. Esta variabilidade parece ser dependente do início e duração da administração de HC, bem como do tipo e gravidade da doença subjacente (Simon 2007). A HC age localmente na placa de crescimento através do recrutamento direto de condrócitos da zona de repouso em estado proliferativo e estimula a produção local de IGF-1, que por sua vez incrementa a proliferação de condrócitos na zona proliferativa [22]. Os efetores locais de HC a nível placa de crescimento são largamente desconhecidos.

Utilizando o mesmo modelo de crescimento de recuperação, avaliamos também o efeito da administração exógena de HC sobre a placa de crescimento. Demonstrou-se previamente que o tratamento com HC logo após a remoção da restrição alimentar e durante sete dias, para além da presença de todas as alterações observadas nos animais com crescimento de recuperação espontâneo, induzia também um aumento da altura dos condrócitos terminais, o que pode traduzir um maior potencial de crescimento da placa.

No presente estudo demonstramos que o tratamento com HC induziu um aumento na expressão de ARNm de IGF-1, IGFB5 e de IGF-IR na placa de crescimento. Estes resultados reforçam a teoria de que o tratamento com HC potencializa os efeitos do IGF-I local e o seu papel crucial no crescimento ósseo (Yakar, Rosen et al. 2002). Estes resultados corroboram outros estudos que demonstraram que aumento do IGF-I local mediado pela HC estimula a proliferação e hipertrofia dos condrócitos, contribuindo, desse modo, para o crescimento ósseo (Isaksson, Jansson et al. 1982).

Em relação aos efeitos da administração da HC sobre a angiogénese e apoptose da placa de crescimento, demonstramos que esta induz um aumento dos níveis de ARNm de VEGF e uma redução dos níveis da caspase-3.

Para além destes resultados, avaliamos também os efeitos da HC na atividade dos osteoclastos da junção osteocondral e nos níveis

de colagénio tipo X e da BMP-2, ambos marcadores de diferenciação de condrócitos. Na cartilagem de crescimento apenas os condrócitos maduros localizados na camada hipertrófica expressam colágeno X, enquanto que as BMPs são um grupo de polipeptídeos com funções importantes na formação óssea endocondral (Nagamoto, Iyama et al. 1993). No presente estudo, a HC induziu um aumento marcado dos níveis de colágeno X e de BMP-2, bem como da atividade osteoclástica na junção osteocondral, demonstrada pelo aumento do número de células TRAP positivas.

Este trabalho permitiu demonstrar que o tratamento com HC parece ter um efeito local duplo, uma vez que potencia simultaneamente a expansão da placa e a sua mineralização. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão dos efeitos benéficos do tratamento com HC de crianças com alterações do crescimento secundárias a doenças crónicas.

V. CONCLUSÕES

Neste trabalho utilizamos um modelo experimental de crescimento de recuperação induzido por restrição dietética para estudar várias vias de sinalização da placa de crescimento. Demonstrámos que, durante o crescimento de recuperação várias fatores se encontram alterados.

1. O crescimento de recuperação acompanha-se de um aumento da expressão génica de IGF-I e de IGFBP5, sem alterar os níveis de GHR e de IGF-IR;
2. O crescimento de recuperação induziu um aumento marcado de VEGF e uma diminuição da expressão de caspase-3;
3. Ao nível da matriz extracelular, não foram observadas alterações ao nível da expressão do colagénio X e da BMP-2 nem ao nível da atividade osteoclástica.

O tratamento com HC potencializou a maior parte das alterações presentes na placa de crescimento durante o crescimento de recuperação e ativou outras vias que permitem explicar o seu conhecido efeito terapêutico nas doenças que cursam com atraso de crescimento. Sumarizam-se de seguida os principais achados.

1. A administração de HC durante o crescimento de recuperação potenciou o aumento da expressão génica de IGF-I e de IGFBP5, aumentou a expressão de IGF-IR e não alterou os níveis de GHR;
2. A administração de HC potenciou as alterações ao nível da expressão de VEGF e da caspase-3 induzidas pelo crescimento de recuperação;
3. Os principais efeitos da HC fizeram-se sentir ao nível da matriz extracelular. A administração da HC induziu um aumento marcado na expressão génica do colagénio X e da BMP-2. Induziu também um aumento acentuado da atividade osteoclástica, potenciando o processo de mineralização óssea.

VI. RESUMO

ABSTRACT

The term catch-up growth describes the phenomenon by which longitudinal growth velocity transiently stands above the statistical limits of normality for age and/or maturity after the removal of a growth-inhibiting condition. Catch-up growth occurs both in humans and animals and its underlying pathogenic mechanisms are still largely unknown. Linear bone growth results from proliferation, hypertrophy and matrix production of cartilage cells in growth plate. Growth plate is comprised of cells representing various states of differentiation: the resting zone, the proliferative zone with actively dividing cells, and the hypertrophic zone with maturing cells enlarging and ultimately dying. The regulation of longitudinal growth is influenced by numerous systemic and local factors. Although the interplay among these factors is still unclear, growth hormone (GH) and IGF-I are crucial. Circulating GH can act directly on growth plate stimulating the local IGF-I synthesis, which in turns induces chondrocyte expansion. Abnormalities of the GH/IGF-I axis are one of the major determinants of growth retardation in children with chronic illnesses. There are experimental and clinical evidences demonstrating important alterations in GH/IGF-I axis during chronic diseases, like chronic renal failure, chronic bowel inflammatory diseases and juvenile idiopathic arthritis. It is well known that treatment with GH potentiates catch-up growth in several conditions.

Our group previously examined the pattern of catch-up growth in young rats after an inhibitory growth condition induced by diet restriction. The existence of a growth recovery implies the return to the previous growth path after noxious stimulus suppression. Our experimental model showed that growth rate acceleration inherent to a spontaneous catch-up, was associated with enhancement of proliferative activity, and specially, to an expansion of the hypertrophic zone of the cartilage. GH administration started at the time of noxious stimulus suppression, further accelerated catch-up growth velocity,

this effect being likely related to a greater enlargement of the terminal chondrocyte height.

In this experimental model of catch-up growth after diet restriction we demonstrated that In the absence of GH treatment, catch-up growth was associated with increased IGF-I and IGFBP5 mRNA levels, without changes in GHR or IGF-IR. GH treatment maintained the overexpression of IGF-I mRNA and induced an important increase in IGF-IR expression. These results highlight that catch-up growth after a noxious stimulus might be related with a dual stimulating local effect of IGF-I in growth plate resulting from overexpression and increased bioavailability of IGF-I.

Other important aspects of growth plate physiology are the mineralization pattern, osteoclastic activity and vascular invasion at the tibial growth plate during catch-up growth. Using the same model of catch-up growth after diet restriction in young rats, we demonstrated that there is an up-regulation of VEGF gene expression and a decrease in caspase-3 mRNA levels during catch-up growth. GH treatment potentiated the mechanism of the catch-up growth. In addition, GH administration promoted the maturation of chondrocytes by an increase in collagen X and BMP-2 mRNA levels, and the mineralization by increasing osteoclastic activity.

In conclusion, the present work described innovative molecular pathways activated during the catch-up growth after a noxious stimulus and its modulation by GH administration. Our findings add important data to better understand the underlying mechanism of catch-up growth in children with chronic diseases.

RESUMO

O termo crescimento de recuperação (*catch-up-growth*) descreve o fenômeno pelo qual a velocidade de crescimento longitudinal ultrapassa os limites estatísticos de normalidade para a idade e / ou maturidade após a remoção de uma condição inibitória do crescimento. O crescimento de recuperação ocorre quer no Homem quer no animal e os mecanismos subjacentes são ainda largamente desconhecidos. O crescimento ósseo longitudinal resulta da hipertrofia, proliferação e produção de matriz dos condrócitos na placa de crescimento. A placa de crescimento é composta por células em diferentes estadios de diferenciação: a zona germinativa, a zona proliferativa, com células em divisão ativa, e a zona hipertrófica, com células maduras. A regulação do crescimento longitudinal é influenciada por inúmeros fatores sistêmicos e locais. Embora a interação entre estes fatores seja maioritariamente desconhecida, a Hormona de Crescimento (HC) e o IGF-I são fatores cruciais. A HC circulante pode atuar diretamente na placa de crescimento estimulando a síntese de IGF-I localmente, o qual, por sua vez induz a proliferação dos condrócitos. As perturbações do eixo HC / IGF-I são um dos principais determinantes do atraso de crescimento em crianças com doenças crónicas. Evidências experimentais e clínicas têm demonstrando que várias doenças crónicas na criança, como a insuficiência renal crónica, a doença inflamatória intestinal e a artrite idiopática juvenil, apresentam alterações do eixo HC/ IGF-I. Nestas patologias, a terapêutica com HC potencia o crescimento de recuperação.

O nosso grupo descreveu previamente o padrão de crescimento de recuperação em ratos jovens após restrição alimentar (estímulo inibitório). Neste modelo experimental demonstrou-se que a aceleração da taxa de crescimento inerente ao processo espontâneo do crescimento de recuperação, se associava ao aumento da atividade proliferativa e, especialmente, a uma expansão da zona hipertrófica da

cartilagem. A administração de HC a partir da supressão do estímulo inibitório, acelerou a velocidade de crescimento provavelmente devido a um aumento da altura do condrócito terminal.

Neste modelo experimental demonstramos que, na ausência de tratamento com HC, o crescimento de recuperação induziu um aumento da expressão de IGF-I e IGFBP5, sem alterar a expressão dos receptores da HC e do IGF-I (IGF-IR). A administração de HC, para além de aumentar a expressão de IGF-I, induziu também um aumento importante no IGF-IR. Esses resultados sugerem que a recuperação do crescimento depois de um estímulo inibitório pode estar relacionada com um efeito duplo do IGF-I na placa de crescimento resultante do aumento da expressão bem como da sua biodisponibilidade.

A fisiologia da placa de crescimento durante a ossificação endocondral apresenta um conjunto de acontecimentos que englobam a mineralização, a atividade osteoclástica e a invasão vascular. Usando o mesmo modelo de crescimento de recuperação após restrição alimentar em ratos jovens, demonstramos que, durante o crescimento de recuperação, há um aumento da expressão génica do marcador angiogénico VEGF e uma diminuição nos níveis de mRNA de caspase-3, um importante marcador apoptótico. O tratamento com HC potencializou o mecanismo de crescimento de recuperação. Este tratamento promoveu a maturação dos condrócitos, demonstrada por um aumento dos níveis de colagénio X e de BMP-2 e da mineralização através do aumento da atividade osteoclástica.

Em conclusão, o presente trabalho descreveu novas vias de sinalização ativadas na placa de crescimento durante o crescimento de recuperação e sua modulação pela administração de HC. Estes achados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos implicados no crescimento de recuperação em crianças com atraso de crescimento secundário a doenças crónicas.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abad, V., J. L. Meyers, et al. (2002). "The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis." *Endocrinology* **143**(5): 1851-1857.

Altman, A., Z. Hochberg, et al. (1992). "Interactions between growth hormone and dexamethasone in skeletal growth and bone structure of the young mouse." *Calcif Tissue Int* **51**(4): 298-304.

Amil, B., M. Fernandez-Fuente, et al. (2004). "Chondromodulin-I expression in the growth plate of young uremic rats." *Kidney Int* **66**(1): 51-59.

Anderson, H. C. (2003). "Matrix vesicles and calcification." *Curr Rheumatol Rep* **5**(3): 222-226.

Anderson, H. C., P. T. Hodges, et al. (2000). "Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage." *J Histochem Cytochem* **48**(11): 1493-1502.

Andrade, A. C., D. Chrysis, et al. (2011). "Methods to study cartilage and bone development." *Endocr Dev* **21**: 52-66.

Annefeld, M. (1992). "Changes in rat epiphyseal cartilage after treatment with dexamethasone and glycosaminoglycan-peptide complex." *Pathol Res Pract* **188**(4-5): 649-652.

Ballinger, A. (2002). "Management of growth retardation in the young patient with Crohn's disease." *Expert Opin Pharmacother* **3**(1): 1-7.

Ballinger, A. B., O. Azooz, et al. (2000). "Growth failure occurs through a decrease in insulin-like growth factor 1 which is independent of undernutrition in a rat model of colitis." *Gut* **46**(5): 694-700.

Ballock, R. T. and R. J. O'Keefe (2003). "The biology of the growth plate." *J Bone Joint Surg Am* **85-A**(4): 715-726.

Baron, J., K. O. Klein, et al. (1994). "Catch-up growth after glucocorticoid excess: a mechanism intrinsic to the growth plate." *Endocrinology* **135**(4): 1367-1371.

Bechtold, S., P. Ripperger, et al. (2001). "GH therapy in juvenile chronic arthritis: results of a two-year controlled study on growth and bone." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(12): 5737-5744.

Boersma, B. and J. M. Wit (1997). "Catch-up growth." *Endocr Rev* **18**(5): 646-661.

Boyan, B. D., V. L. Sylvia, et al. (2002). "Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ and 24R,25-(OH) $_2$ D $_3$ involves cell-

maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism.” Crit Rev Oral Biol Med **13**(2): 143-154.

Boyan, B. D., V. L. Sylvia, et al. (2001). “24,25-(OH)(2)D(3) regulates cartilage and bone via autocrine and endocrine mechanisms.” Steroids **66**(3-5): 363-374.

Breur, G. J., J. Turgai, et al. (1994). “Stereological and serial section analysis of chondrocytic enlargement in the proximal tibial growth plate of the rat.” Anat Rec **239**(3): 255-268.

Breur, G. J., B. A. VanEnkevort, et al. (1991). “Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates.” J Orthop Res **9**(3): 348-359.

Bromberg, J. (2002). “Stat proteins and oncogenesis.” J Clin Invest **109**(9): 1139-1142.

Buckwalter, J. A. and L. Rosenberg (1986). “Structural changes in reassembled growth plate aggregates.” J Orthop Res **4**(1): 1-9.

Caldas, A., M. Broyer, et al. (1992). “Primary distal tubular acidosis in childhood: clinical study and long-term follow-up of 28 patients.” J Pediatr **121**(2): 233-241.

Calo, V., M. Migliavacca, et al. (2003). “STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis.” J Cell Physiol **197**(2): 157-168.

Canalis, E., A. N. Economides, et al. (2003). “Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton.” Endocr Rev **24**(2): 218-235.

Canalis, E. and B. Gabbitas (1994). “Bone morphogenetic protein 2 increases insulin-like growth factor I and II transcripts and polypeptide levels in bone cell cultures.” J Bone Miner Res **9**(12): 1999-2005.

Carbajo, E., J. M. Lopez, et al. (2001). “Histologic and dynamic changes induced by chronic metabolic acidosis in the rat growth plate.” J Am Soc Nephrol **12**(6): 1228-1234.

Chrysis, D., E. M. Ritzen, et al. (2003). “Growth retardation induced by dexamethasone is associated with increased apoptosis of the growth plate chondrocytes.” J Endocrinol **176**(3): 331-337.

Cobo, A., E. Carbajo, et al. (1996). “Morphometry of uremic rat growth plate.” Miner Electrolyte Metab **22**(1-3): 192-195.

Cobo, A., J. M. Lopez, et al. (1999). "Growth plate cartilage formation and resorption are differentially depressed in growth retarded uremic rats." *J Am Soc Nephrol* **10**(5): 971-979.

Czernichow, P. (2001). "Treatment with growth hormone in short children born with intrauterine growth retardation." *Endocrine* **15**(1): 39-42.

Danes, I. and A. Agusti (2000). "[Inhaled glucocorticoids and their effects on growth in children]." *Med Clin (Barc)* **114**(13): 517-518.

Daughaday, W. H. (2000). "Growth hormone axis overview--somatomedin hypothesis." *Pediatr Nephrol* **14**(7): 537-540.

De Benedetti, F., T. Alonzi, et al. (1997). "Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation." *J Clin Invest* **99**(4): 643-650.

De Luca, F. (2006). "Impaired growth plate chondrogenesis in children with chronic illnesses." *Pediatr Res* **59**(5): 625-629.

De Luca, F., K. M. Barnes, et al. (2001). "Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2." *Endocrinology* **142**(1): 430-436.

De Luca, F. and J. Baron (1999). "Control of Bone Growth by Fibroblast Growth Factors." *Trends Endocrinol Metab* **10**(2): 61-65.

De Luca, F., J. A. Uyeda, et al. (2000). "Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis." *Endocrinology* **141**(1): 346-353.

Emons, J. A., B. Boersma, et al. (2005). "Catch-up growth: testing the hypothesis of delayed growth plate senescence in humans." *J Pediatr* **147**(6): 843-846.

Even-Zohar, N., J. Jacob, et al. (2008). "Nutrition-induced catch-up growth increases hypoxia inducible factor 1alpha RNA levels in the growth plate." *Bone* **42**(3): 505-515.

Falcini, F., G. Taccetti, et al. (1991). "Growth retardation in juvenile chronic arthritis patients treated with steroids." *Clin Exp Rheumatol* **9 Suppl 6**: 37-40.

Farnum, C. E., A. O. Lee, et al. (2003). "Effect of short-term fasting on bone elongation rates: an analysis of catch-up growth in young male rats." *Pediatr Res* **53**(1): 33-41.

Farnum, C. E. and N. J. Wilsman (1987). "Morphologic stages of the

terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage.” *Anat Rec* **219**(3): 221-232.

Fernandez-Fuente, M., F. Santos, et al. (2004). “Growth plate height of uremic rats is influenced by severity and duration of renal failure.” *Pediatr Nephrol* **19**(2): 187-192.

Fine, R. N., E. C. Kohaut, et al. (1994). “Growth after recombinant human growth hormone treatment in children with chronic renal failure: report of a multicenter randomized double-blind placebo-controlled study. Genentech Cooperative Study Group.” *J Pediatr* **124**(3): 374-382.

Fine, R. N., K. Pyke-Grimm, et al. (1991). “Recombinant human growth hormone treatment of children with chronic renal failure: long-term (1- to 3-year) outcome.” *Pediatr Nephrol* **5**(4): 477-481.

Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). “Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins.” *Endocr Rev* **23**(6): 824-854.

Funakoshi, K., K. Sugimura, et al. (1998). “Spectrum of cytokine gene expression in intestinal mucosal lesions of Crohn’s disease and ulcerative colitis.” *Digestion* **59**(1): 73-78.

Gafni, R. I. and J. Baron (2000). “Catch-up growth: possible mechanisms.” *Pediatr Nephrol* **14**(7): 616-619.

Gafni, R. I., M. Weise, et al. (2001). “Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits.” *Pediatr Res* **50**(5): 618-623.

Gat-Yablonski, G., B. Shtaf, et al. (2008). “Nutrition-induced catch-up growth at the growth plate.” *J Pediatr Endocrinol Metab* **21**(9): 879-893.

Gerber, H. P., T. H. Vu, et al. (1999). “VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation.” *Nat Med* **5**(6): 623-628.

Gevers, E. F., B. C. van der Eerden, et al. (2002). “Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate.” *J Bone Miner Res* **17**(8): 1408-1419.

Gradman, J. and O. D. Wolthers (2006). “[Longitudinal growth in children with asthma treated with inhaled glucocorticoids].” *Ugeskr Laeger* **168**(9): 885-889.

Green, J. and G. Maor (2000). “Effect of metabolic acidosis on the

growth hormone/IGF-I endocrine axis in skeletal growth centers.” *Kidney Int* **57**(6): 2258-2267.

Grote, F. K., L. W. Van Suijlekom-Smit, et al. (2006). “Growth hormone treatment in children with rheumatic disease, corticosteroid induced growth retardation, and osteopenia.” *Arch Dis Child* **91**(1): 56-60.

Haffner, D. and F. Schaefer (2001). “Does recombinant growth hormone improve adult height in children with chronic renal failure?” *Semin Nephrol* **21**(5): 490-497.

Haffner, D., F. Schaefer, et al. (2000). “Effect of growth hormone treatment on the adult height of children with chronic renal failure. German Study Group for Growth Hormone Treatment in Chronic Renal Failure.” *N Engl J Med* **343**(13): 923-930.

Hanna, J. D., F. Santos, et al. (1995). “Insulin-like growth factor-I gene expression in the tibial epiphyseal growth plate of growth hormone-treated uremic rats.” *Kidney Int* **47**(5): 1374-1382.

Hardin, D. S. (2002). “Growth hormone treatment in children with cystic fibrosis.” *Minerva Pediatr* **54**(5): 365-371.

Hardin, D. S. (2002). “Growth problems and growth hormone treatment in children with cystic fibrosis.” *J Pediatr Endocrinol Metab* **15 Suppl 2**: 731-735.

Heinrichs, C., M. Colli, et al. (1997). “Effects of fasting on the growth plate: systemic and local mechanisms.” *Endocrinology* **138**(12): 5359-5365.

Hindmarsh, P. C. and M. T. Dattani (2006). “Use of growth hormone in children.” *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **2**(5): 260-268.

Horan, J., D. D. Dean, et al. (1996). “Evidence that interleukin-1, but not interleukin-6, affects costochondral chondrocyte proliferation, differentiation, and matrix synthesis through an autocrine pathway.” *J Bone Miner Res* **11**(8): 1119-1129.

Horton, W. A., M. A. Machado, et al. (1993). “An experimental model of human chondrocyte differentiation.” *Prog Clin Biol Res* **383B**: 533-540.

Hughes, F. J., J. Collyer, et al. (1995). “The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro.” *Endocrinology* **136**(6): 2671-2677.

Hunziker, E. B. (1994). “Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes.” *Microsc Res Tech* **28**(6): 505-519.

Hunziker, E. B. and R. K. Schenk (1989). "Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats." J Physiol **414**: 55-71.

Hunziker, E. B., R. K. Schenk, et al. (1987). "Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth." J Bone Joint Surg Am **69**(2): 162-173.

Hutchings, H., N. Ortega, et al. (2003). "Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation." FASEB J **17**(11): 1520-1522.

Isaksson, O. G., J. O. Jansson, et al. (1982). "Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly." Science **216**(4551): 1237-1239.

Isaksson, O. G., A. Lindahl, et al. (1987). "Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth." Endocr Rev **8**(4): 426-438.

Isaksson, O. G., C. Ohlsson, et al. (1991). "Regulation of cartilage growth by growth hormone and insulin-like growth factor I." Pediatr Nephrol **5**(4): 451-453.

Isaksson, O. G. P., J. O. Jansson, et al. (1982). "Growth-Hormone Stimulates Longitudinal Bone-Growth Directly." Science **216**(4551): 1237-1239.

Isgaard, J., A. Nilsson, et al. (1986). "Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats." Am J Physiol **250**(4 Pt 1): E367-372.

Ji, H., A. Pettit, et al. (2002). "Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis." J Exp Med **196**(1): 77-85.

Jones, J. I. and D. R. Clemmons (1995). "Insulin-Like Growth-Factors and Their Binding-Proteins - Biological Actions." Endocrine Reviews **16**(1): 3-34.

Jovanovic, O. (2002). "[Recombinant human growth hormone in the treatment of growth retardation in children with decreased kidney function]." Srp Arh Celok Lek **130**(3-4): 121-125.

Juul, A. (2001). "Determination of insulin-like growth factor I in children: normal values and clinical use." Horm Res **55 Suppl 2**: 94-99.

Juul, A. (2001). "The effects of oestrogens on linear bone growth." Hum Reprod Update **7**(3): 303-313.

Karlberg, J. (1989). "A biologically-oriented mathematical model (ICP) for human growth." Acta Paediatr Scand Suppl **350**: 70-94.

Karlberg, J. (1989). "On the construction of the infancy-childhood-puberty growth standard." Acta Paediatr Scand Suppl **356**: 26-37.

Kiepe, D., S. Ciarmatori, et al. (2006). "Differential expression of IGF system components in proliferating vs. differentiating growth plate chondrocytes: the functional role of IGFBP-5." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(2): E363-371.

Kiepe, D., S. Ciarmatori, et al. (2005). "Insulin-like growth factor (IGF)-I stimulates cell proliferation and induces IGF binding protein (IGFBP)-3 and IGFBP-5 gene expression in cultured growth plate chondrocytes via distinct signaling pathways." Endocrinology **146**(7): 3096-3104.

Kiepe, D., T. Ulinski, et al. (2002). "Differential effects of insulin-like growth factor binding proteins-1, -2, -3, and -6 on cultured growth plate chondrocytes." Kidney Int **62**(5): 1591-1600.

Koedam, J. A., C. M. Hoogerbrugge, et al. (2000). "Differential regulation of IGF-binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-I and dexamethasone." J Endocrinol **165**(3): 557-567.

Koniaris, S. G., S. E. Fisher, et al. (1997). "Experimental colitis impairs linear bone growth independent of nutritional factors." J Pediatr Gastroenterol Nutr **25**(2): 137-141.

Krohn, K., D. Haffner, et al. (2003). "1,25(OH)₂D₃ and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes." Calcif Tissue Int **73**(4): 400-410.

Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." Nature **423**(6937): 332-336.

Kuizon, B. D. and I. B. Salusky (1999). "Growth retardation in children with chronic renal failure." J Bone Miner Res **14**(10): 1680-1690.

Largo, R. H. (1993). "Catch-up growth during adolescence." Horm Res **39 Suppl 3**: 41-48.

Le Roith, D., C. Bondy, et al. (2001). "The somatomedin hypothesis: 2001." Endocr Rev **22**(1): 53-74.

Le Roith, D., L. Scavo, et al. (2001). "What is the role of circulating IGF-I?" Trends Endocrinol Metab **12**(2): 48-52.

Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(9): 651-662.

Levy, D. E. and C. K. Lee (2002). "What does Stat3 do?" J Clin Invest **109**(9): 1143-1148.

Lewinson, D. and M. Silbermann (1992). "Chondroclasts and endothelial cells collaborate in the process of cartilage resorption." Anat Rec **233**(4): 504-514.

Lieskovska, J., D. Guo, et al. (2003). "Growth impairment in IL-6-overexpressing transgenic mice is associated with induction of SOCS3 mRNA." Growth Horm IGF Res **13**(1): 26-35.

Lin, R., N. Amizuka, et al. (2002). "1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9." J Bone Miner Res **17**(9): 1604-1612.

Lippe, B., R. N. Fine, et al. (1988). "Accelerated growth following treatment of children with chronic renal failure with recombinant human growth hormone (somatrem): a preliminary report." Acta Paediatr Scand Suppl **343**: 127-131.

Lowe, W. L., Jr., M. Adamo, et al. (1989). "Expression and stability of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA splicing variants in the GH3 rat pituitary cell line." Biochem Biophys Res Commun **162**(3): 1174-1179.

Lowe, W. L., Jr., M. Adamo, et al. (1989). "Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor. Effects on gene expression and binding." J Clin Invest **84**(2): 619-626.

Lui, J. C., A. C. Andrade, et al. (2010). "Spatial and temporal regulation of gene expression in the mammalian growth plate." Bone **46**(5): 1380-1390.

Lui, J. C., O. Nilsson, et al. (2011). "Growth plate senescence and catch-up growth." Endocr Dev **21**: 23-29.

Mackie, E. J., Y. A. Ahmed, et al. (2008). "Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 46-62.

Mackie, E. J., I. Thesleff, et al. (1987). "Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro." J Cell Biol **105**(6 Pt 1): 2569-2579.

Macrae, V. E., S. F. Ahmed, et al. (2007). "IGF-I signalling in bone growth: inhibitory actions of dexamethasone and IL-1beta." Growth Horm IGF Res **17**(5): 435-439.

MacRae, V. E., C. Farquharson, et al. (2006). "The pathophysiology of the growth plate in juvenile idiopathic arthritis." Rheumatology (Oxford) **45**(1): 11-19.

MacRae, V. E., C. Farquharson, et al. (2006). "The restricted potential for recovery of growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth following exposure to pro-inflammatory cytokines." J Endocrinol **189**(2): 319-328.

MacRae, V. E., S. C. Wong, et al. (2006). "Cytokine actions in growth disorders associated with pediatric chronic inflammatory diseases (review)." Int J Mol Med **18**(6): 1011-1018.

Maeda, S., D. D. Dean, et al. (2001). "Metalloproteinase activity in growth plate chondrocyte cultures is regulated by 1,25-(OH)₂D(3) and 24,25-(OH)₂D(3) and mediated through protein kinase C." Matrix Biol **20**(2): 87-97.

Mangge, H., H. Kenzian, et al. (1995). "Serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. Correlation with conventional inflammation parameters and clinical subtypes." Arthritis Rheum **38**(2): 211-220.

Marino, R., A. Hegde, et al. (2008). "Catch-up growth after hypothyroidism is caused by delayed growth plate senescence." Endocrinology **149**(4): 1820-1828.

Martensson, K., D. Chrysis, et al. (2004). "Interleukin-1beta and TNF-alpha act in synergy to inhibit longitudinal growth in fetal rat metatarsal bones." J Bone Miner Res **19**(11): 1805-1812.

Mocetti, P., G. Silvestrini, et al. (2001). "Bcl-2 and Bax expression in cartilage and bone cells after high-dose corticosterone treatment in rats." Tissue Cell **33**(1): 1-7.

Molinos, I., F. Santos, et al. (2006). "Catch-up growth follows an abnormal pattern in experimental renal insufficiency and growth hormone treatment normalizes it." Kidney Int **70**(11): 1955-1961.

Nagamoto, N., K. Iyama, et al. (1993). "Rapid expression of collagen type X gene of non-hypertrophic chondrocytes in the grafted chick periosteum demonstrated by in situ hybridization." J Histochem Cytochem **41**(5): 679-684.

Nilsson, O. and J. Baron (2005). "Impact of growth plate senescence on catch-up growth and epiphyseal fusion." Pediatr Nephrol **20**(3): 319-322.

Nilsson, O., D. Chrysis, et al. (2003). "Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages." *J Endocrinol* **177**(2): 319-326.

Nilsson, O., R. Marino, et al. (2005). "Endocrine regulation of the growth plate." *Horm Res* **64**(4): 157-165.

Nilsson, O., R. D. Mitchum, Jr., et al. (2005). "Growth plate senescence is associated with loss of DNA methylation." *J Endocrinol* **186**(1): 241-249.

O'Connor, J. C., R. H. McCusker, et al. (2008). "Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: at the interface of immunology and endocrinology." *Cell Immunol* **252**(1-2): 91-110.

Oberger, E., I. Engstrom, et al. (1990). "Long-term treatment with glucocorticoids/ACTH in asthmatic children. III. Effects on growth and adult height." *Acta Paediatr Scand* **79**(1): 77-83.

Ohlsson, C., A. Nilsson, et al. (1992). "Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [³H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes." *J Endocrinol* **135**(1): 115-123.

Ortega, N., D. Behonick, et al. (2003). "How proteases regulate bone morphogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **995**: 109-116.

Pantsiouou, S., R. Stanhope, et al. (1991). "Growth prognosis and growth after menarche in primary hypothyroidism." *Arch Dis Child* **66**(7): 838-840.

Parker, E. A., A. Hegde, et al. (2007). "Spatial and temporal regulation of GH-IGF-related gene expression in growth plate cartilage." *J Endocrinol* **194**(1): 31-40.

Phillip, M. and L. Lazar (2005). "Precocious puberty: growth and genetics." *Horm Res* **64 Suppl 2**: 56-61.

Phillip, M., G. Maor, et al. (2001). "Testosterone stimulates growth of tibial epiphyseal growth plate and insulin-like growth factor-1 receptor abundance in hypophysectomized and castrated rats." *Endocrine* **16**(1): 1-6.

Prader, A., J. M. Tanner, et al. (1963). "Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man." *J Pediatr* **62**: 646-659.

Preece, M. A. (1988). "Prediction of adult height: methods and problems." *Acta Paediatr Scand Suppl* **347**: 4-11.

Rivkees, S. A., H. H. Bode, et al. (1988). "Long-term growth in juvenile

acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature.” N Engl J Med **318**(10): 599-602.

Robson, H., T. Siebler, et al. (2002). “Interactions between GH, IGF-I, glucocorticoids, and thyroid hormones during skeletal growth.” Pediatr Res **52**(2): 137-147.

Rosado, E., Z. Schwartz, et al. (2002). “Transforming growth factor-beta1 regulation of growth zone chondrocytes is mediated by multiple interacting pathways.” Biochim Biophys Acta **1590**(1-3): 1-15.

Ruoslahti, E. (1991). “Integrins.” J Clin Invest **87**(1): 1-5.

Saha, M. T., J. Haapasaari, et al. (2004). “Growth hormone is effective in the treatment of severe growth retardation in children with juvenile chronic arthritis. Double blind placebo-controlled followup study.” J Rheumatol **31**(7): 1413-1417.

Salmon, W. D., Jr. and V. J. Burkhalter (1997). “Stimulation of sulfate and thymidine incorporation into hypophysectomized rat cartilage by growth hormone and insulin-like growth factor-I in vitro: the somatomedin hypothesis revisited.” J Lab Clin Med **129**(4): 430-438.

Sanchez, C. P. and Y. Z. He (2002). “Alterations in the growth plate cartilage of rats with renal failure receiving corticosteroid therapy.” Bone **30**(5): 692-698.

Sanchez, C. P. and Y. Z. He (2003). “Effects of thyroparathyroidectomy, exogenous calcium, and short-term calcitriol therapy on the growth plate in renal failure.” J Am Soc Nephrol **14**(1): 148-158.

Sanchez, C. P. and Y. Z. He (2004). “Growth hormone therapy in calcium-loaded rats with renal failure.” Endocrinology **145**(7): 3375-3385.

Sanchez, C. P., I. B. Salusky, et al. (1998). “Growth of long bones in renal failure: roles of hyperparathyroidism, growth hormone and calcitriol.” Kidney Int **54**(6): 1879-1887.

Santos, F., E. Carbajo-Perez, et al. (2005). “Alterations of the growth plate in chronic renal failure.” Pediatr Nephrol **20**(3): 330-334.

Santos, F., M. Fernandez Fuente, et al. (2003). “[The growth plate in chronic renal insufficiency].” Nefrologia **23 Suppl 2**: 18-22.

Schipani, E., H. E. Ryan, et al. (2001). “Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival.” Genes Dev **15**(21): 2865-2876.

Schwartz, Z., H. Ehland, et al. (2002). "1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase." *Endocrinology* **143**(7): 2775-2786.

Segni, M., E. Leonardi, et al. (1999). "Special features of Graves' disease in early childhood." *Thyroid* **9**(9): 871-877.

Shapiro, I. M., C. S. Adams, et al. (2005). "Fate of the hypertrophic chondrocyte: microenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate." *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**(4): 330-339.

Siebler, T., H. Robson, et al. (2001). "Glucocorticoids, thyroid hormone and growth hormone interactions: implications for the growth plate." *Horm Res* **56 Suppl 1**: 7-12.

Silvestrini, G., P. Ballanti, et al. (2000). "Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high-dose treatment with corticosterone." *Bone* **26**(1): 33-42.

Simon, D. (2007). "rhGH treatment in corticosteroid-treated patients." *Hormone Research* **68**(1): 38-45.

Simon, D., C. Fernando, et al. (2002). "Linear growth and final height in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis treated with longterm glucocorticoids." *J Rheumatol* **29**(6): 1296-1300.

Simon, D., N. Lucidarme, et al. (2002). "Treatment of growth failure in juvenile chronic arthritis." *Horm Res* **58 Suppl 1**: 28-32.

Simon, D., A. Prieur, et al. (2000). "Treatment of juvenile rheumatoid arthritis with growth hormone." *Horm Res* **53 Suppl 1**: 82-86.

Simon, D., A. M. Prieur, et al. (2007). "Early recombinant human growth hormone treatment in glucocorticoid-treated children with juvenile idiopathic arthritis: a 3-year randomized study." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(7): 2567-2573.

Smink, J. J., I. M. Buchholz, et al. (2003). "Short-term glucocorticoid treatment of piglets causes changes in growth plate morphology and angiogenesis." *Osteoarthritis Cartilage* **11**(12): 864-871.

Smink, J. J., M. G. Gresnigt, et al. (2003). "Short-term glucocorticoid

treatment of prepubertal mice decreases growth and IGF-I expression in the growth plate." *J Endocrinol* **177**(3): 381-388.

Spath, S. S., A. C. Andrade, et al. (2011). "Local regulation of growth plate cartilage." *Endocr Dev* **21**: 12-22.

Spranger, J., H. Menger, et al. (1994). "Kniest dysplasia is caused by dominant collagen II (COL2A1) mutations: parental somatic mosaicism manifesting as Stickler phenotype and mild spondyloepiphyseal dysplasia." *Pediatr Radiol* **24**(6): 431-435.

Tan, J. C. and R. Rabkin (2005). "Suppressors of cytokine signaling in health and disease." *Pediatr Nephrol* **20**(5): 567-575.

Tannenbaum, G. S., O. Rorstad, et al. (1979). "Effects of prolonged food deprivation on the ultradian growth hormone rhythm and immunoreactive somatostatin tissue levels in the rat." *Endocrinology* **104**(6): 1733-1738.

Tanner, J. M. (1963). "Regulation of Growth in Size in Mammals." *Nature* **199**: 845-850.

Tanner, J. M. (1963). "The Regulation of Human Growth." *Child Dev* **34**: 817-847.

Tanner, J. M. (1981). "Catch-up growth in man." *Br Med Bull* **37**(3): 233-238.

Travis, L. B., R. Chesney, et al. (1978). "Growth and glucocorticoids in children with kidney disease." *Kidney Int* **14**(4): 365-368.

Turkel, S. and M. Pao (2007). "Late consequences of chronic pediatric illness." *Psychiatr Clin North Am* **30**(4): 819-835.

Underwood, L. E. (1999). "Growth retardation in chronic diseases: possible mechanisms." *Acta Paediatr Suppl* **88**(428): 93-96.

Underwood, L. E., P. Backeljauw, et al. (1999). "Effects of insulin-like growth factor I treatment on statural growth, body composition and phenotype of children with growth hormone insensitivity syndrome. GHIS Collaborative Group." *Acta Paediatr Suppl* **88**(428): 182-184.

van der Eerden, B. C., M. Karperien, et al. (2003). "Systemic and local regulation of the growth plate." *Endocr Rev* **24**(6): 782-801.

van der Eerden, B. C., N. P. van Til, et al. (2002). "Gender differences in expression of androgen receptor in tibial growth plate and metaphyseal bone of the rat." *Bone* **30**(6): 891-896.

Vanderschueren, D., L. Vandenput, et al. (2004). "Androgens and bone." Endocr Rev **25**(3): 389-425.

Waddington, C. H. (1959). "Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters." Nature **183**(4676): 1654-1655.

Wakita, R., T. Izumi, et al. (1998). "Thyroid hormone-induced chondrocyte terminal differentiation in rat femur organ culture." Cell Tissue Res **293**(2): 357-364.

Walker, K. V. and N. F. Kember (1972). "Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. I. Measurements in young male rats." Cell Tissue Kinet **5**(5): 401-408.

Walker, K. V. and N. F. Kember (1972). "Cell kinetics of growth cartilage in the rat tibia. II. Measurements during ageing." Cell Tissue Kinet **5**(5): 409-419.

Wang, J., J. Zhou, et al. (1999). "Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy." FASEB J **13**(14): 1985-1990.

Wang, L. S., H. J. Liu, et al. (2000). "Expression and activation of caspase-3/CPP32 in CD34(+) cord blood cells is linked to apoptosis after growth factor withdrawal." Exp Hematol **28**(8): 907-915.

Wang, W., J. Xu, et al. (2003). "Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis." J Biol Chem **278**(6): 3762-3769.

Weise, M., S. De-Levi, et al. (2001). "Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6871-6876.

Weise, M., A. Flor, et al. (2004). "Determinants of growth during gonadotropin-releasing hormone analog therapy for precocious puberty." J Clin Endocrinol Metab **89**(1): 103-107.

Wi, J. M. and B. Boersma (2002). "Catch-up growth: definition, mechanisms, and models." J Pediatr Endocrinol Metab **15 Suppl 5**: 1229-1241.

Williams, J. P. (1981). "Catch-up growth." J Embryol Exp Morphol **65 Suppl**: 89-101.

Wong, S. C., V. E. MacRae, et al. (2008). "Inflammatory cytokines in juvenile idiopathic arthritis: effects on physical growth and the insulin-like-growth factor axis." Growth Horm IGF Res **18**(5): 369-378.

Wong, S. C., V. E. Macrae, et al. (2006). "The role of pro-inflammatory cytokines in inflammatory bowel disease growth retardation." J Pediatr Gastroenterol Nutr **43**(2): 144-155.

Wu, C. W., E. V. Tchetina, et al. (2002). "Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization." J Bone Miner Res **17**(4): 639-651.

Wu, S. and F. De Luca (2004). "Role of cholesterol in the regulation of growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth." J Biol Chem **279**(6): 4642-4647.

Wu, S. and F. De Luca (2006). "Inhibition of the proteasomal function in chondrocytes down-regulates growth plate chondrogenesis and longitudinal bone growth." Endocrinology **147**(8): 3761-3768.

Wu, S., J. K. Flint, et al. (2007). "Nuclear factor-kappaB p65 facilitates longitudinal bone growth by inducing growth plate chondrocyte proliferation and differentiation and by preventing apoptosis." J Biol Chem **282**(46): 33698-33706.

Wu, S., T. Palese, et al. (2004). "Effects of Ca²⁺ sensing receptor activation in the growth plate." FASEB J **18**(1): 143-145.

Wu, S., Y. Yoshiko, et al. (2006). "Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis." J Biol Chem **281**(8): 5120-5127.

Yakar, S., C. J. Rosen, et al. (2002). "Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density." J Clin Invest **110**(6): 771-781.

Zung, A., M. Phillip, et al. (1999). "Testosterone effect on growth and growth mediators of the GH-IGF-I axis in the liver and epiphyseal growth plate of juvenile rats." J Mol Endocrinol **23**(2): 209-221.

