MARILIA BIANCA CRUZ GRECCO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO HORMÔNIO TIREODIANO NA ESTRUTURA
E FISIOLOGIA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS COM INATIVAÇÃO DO
GENE DO ADRENOCEPTOR α_{2c}**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2015

MARILIA BIANCA CRUZ GRECCO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO NA ESTRUTURA
E FISIOLOGIA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS COM INATIVAÇÃO DO
GENE DO ADRENOCEPTOR α_{2c}**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cecília Helena de Azevedo Gouveia

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Teixeira, Marília Bianca Cruz Grecco.

Avaliação do efeito do hormônio tireoidiano na estrutura e fisiologia ósseas de camundongos com inativação do gene do adrenoceptor alfa 2C / Marília Bianca Cruz Grecco Teixeira. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Fisiologia do Tecido Ósseo. Linha de pesquisa: Interação do hormônio tireoidiano e do sistema nervoso simpático na regulação da massa óssea

Versão do título para o inglês: Evaluation of the effect of thyroid hormone on bone structure and physiology of mice with inactivation of alfa 2C adrenoceptor gene.

1. Receptor alfa 2C adrenérgico 2. Hormônio tireoidiano 3. Metabolismo ósseo 4. Sistema nervoso simpático 5. Osteoclasto
I. Ferreira, Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0114/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marília Bianca Cruz Grecco Teixeira.

Título da Tese: Avaliação do efeito do hormônio tireoidiano na estrutura e fisiologia ósseas de camundongos com inativação do gene do adrenoceptor alfa 2C.

Orientador(a): Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **35** nas fls. **85** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Avaliação do hormônio tireoideano na estrutura e fisiologia óssea de camundongos com inativação dos genes dos adrenocetores Alfa 2^a e Alfa2C** do qual participou(aram) o(s) **Marília Bianca Cruz Grecco Teixeira, Gisele Miyamura Martins**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **13.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de abril de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.018.13

São Paulo, 05 de abril de 2013.

REF.: Protocolo nº 35/10.

"Avaliação do hormônio tireoideano na estrutura e fisiologia óssea de camundongos com inativação dos genes dos adrenocetores Alfa 2A e Alfa2C "

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 13.04.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Dedico este trabalho com todo amor ao meu avô, Sebastião Bento da Fonseca, que me mostrou que o que levamos dessa vida é exatamente o que deixamos aos que ficam: boas lembranças e um coração cheio de saudade.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Rosa Maria e Ricardo Augusto, que são absolutamente tudo pra mim. Sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, desde as mais simples até as completamente malucas. Esse doutorado não teria acontecido sem a compreensão, os abraços, os carinhos, as conversas e os puxões de orelha. Eles enfrentaram todos os desafios junto comigo, desde o exame de ingresso, a qualificação e finalmente a defesa. Quando decidi fazer o estágio sanduíche, eles foram junto comigo e enfrentaram mais esse desafio ao meu lado. Obrigada por ser quem são. Agradeço todos os dias a Deus por ter sido trazida a essa vida como filha deles.

A meus irmãos, Beto e Arturo que, com petelecos e abraços, me viram crescer e se tornaram parte de mim. Hoje somos muito unidos e posso contar com eles sempre. E claro, às Renatas, minhas cunhadas, queridas demais.

À Universidade de São Paulo, que me proporcionou toda a infra-estrutura necessária para a realização desse trabalho, e onde foi minha segunda casa durante muitos anos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Cecília H. de Azevedo Gouveia, que há oito anos me acolheu em seu laboratório com toda paciência, proporcionou a oportunidade de iniciar minha vida acadêmica e me ajudou muito durante todo esse percurso. Muito mais do que uma orientadora, Cecília é uma das pessoas mais humanas que já conheci, sempre com palavras positivas e um carinho no olhar, que se tornou uma amiga-mãe, com quem sempre pude contar nos momentos mais difíceis da minha vida.

À minha querida professora da Universidade Presbiteriana Mackenzie, Prof. Dra. Miriam Ribeiro, por acreditar em mim. Ela é uma das responsáveis por eu estar aqui hoje e serei eternamente grata.

Às Prof.^a Dra. Maria Luiza Barreto Chaves, Prof.^a Dra. Claudimara Loft, Prof.^a Dra. Elen Miyabara e Prof.^a Dra. Patrícia C. Brum e ao Prof. Dr. Anselmo Moriscot por diversas vezes permitirem a utilização de equipamentos em seus laboratórios.

À Dra. Tatiana de Lourdes Fonseca, por quem eu tenho muito carinho e foi quem me apresentou a vida dentro do laboratório, me ensinou desde como pegar uma pipeta até como me desenvolver no meio científico. Deixou o laboratório há

bastante tempo, mas posso contar com seu abraço e seus conselhos, com o eterno apelido carinhoso “praguinha”.

À Dra. Cristiane Cabral Costa, Prof.^a Dra. Luciane Capelo e Dra. Fátima Freitas, pelos ensinamentos quando comecei minha iniciação científica, pelo companheirismo, amizade, e eternas risadas.

À Milena Fernandes, minha grande companheira desde a faculdade. Já sorrimos e choramos muito juntas, por diversos motivos. Palavras nunca serão suficientes para demonstrar o quanto especial ela se tornou em minha vida. Uma irmã de coração, uma pessoa maravilhosa, que tem a força de uma rocha e que me inspira todos os dias a me tornar uma pessoa melhor.

A João Paulo Barros, meu melhor amigo desde quando nossa maior diversão era brincar de andar de olhos fechados no caminho de casa depois da escola. Uma pessoa indescritível, ansiosa e sonhadora igual a mim. Também enfrenta a batalha de um doutorado e divide comigo as angústias e as alegrias de não saber o que nos espera no futuro.

À Manuela Miranda, companheira de laboratório, de μ CT desligando, de trezentas corridas de PCR diárias, da cultura de células que não sobrevivem de jeito nenhum, de dropbox com problema, de desesperos com a tinta da impressora, da Kalunga, da copa, dos almoços malucos na liberdade, enfim, uma amiga que o LMO me deu por acaso, e eu agarrei com unhas e dentes, como diz minha avó. Manu, obrigada por nunca desistir de mim, mesmo com as minhas patadinhas carinhosas de todos os dias.

Aos queridos Ivson Silva, Vanessa Lima e Marina Silveira. Meus amigos incondicionais, que acompanharam boa parte da minha vida no departamento, que estavam lá quando eu precisava de abraços e quando queria dividir sorrisos e vitórias. São presentes que essa vida me deu e que levarei pra sempre comigo.

Aos amigos do grande LMO: Prof. Marcos Silva, Prof.^a Gisele Martins, Bianca Papi e Iasmin Araujo, pelas ajudas diárias, compreensão e risadas.

Aos amigos da pós-graduação: Tabata Leal, Cintia Ueta, Isadora Clivatti, Cristina Furstenu, Caroline Lino, Ana Paula Takano, Ana Paula Tiemi, Marina Fevereiro, Félix Tavares, Maria Alícia Sepulveda, Aline Marosti, Cristina Eusébio, Kelly Palombit, Barbara Passaia, Ismael Cabral, Giovane Baroni, Daniela Batagello, Tabata Bohlen, Fabio Dimov, André Santana, Maria Brito, João Guilherme Silvestre, Daniel Martins, Mara Oliveira, Priscila Rocha, Aline Giardini, Wagner Fernandes,

Diego Cury, Miguel Rangel, Cleyton Sobrinho, Regina Paradela e Regina Bonifácio. Todos foram fundamentais nessa caminhada.

À Dra. Deborah Von Novack, por me aceitar em seu laboratório, na Washington University in St. Louis, e me ensinar muito e sempre me estimular a seguir essa carreira. O estágio sanduíche em seu laboratório foi um divisor de águas em minha carreira e em minha vida. Aos amigos do laboratório Rong, Jennifer, Jenn, Chang, Corinne, Aude-Helene, Ali e Lucia cujas contribuições científicas foram de extrema importância e a amizade imensurável.

Aos amigos mackenzistas, Camilla Bruno, Daniel Scarcelli, Fernando Maeda, Diego Sangiorgi, Felipe Turra, Roberta Semer, Renato Crajoinas, Mariana Martini, Monique Verdot, Silvia Rozsa, Priscilla Orechio, Felipe Sanches, Patrícia Renno, Bruna Pacheco, Máira Guimarães, Cinthya Araujo. Fazem parte da minha vida até hoje e cada um tem lugar especial dentro do meu coração.

À amigas Gabrielle Oliveira, Itala Lima, Natália Rosa, Ana Carolina Tomazzi, Renata Di Própio, Fernanda Pompeu e Alice Valdetaro pela companhia e amizade de tantos anos.

Aos queridos Tales Takemyia, Rebeka Fanti, Lisa Paschoal e Khalil Rodrigues. Obrigada por aparecerem na minha vida e fazerem toda a diferença.

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro desde a minha iniciação científica até o doutorado.

Por último, porém não menos importante, agradeço a Deus pela vida.

“Concedei-me Senhor, a serenidade necessária para aceitar as coisas que eu não posso modificar, coragem para aceitar aquelas que eu posso, e sabedoria para distinguir umas das outras”
Oração da Serenidade

RESUMO

Teixeira, MBCG. Avaliação do efeito do hormônio tireoidiano na estrutura e fisiologia ósseas de camundongos com inativação do Gene do adrenoceptor α_{2C} . [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2015.

Evidências têm demonstrado que a hiper estimulação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) induz osteopenia via receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR), expresso em osteoblastos. Entretanto, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que camundongos com dupla inativação dos genes dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo de alta massa óssea (AMO), apesar de apresentarem hiperatividade simpática crônica e expressarem β_2 -AR. Além disso, foi demonstrado que esses camundongos *knockouts* (KO = com inativação gênica) são resistentes à osteopenia induzida pelo excesso de hormônio tireoidiano (HT). Esses achados sugerem que: o β_2 -AR não é o único adrenoceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo; que o α_{2A} -AR e/ou α_{2C} -AR também têm papel na mediação das ações do SNS no esqueleto; que o SNS interage com o HT para regular a massa óssea; e que o α_{2A} -AR e/ou α_{2C} -AR estão envolvidos na interação do HT com o SNS para regular a massa e metabolismo ósseos. Neste estudo, tivemos os seguintes objetivos: (i) avaliar se a inativação isolada do α_{2C} -AR interfere na estrutura e fisiologia ósseas, caracterizando o fenótipo ósseo de camundongos α_{2C} -AR^{-/-} e (ii) avaliar se a ação do HT no tecido ósseo depende do α_{2C} -AR, avaliando o efeito do HT na estrutura e fisiologia ósseas dos camundongos α_{2C} -AR^{-/-}. Para tanto, camundongos Selv (Selv) e α_{2C} -AR^{-/-} foram tratados com 20 vezes a dose fisiológica de T3 (7 μ g/100 gPC/dia) por 30 ou 90 dias. Vimos que o comprimento longitudinal do fêmur dos animais α_{2C} -AR^{-/-} é significativamente menor do que aquele dos animais Selv. Através da microtomografia computadorizada, vimos que o volume de osso trabecular da metáfise distal do fêmur e do corpo vertebral da quinta vértebra lombar é 15-45% menor e 30-80% maior, respectivamente, nos animais α_{2C} AR^{-/-} em relação aos animais Selv. Os animais KO também apresentaram diminuição da resistência óssea do fêmur e tíbia quando comparados aos Selv. Além disso, vimos que os animais KO foram resistentes aos efeitos deletérios da tirotoxicose no osso, tanto no fêmur quanto na vértebra. Também mostramos que osteoclastos em cultura são responsivos ao agonista seletivo para receptores adrenérgicos α_2 , o UK 14,304. O tratamento com essa droga foi capaz de diminuir a osteoclastogênese induzida por RANKL, assim como a função osteoclástica. Esses achados sugerem (i) que o α_{2C} -AR está envolvido no processo de crescimento longitudinal ósseo; (ii) que o α_{2C} -AR medeia ações do SNS no tecido ósseo; e (iii) que o HT possivelmente interage com o SNS, via α_{2C} -AR, para regular a morfofisiologia óssea.

Palavras-chave: Receptor adrenérgico α_{2C} . Hormônio tireoidiano. Metabolismo ósseo.

ABSTRACT

Teixeira, MBCG. Evaluation of the effect of thyroid hormone on the bone structure and physiology of mice with the gene inactivation of $\alpha 2C$ -adrenoceptor. [Ph.D Thesis (Morphofunctional Sciences)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2015.

Evidence demonstrates that the activation of the sympathetic nervous system (SNS) causes osteopenia via $\beta 2$ -adrenoceptor ($\beta 2$ -AR) signaling. However, a recent study by our group showed that mice with double gene inactivation of $\alpha 2A$ and $\alpha 2C$ adrenergic receptors ($\alpha 2A/\alpha 2C$ -AR $^{-/-}$) have a high bone mass phenotype (HBM), even though they present a chronic SNS hyperactivity and expression of $\beta 2$ -AR. In addition, these knockout (KO) mice are resistant to the thyroid hormone-induced osteopenia. These findings suggest that: $\beta 2$ -AR is not the single adrenoceptor involved in the control of bone metabolism, that $\alpha 2A$ and/or $\alpha 2C$ adrenoceptors may also have a role in mediating the actions of the SNS in the skeleton; that the SNS interacts with thyroid hormone (TH) to regulate bone mass and that $\alpha 2A$ and/or $\alpha 2C$ -AR are involved in this interaction. In this study, we had the following objectives: (i) to evaluate whether the isolated inactivation of $\alpha 2C$ -AR interferes with the bone structure and physiology, characterizing the bone phenotype of $\alpha 2C$ -AR $^{-/-}$ mice; and (ii) to evaluate whether the action of TH on bone tissue depends on $\alpha 2C$ -AR, assessing the effect of TH on bone structure and physiology of $\alpha 2C$ -AR $^{-/-}$ mice. Therefore, wild type (WT) and $\alpha 2C$ -AR $^{-/-}$ mice were treated with 20-fold the physiological dose of T3 (7g/100g BW/day) during 30 or 90 days. Interestingly, the longitudinal length of the femur of $\alpha 2C$ -AR $^{-/-}$ animals is significantly shorter than those of WT animals. The microtomography analysis showed that the trabecular bone volume (BV/TV) of the distal metaphysis of the femur and of the fifth lumbar vertebra were, respectively, 15-45% lower and 30-80% higher in $\alpha 2C$ -AR $^{-/-}$ mice, when compared with WT. Also, KO animals presented a decrease on the bone resistance compared to WT. In addition, KO mice present a resistance to the deleterious effects of TH excess on bone, both in the femur and vertebra. We also showed that isolated osteoclasts in culture are responsive to the selective $\alpha 2C$ -AR agonist, UK 14,304, which caused a decrease in RANKL-induced osteoclastogenesis and osteoclast function. These findings suggest that: (i) $\alpha 2C$ -AR is involved in the longitudinal bone growth; (ii) $\alpha 2C$ -AR mediates the effects of the SNS in the bone tissue; and that (iii) thyroid hormone interacts with the SNS, via $\alpha 2C$ -AR to control bone morphophysiology.

Keywords: $\alpha 2C$ Adrenergic receptor. Thyroid hormone. Bone Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Controle sistêmico da produção dos Hormônios Tireoidianos.

Figura 2 - Fêmur no apoio do teste de flexão de três pontos.

Figura 3 - Gráfico representativo da curva força-deformação

Figura 4 - Esquema de área de interesse analisada por μ CT do fêmur.

Figura 5 - Esquema da área de interesse analisada por μ CT da quinta vértebra lombar (L5).

Figura 6 - Imagem de trabéculas em formas cilíndricas e achatadas.

Figura 7 - Níveis séricos de T3 nos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou com dose suprafisiológica de T3.

Figura 8 - Níveis séricos de T4 nos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou com dose suprafisiológica de T3.

Figura 9 - Massa corporal dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou com dose suprafisiológica de T3.

Figura 10 - Massa seca do coração dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou com dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias.

Figura 11 - Massa úmida da Gordura Axilar dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou T3 durante 30 ou 90 dias.

Figura 12 - Massa úmida da Gordura Retroperitoneal dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou T3 durante 30 ou 90 dias.

Figura 13 - Comprimento corporal dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade tratados com salina ou com T3.

Figura 14 - Comprimento do Fêmur dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou com T3.

Figura 15 - Comprimento da Tíbia dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou T3.

Figura 16 - Comprimento da cauda dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade.

Figura 17 - Imagens 3D obtidas por μ CT do fêmur de camundongos Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados por 30 ou 90 dias com salina ou T3.

Figura 18 - Imagens 3D obtidas por μ CT da quinta vértebra lombar (L5) de camundongos Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados por 30 ou 90 dias com solução salina ou T3.

Figura 19 - Parâmetros biomecânicos em animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 e 90 dias.

Figura 20 - Expressão Gênica dos receptores β -adrenérgicos no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3.

Figura 21 - Expressão gênica dos receptores α -adrenérgicos no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3.

Figura 22 - Expressão gênica de genes relacionados com o metabolismo ósseo no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Figura 23 - Expressão gênica dos TR α e TR β no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Figura 24 - Expressão gênica dos receptores β -adrenérgicos na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Figura 25 - Expressão gênica dos receptores α -adrenérgicos na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Figura 26 - Expressão gênica de genes relacionados com o metabolismo ósseo no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Figura 27 - Expressão gênica dos TR α e TR β na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Figura 28 - Influência do agonista α_2 adrenérgico UK 14,304 e do antagonista Yohimbina na diferenciação osteoclástica de macrófagos oriundos da medula óssea de ossos longos (fêmur, tíbia e úmero).

Figura 29 - Influência do agonista UK 14,304 na diferenciação osteoclástica de macrófagos oriundos de ossos longos e de vértebras lombares (L4-L6).

Figura 30 - Avaliação da toxicidade das drogas adicionadas ao meio de cultura durante a diferenciação osteoclástica.

Figura 31 - Expressão dos receptores adrenérgicos em pré-osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) e a influência do agonista UK 14,304.

Figura 32 - Expressão dos marcadores de diferenciação osteoclástica e a influência do agonista UK 14,304.

Figura 33 - Expressão dos marcadores de diferenciação osteoclástica e a influência do antagonista Yohimbina.

Figura 34 - Expressão protéica da via de sinalização da MAPK e a influência do agonista UK 14,304.

Figura 35 - Expressão protéica dos fatores de diferenciação osteoclástica.

Figura 36 - Avaliação do efeito do agonista α_2 adrenérgico UK14,304 na osteoclastogênese de células previamente infectadas com o vetor de indução a hiper expressão de NFATc1.

Figura 37 - Influência do agonista UK 14,304 e do antagonista Yohimbina na formação dos anéis de actina.

Figura 38 - Influência do agonista UK 14,304 na função osteoclástica.

Figura 39 - Influência do antagonista Yohimbina na função osteoclástica.

Figura 40 - Efeito do tratamento combinado de UK+T3 na osteoclastogênese.

Figura 41 - Efeito do T3 na expressão gênica de NFATc1 e c-Fos durante a osteoclastogênese.

Figura 42 - Efeito do T3 na função osteoclástica, na formação dos anéis de actina.

Figura 43 - Efeito do tratamento combinado de UK+T3 na função osteoclástica, na formação dos pontos de reabsorção.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plano de tratamento com T3 e eutanásia dos animais ao longo do estudo

Tabela 2 – Sequência de primers para PCR em tempo real

Tabela 3 - Efeito de 30 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos de animais Selv. e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

Tabela 4 - Efeito de 90 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos de animais Selv. e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

Tabela 5 - Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias, nos parâmetros trabeculares do fêmur de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$.

Tabela 6 - Efeito do tratamento com T3, durante 90 dias, nos parâmetros trabeculares do fêmur de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$.

Tabela 7 - Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias, nos parâmetros corticais do fêmur de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

Tabela 8 - Efeito do tratamento com T3, durante 90 dias, nos parâmetros corticais do fêmur de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

Tabela 9 - Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias, nos parâmetros trabeculares da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

Tabela 10 - Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias, nos parâmetros trabeculares da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

Tabela 11 - Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias, nos parâmetros corticais da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

Tabela 12 - Efeito do tratamento com T3, durante 90 dias, nos parâmetros corticais da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	- Duas dimensões
3D	- Três dimensões
α_2-AR	- Receptor Adrenérgico α_2
β_1-AR	- Receptor Adrenérgico β_1
β_2-AR	- Receptor Adrenérgico β_2
β_3-AR	- Receptor Adrenérgico β_3
μCT	- Microtomografia Computadorizada
B.Ar	- Área da cortical
BMD	- Densidade Mineral Óssea
BV/TV	- Volume ósseo/Volume trabecular
CART	- Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CO₂	- Dióxido de carbono
Ct.Th	- Espessura cortical
DA	- Grau de anisotropia
DNAc	- DNA complementar
DXA	- <i>Dual energy X-ray Absorptiometry</i>
ELD	- Músculo Extensor Longo dos Dedos
EFTP	- Ensaio de Flexão de Três Pontos
EPM	- Erro Padrão da Média
Fig.	- Figura
FGF23	- <i>Fibroblast growth factor 23</i>
GA	- Gordura Axilar
GASTRO	- Músculo Gastrocnêmio
GH	- Hormônio do crescimento

GR	- Gordura Retroperitoneal
HT	- Hormônio tireoideo
IGF-I	- <i>Insulin Growth Factor - I</i>
KO	- <i>Knockout</i>
L2	- Segunda vértebra lombar
L3	- Terceira vértebra lombar
L4	- Quarta vértebra lombar
L5	- Quinta vértebra lombar
MEC	- Matriz Extracelular
NE	- Noradrenalina
NF-κB	- Fator Nuclear kappa B
OPG	- Osteoprotegerina
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
Po	- Porosidade da cortical
RANK	- Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
RANKL	- Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B
RF	- Músculo Reto Femoral
RNA_m	- RNA mensageiro
ROI	- Região de interesse
rT3	- T3 reverso
Selv	- Selvagem
SMI	- Índice do modelo estrutural
SNA	- Sistema Nervoso Autônomo
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNS	- Sistema Nervoso Simpático

T2	- Diiodotironina
T3	- Triiodotironina
T4	- Tetraiodotironina ou tiroxina
TA	- Temperatura Ambiente
T.Ar	- Área perióstica
Tb.N	- Número de trabéculas
T.Pm	- Perímetro do perióstio
Tb.Th	- Espessura trabecular
Tb.Sp	- Separação entre as trabéculas
TR	- Receptor de hormônio tireoideano
TRα	- Receptor de hormônio tireoideano α
TRβ	- Receptor de hormônio tireoideano β
TRAP	- Fosfatase ácida tartrato-resistente
TRH	- Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	- Hormônio tireotrófico
TSHR	- Receptor de TSH

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 O tecido ósseo.....	23
1.2 Hormônio Tireoidiano.....	27
1.3 Hormônio Tireoidiano e o tecido ósseo.....	30
1.4 Sistema Nervoso Autônomo e Sistema Nervoso Simpático.....	31
1.4.1 Sistema Nervoso Autônomo.....	31
1.4.2 Sistema Nervoso Simpático.....	31
1.5 O Sistema Nervoso Simpático e o tecido ósseo.....	33
1.6 Evidências de que o hormônio tireoidiano interage com os receptores α_2-adrenérgicos para regular a massa e metabolismo ósseos.....	36
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivos gerais.....	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Animais e tratamento.....	39
3.2 Dosagens Séricas de T3 e T4.....	40
3.3 Composição Corporal.....	40
3.4 Teste biomecânico do fêmur e da tíbia.....	41
3.5 Microtomografia computadorizada (μCT)	43
3.6 Expressão Gênica por PCR em tempo real (Real Time PCR).....	46
3.7 Metodologia <i>in vitro</i>.....	49
3.7.1 Osteoclastogênese.....	49
3.7.2 Marcação com Trap+.....	49
3.7.3 Western Blot.....	49

3.7.4 Hiper expressão de NFATc1.....	50
3.7.5 Anéis de Actina.....	50
3.7.6 Pontos de Reabsorção óssea.....	50
3.7.7 Viabilidade celular (MTT test).....	51
3.8 Análise Estatística.....	51
4 RESULTADOS <i>IN VIVO</i>.....	52
4.1 Dosagens Séricas de T3 e T4.....	52
4.2 Composição corporal.....	53
4.2.1 Massa corporal.....	53
4.2.2 Massa seca do coração e músculos esqueléticos.....	54
4.2.3 Massa úmida de gordura.....	57
4.2.4 Comprimento corporal.....	59
4.2.5 Comprimento do fêmur.....	60
4.2.6 Comprimento da tíbia.....	61
4.2.7 Comprimento da cauda.....	62
4.3 Microtomografia Computadorizada.....	63
4.3.1 Fêmur.....	63
4.3.1.1 Trabecular.....	63
4.3.1.2 Cortical.....	65
4.3.2 Vértebra.....	67
4.3.2.1 Trabecular.....	67
4.3.2.2 Cortical.....	69
4.4 Teste Biomecânico.....	71
4.5 Expressão Gênica.....	73
4.5.1 Fêmur.....	73

4.5.2 Vértebra.....	76
5 RESULTADOS <i>IN VITRO</i>.....	79
5.1 Osteoclastogênese.....	79
5.2 Teste de toxicidade (MTT test).....	81
5.3 Expressão gênica.....	82
5.4 Expressão protéica.....	84
5.5 Hiper Expressão de NFATc1.....	86
5.6 Anéis de Actina.....	88
5.7 Pits de Reabsorção óssea.....	88
5.8 Influência do hormônio tireoidiano na diferenciação e função osteoclástica e sua interação com o SNS.....	89
6 DISCUSSÃO.....	93
6.1 Caracterização do fenótipo ósseo de camundongos com inativação do receptor adrenérgico α_{2C}.....	93
6.2 Efeito do HT no esqueleto de animais α_{2C}-AR^{-/-}.....	97
6.3 Caracterização da cultura de osteoclastos e a influência dos receptores α_{2C}-AR na osteoclastogênese e função osteoclástica.....	100
7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	104
8 CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO	
A MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA PLoS ONE EM 30/07/2015.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo

Um osso consiste, principalmente, de tecido ósseo, mas também é composto por outros tecidos, como tecido hematopoiético, cartilaginoso, adiposo, além dos vasos sanguíneos e nervos (1). Os ossos apresentam três funções básicas: (i) mecânica: local de inserção e suporte da musculatura, constituindo um sistema de alavancas que amplia a força gerada na contração muscular; (ii) protetora: para órgãos, como os contidos nas caixas craniana e torácica; e (iii) metabólica: sendo local de reserva de íons como cálcio e fosfato, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, e participando, portanto, da homeostase mineral (2, 3).

Nos últimos anos, uma série de evidências têm demonstrado que o tecido ósseo também tem função endócrina (4). Detectou-se que o tecido ósseo produz o fator de crescimento fibroblástico 23 (*fibroblast growth factor 23* – FGF23) e a osteocalcina, que atuam, respectivamente, no metabolismo mineral e no metabolismo da glicose. O FGF23 é produzido por osteócitos, circula como um hormônio e age no rim estimulando a excreção urinária de fósforo (4). A osteocalcina circulante, sintetizada pelos osteoblastos, aumenta a síntese, secreção e sensibilidade à insulina e aumenta a utilização da glicose e o gasto energético (5).

A superfície externa dos ossos é recoberta pelo *periósteo*, uma bainha de tecido conjuntivo não modelado, enquanto a superfície interna é recoberta pelo *endósteo*. Nos ossos, o espaço que aloja a medula óssea é chamado de *cavidade medular*. Anatomicamente, os ossos longos são subdivididos nas seguintes regiões: (a) *epífise*: abrangem as extremidades distal e proximal do osso; (b) *diáfise*: é o chamado corpo do osso, sendo a sua maior parte alongada e cilíndrica; (c) *metáfise*: em um osso maduro, são as regiões em que as diáfises se unem às *epífises*. Já em um osso em crescimento, cada metáfise inclui uma lâmina epifisial, que compreende uma camada de cartilagem hialina responsável pelo crescimento longitudinal do osso, e (d) *cartilagem articular*: camada de cartilagem hialina que recobre a face articular do osso: (1, 6).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado como osso cortical (ou compacto) e osso trabecular (ou esponjoso). O osso cortical, que representa aproximadamente 80% da massa esquelética, predomina nos ossos longos e

apresenta, principalmente, função mecânica e de proteção, já que resiste às forças produzidas pelo peso e movimento (1). Já o osso trabecular é encontrado predominantemente no esqueleto axial e no interior de ossos longos, dentro de suas extremidades expandidas (metáfises e epífises) (3). O osso esponjoso é formado por lamínulas ósseas irregulares em forma e tamanho, chamadas trabéculas, que dá resistência adicional aos ossos, além de acomodar a medula óssea por entre suas traves ósseas (6).

Microscopicamente, o tecido ósseo consiste de uma porção celular e de uma matriz extracelular (MEC). A MEC possui um componente orgânico (35%) e um inorgânico (65%). A sua fase orgânica é formada por colágeno (predominantemente, colágeno do tipo I), proteínas não colágenas (osteocalcina, osteonectina, etc.), glicosaminoglicanas e lipídios. A fase inorgânica é, predominantemente, constituída por cálcio e fósforo (3). Durante o processo de mineralização óssea, o cálcio e o fósforo são depositados como sais amorfos sobre a matriz extracelular e se organizam em estruturas cristalinas, similares aos cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

As principais células ósseas são: (a) as células osteoprogenitoras, que dão origem aos osteoblastos, (b) os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea, (c) os osteócitos, responsáveis pela manutenção da MEC, (d) os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea e (e) as células de revestimento ou de superfície, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas.

As células osteoprogenitoras são derivadas das células mesenquimais que se diferenciam em células da linhagem osteoblástica (pré-osteoblastos proliferativos, osteoblastos produtores de matriz e osteócitos).

Os osteoblastos são células mononucleadas responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz extracelular: o colágeno e as proteínas não colágenas (7). Além disso, essas células controlam o processo de mineralização da matriz extracelular. Devido a sua alta atividade metabólica de síntese protéica, os osteoblastos apresentam retículo endoplasmático e complexo de Golgi bastante desenvolvidos, além de um grande número de ribossomos (7).

Os osteócitos constituem o tipo celular mais abundante do osso maduro e são encontrados incrustados por toda a matriz óssea. Essas células se diferenciam a partir de osteoblastos maduros. Aproximadamente 20% dos osteoblastos tornam-se

encarcerados pelo seu próprio produto, a matriz extracelular, o que causa alteração do metabolismo, morfologia e função dessas células, passando a serem chamadas de osteócitos (7). Os osteócitos mantêm contato uns com os outros, com osteoblastos e com células de revestimento (que são células da linhagem osteoblástica) encontradas nas superfícies ósseas, através de uma vasta rede de extensões citoplasmáticas localizadas no interior de canalículos ósseos (8). As funções dos osteócitos ainda não são totalmente conhecidas, mas estudos mostram que eles são fundamentais na manutenção da integridade da matriz.

Os osteoclastos se originam a partir de células mesenquimais hematopoiéticas, e são células móveis, ramificadas, multinucleadas (4-20 núcleos) e gigantes. Essas células são responsáveis pela reabsorção óssea (9), sendo que a sua atividade é coordenada por citocinas e por alguns hormônios, tais como a calcitonina, paratormônio, vitamina D, glicocorticóides, estradiol e hormônio tireoidiano (3).

A integridade mecânica do tecido ósseo e a capacidade de sustentação de altas cargas são mantidas pela remodelação óssea, um processo baseado nas ações equilibradas de reabsorção pelos osteoclastos e de formação pelos osteoblastos durante toda a vida (10, 11). O ciclo de remodelação começa com a fase de ativação, momento em que células mononucleadas do tecido hematopoiético se diferenciam em osteoclastos e migram para o sítio ósseo a ser remodelado. Em seguida, ocorre a reabsorção óssea pelos osteoclastos, com a consequente formação de uma lacuna óssea, denominada lacuna de Howship. A próxima etapa é a fase reversa, momento em que os osteoclastos deixam o sítio de remodelação óssea e em que as células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos, os quais são recrutados para a lacuna de Howship. A etapa seguinte é a formação óssea. Nessa etapa, os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica que, por sua vez recobre a lacuna de reabsorção. Os osteoblastos coordenam, ainda, a mineralização dessa matriz, num processo que dura aproximadamente três semanas.

Em situações de normalidade, o processo completo leva aproximadamente 200 dias em cada “sítio de remodelamento”, chamado de unidade multicelular óssea (BMU - Bone Multicellular Unit) (11, 12). O tamanho desses sítios varia conforme a idade, sendo em média de 40 μm em indivíduos jovens e 60 μm em adultos e

idosos. O período de reabsorção dura de 30 a 40 dias e o de formação aproximadamente 150 dias (13).

Há fatores de transcrição relacionados à diferenciação celular que participam da regulação do processo de remodelamento ósseo. Um exemplo é o fator 2 de transcrição ligado ao Runx, o Runx 2, que é indispensável para que haja a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (14). Durante o processo de diferenciação, o Runx-2 regula a expressão de diversas proteínas como osteocalcina, esclerostina e RANKL (15).

A diferenciação e atividade dos osteoclastos são moduladas, principalmente, pela via RANK/RANKL/OPG, sendo que esta via depende da participação dos osteoblastos. O ligante do receptor ativador do NF- κ B, o RANKL, é um membro da superfamília dos ligantes dos fatores de necrose tumoral (TNF). Ele é sintetizado pelos osteoblastos e se liga ao seu receptor, o RANK, uma proteína transmembrânica do tipo I, da superfamília dos receptores de TNF (16). O RANK está presente na membrana plasmática de células precursoras de osteoclastos e de osteoclastos maduros. A interação RANKL-RANK induz a osteoclastogênese e a atividade osteoclástica (17, 18), levando, portanto, a um aumento da reabsorção óssea.

Vale ser dito que o RANKL está presente em diversos tecidos, como linfonodos, glândulas mamárias, células T ativadas e pulmonares (19), além da superfície das células osteoblásticas. Ele também está relacionado a diversos processos fisiológicos, como lactação durante a gestação (20), controle de migração de células tumorais (17), além da diferenciação e ativação de osteoclastos (16, 21, 22). O RANK, por sua vez, é também expresso nas glândulas mamárias (20), e em alguns tipos de tumores malignos como o de próstata e de mama (23, 24), tumores com alto potencial de metástase óssea.

A osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína solúvel sintetizada pelos osteoblastos, mas que também está presente no coração, rim, fígado e baço (25). A OPG se liga ao RANKL e, dessa forma, bloqueia a ligação RANK/RANKL, o que limita a diferenciação, sobrevivência e atividade dos osteoclastos (26). O estrógeno, por exemplo, aumenta a produção de OPG e diminui a de RANKL pelos osteoblastos limitando, portanto, a reabsorção óssea, o que explica, pelo menos

parcialmente, a alta incidência de osteoporose em mulheres após a menopausa (27).

É válido dizer, ainda, que condrócitos hipertróficos e pré-hipertróficos expressam RANK, RANKL e OPG. Animais deficientes de RANKL desenvolvem osteopetrose devido a não formação de osteoclastos e possuem uma camada mais grossa de cartilagem hipertrófica em suas lâminas epifisiais, sugerindo, portanto, que condrócitos hipertróficos estejam ligados à diferenciação de precursores osteoclásticos na cartilagem de crescimento (16).

A descoberta destas interações celulares entre os condrócitos, osteoblastos e osteoclastos permitiu um maior entendimento sobre o remodelamento ósseo, tanto em condições fisiológicas quanto em estados patológicos, como a osteoporose, osteopetrose e artrite reumatoide.

1.2 Hormônio Tireoidiano

A glândula tireóide tem origem endodérmica que se desenvolve precocemente na porção cefálica do tubo digestivo (3) e está localizada imediatamente inferior à laringe, ocupando as regiões laterais e anterior da traquéia. Possui dois lobos que são unidos por um istmo e é envolta por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo. É uma glândula bem importante e secreta dois hormônios principais, a *tiroxina* e a *triiodotironina*, habitualmente chamados de T4 e T3, respectivamente. Menos de 1% da produção tireoidiana é representado por outras iodotironinas, o T3 reverso (rT3) e a diiodotironina (T2) (28). A glândula é formada principalmente por folículos da glândula tireóide, que compreendem sacos esféricos e microscópicos formados por epitélio simples que contém uma substância gelatinosa chamada colóide em suas cavidades. A parede de cada folículo consiste, principalmente, de células chamadas foliculares, que em sua maioria se estendem até o lúmen do folículo e produzem os hormônios T3 e T4. Também há as células parafoliculares ou células C, que se encontram em menor número, mas que apresentam importante função na produção do hormônio calcitonina, que participa da regulação da homeostase do cálcio (1).

Neurônios mediais do núcleo paraventricular do hipotálamo produzem um hormônio chamado TRH (hormônio liberador da tireotrofina), que estimula, por sua

vez, a produção do TSH, hormônio estimulante da tireóide, pela porção anterior da glândula hipófise, a adenohipófise (29, 30). Esse hormônio atua diretamente no receptor de TSH (TSH-R), que é, por sua vez, expresso na membrana basolateral das células foliculares da tireóide (31). Essa alça de controle é chamada de eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide (Fig. 1).

As células foliculares produzem os hormônios tireoidianos, a 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina ou T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3), através de um processo que envolve o transporte ativo de iodo para dentro da célula folicular, além da sua oxidação e incorporação em resíduos tirosina na molécula de tireoglobulina (32-34). Esta iodonização de tirosinas resulta em resíduos monoiodinados (MIT) e diiodinados (DIT), que são enzimaticamente ligados para sintetizar os hormônios. A tireoglobulina iodada, que contém MIT, DIT, T4 e T3, é armazenada no colóide, próximo ao lúmen das células foliculares da tireóide. A liberação dos hormônios pela célula folicular envolve a endocitose e digestão lisossomal da tireoglobulina.

A glândula tireóide produz principalmente T4, considerado um pró-hormônio, que é convertido a T3 pelas desidases das iodotironinas do tipo 1 (D1) e 2 (D2) (Fig. 1). Em mamíferos adultos, a D1 é expressa principalmente no fígado, rins e tireóide (35), enquanto a D2 é expressa no Sistema Nervoso Central, tecido adiposo marrom, hipófise, placenta, útero e também no tecido ósseo (35). Essa conversão mantém a quantidade de T3 na circulação periférica. Uma terceira enzima, a desidase das iodotironinas do tipo 3 (D3), inativa o hormônio tireoidiano, convertendo o T3 e T4 a formas inativas, o T2 e T3 reverso (T3r), respectivamente. A D3 é expressa no cérebro, ovários, testículos, placenta, útero e também no tecido ósseo (36). A disponibilidade de T3 intracelular é regulada principalmente pela D2 e D3. Em situações de hipotireoidismo, a atividade da D2 é aumentada e, na tirotoxicose, diminuída. De forma oposta, a expressão e atividade da D3 são aumentadas na tirotoxicose e diminuídas em situação de deficiência de hormônio tireoidiano. Dessa forma, o controle local da expressão e atividade dessas desidases compõe um mecanismo homeostático que regula a resposta de tecidos alvo do hormônio tireoidiano (37).

Figura 1 – Controle sistêmico da produção dos Hormônios Tireoidianos

Status circulatório da manutenção da produção de Hormônios Tireoidianos pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide. O TRH estimula a liberação de TSH pela porção anterior da hipófise. O TSH, por sua vez, estimula a produção e secreção de T4 e T3 pela tireóide, resultando em um feedback negativo da produção de TRH e secreção de TSH. A D1 converte T4 em T3 no fígado, contribuindo significativamente para a quantidade de T3 circulante (29).

O hormônio tireoidiano entra em suas células alvo através de transportadores protéicos (38), que incluem os transportadores monocarboxilados MCT8 e MCT10 e o OATP1C1 (*sodium independent organic anion transporter protein-1C1*) (39, 40). A ação do hormônio tireoidiano depende da sua interação com os seus receptores nucleares, os receptores de hormônio tireoidiano (TRs), que agem como fatores de transcrição. Há dois genes que codificam TRs, o TRα e o TRβ, os quais codificam, por *splicing* alternativo, o TRα1 e TRα2 e o TRβ1 e TRβ2, respectivamente. As quatro isoformas de TRs apresentam domínio de ligação ao DNA (DBD). Por outro lado, o TRα1, TRβ1 e TRβ2 possuem domínio de ligação ao ligante (LBD) e, portanto, se ligam ao T3, enquanto o TRα2 não apresenta LBD e, age como um fraco antagonista do hormônio tireoidiano (30). O TRβ2 é primariamente expresso no hipotálamo e na hipófise, participando do eixo Hipotálamo-Hipófise-Tireóide e,

portanto, da inibição da síntese e secreção de TRH e do TSH pelo T3, por feedback negativo (41). Tanto o TR α 1 quanto o TR β 1 são expressos, de forma heterogênea, na maioria dos tecidos corporais. No esqueleto, observa-se a expressão de ambos os receptores, sendo que, no tecido ósseo, a expressão do TR α é dez vezes maior do que do TR β (42, 43).

As ações mais conhecidas do hormônio tireoidiano são resultados da interação T3-TR, sendo, portanto, ações genômicas. Entretanto, há uma série de evidências de que o hormônio tireoidiano também tem ações não genômicas, que dependem da interação do T3 e/ou T4 com fatores presentes nas membranas celulares e/ou no citoplasma das células alvo (44, 45).

1.3 Hormônio tireoidiano e o tecido ósseo

O hormônio tireoidiano (HT) é essencial para o desenvolvimento, crescimento e metabolismo ósseos. A triiodotironina (T3) estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea, através da regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos (46).

Crianças com deficiência de HT (hipotireoideas) apresentam retardo no desenvolvimento esquelético, redução da espessura das lâminas epifisiais (LE), desorganização dos condrócitos das LEs e diminuição da diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas (47, 48). Em contraste, crianças com hipertireoidismo (excesso de hormônio tireoidiano) apresentam maturação esquelética acelerada, fechamento prematuro das LEs e subsequente diminuição do crescimento dos membros e do peso corporal (49).

Na resistência ao HT, uma patologia causada pela diminuição da responsividade tecidual ao hormônio tireoidiano (50), também se observa uma série de anormalidades esqueléticas, como baixa estatura, osteoporose e más formações craniofaciais (51, 52). Dessa forma, as evidências clínicas de crianças com hipotireoidismo, hipertireoidismo e resistência ao HT indicam a importância fundamental desse hormônio no desenvolvimento e crescimento normal do esqueleto.

O hormônio tireoidiano também possui influência no esqueleto adulto, uma vez que participa da regulação do metabolismo ósseo, ativando tanto a síntese quanto a degradação da matriz óssea. Diversos estudos mostram que, em condições de hipertireoidismo, a atividade dos osteoblastos e osteoclastos está aumentada, com predomínio da última (53-55). Dessa forma, o metabolismo ósseo está acelerado, favorecendo a reabsorção, criando então, um balanço negativo do cálcio e perda de massa óssea. O aumento do metabolismo ósseo no hipertireoidismo é caracterizado pelo aumento do número de osteoclastos, das superfícies de erosão, da taxa de formação e mineralização óssea (49). O ciclo de remodelamento ósseo, que é de aproximadamente de 200 dias em humanos, é reduzido por causa de uma diminuição da duração do período de formação (30, 56, 57). A consequência desse desbalanço é uma aguda diminuição do número e volume trabecular, assim como um afinamento das trabéculas ósseas.

De forma oposta, em situações de hipotireoidismo, há uma diminuição no metabolismo ósseo, sendo que pequenos aumentos na massa óssea podem ser observados (29, 58).

1.4 Sistema Nervoso Autônomo e Sistema Nervoso Simpático

1.4.1 Sistema Nervoso Autônomo

Com base em critérios funcionais, o Sistema Nervoso pode ser dividido em Sistema Nervoso Somático e Sistema Nervoso Visceral. Como os próprios nomes sugerem, o Somático é responsável pela vida de relação, enquanto que o Visceral controla a vida vegetativa. Ambos possuem componentes aferentes e eferentes, no entanto, diferentemente do Somático, a eferência Visceral não atinge o nível de consciência, ocorrendo de forma autônoma. Dessa maneira, convencionou-se chamar essa divisão do Sistema Nervoso Visceral de Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (59).

Característica marcante do SNA é a existência de dois neurônios para conectar o Sistema Nervoso Central (SNC) ao órgão efetuator. Um deles apresenta seu corpo dentro do SNC (tronco encefálico ou medula espinal), enquanto o outro tem o corpo localizado no Sistema Nervoso Periférico (SNP), em agrupamentos de

corpos neuronais chamados de gânglios. Sendo assim, o neurônio cujo corpo está no SNC é denominado pré-ganglionar, e o neurônio cujo corpo está em gânglios é denominado pós-ganglionar. Os impulsos nervosos que seguem pelo SNA terminam em músculo estriado cardíaco, músculo liso ou glândula. Assim, o SNA é involuntário (6).

Além das diferenças com a divisão eferente do Sistema Nervoso Somático, o próprio SNA apresenta diferenças internas, baseadas em fatores anatômicos, farmacológicos e fisiológicos de seus neurônios. Desta forma, o SNA é subdividido em partes Simpática e Parassimpática (59).

Entende-se por fatores anatômicos a localização dos corpos dos neurônios pré e pós-ganglionares, bem como o tamanho de suas fibras. A posição dos neurônios pré-ganglionares no Sistema Nervoso Simpático (SNS) é na medula torácica e lombar (entre T1 e L2), diz-se, assim, que o SNS é tóraco-lombar. No Sistema Nervoso Parassimpático (SNP), elas se localizam no tronco encefálico (portanto, dentro do crânio) e na medula sacral (S2, S3 e S4). Diz-se que o SNP parassimpático é crânio-sacral. Com relação aos neurônios pós-ganglionares, no SNS, se localizam longe das vísceras e próximo da coluna vertebral, formando os gânglios paravertebrais e pré-vertebrais, já no SNP, os neurônios pós-ganglionares se localizam próximo ou dentro das vísceras (6).

Os aspectos fisiológicos levam em conta as ações geradas pelas partes dessa divisão. Já os aspectos farmacológicos, dizem respeito aos tipos de neurotransmissores que são principalmente usados pelas fibras pós-ganglionares (acetilcolina ou noradrenalina). Sabemos, hoje, que a ação da fibra nervosa sobre o efetador (músculo ou glândula) se faz por liberação de um neurotransmissor. Os neurotransmissores mais importantes são a noradrenalina e acetilcolina. As fibras nervosas que liberam a acetilcolina são chamadas colinérgicas e as que liberam noradrenalina, adrenérgicas. As fibras que secretam noradrenalina ativam receptores adrenérgicos e as que secretam acetilcolina ativam receptores colinérgicos (59).

O SNS e SNP diferem no que se refere à disposição das fibras adrenérgicas e colinérgicas. Geralmente, as fibras pré-ganglionares, tanto simpáticas como parassimpáticas, e as fibras pós-ganglionares parassimpáticas são colinérgicas. Contudo, a grande maioria das fibras pós-ganglionares do SNS é adrenérgica.

Fazem exceção as fibras que inervam as glândulas sudoríparas e os vasos dos músculos estriados esqueléticos, que apesar de serem simpáticas, são colinérgicas (6).

1.4.2 O sistema nervoso simpático (SNS)

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA), como dito anteriormente, constitui o componente eferente do Sistema Nervoso Visceral. Este se divide em Sistema Nervoso Simpático (SNS) e Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). A grande maioria das fibras pós-ganglionares simpáticas tem a noradrenalina como neurotransmissor, sendo, portanto, adrenérgica (59). Há receptores α -adrenérgicos e/ou β -adrenérgicos nas células alvo desse sistema, sendo que há nove subtipos de receptores adrenérgicos, três α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}) (60), α_2 (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) e β (β_1 , β_2 e β_3) (61).

Todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos são ativados pela adrenalina e noradrenalina, entretanto, a função fisiológica de cada subtipo de receptor adrenérgico ainda não é totalmente conhecida. Os únicos que possuem ligantes seletivos para cada subtipo de receptor são os β -adrenérgicos. Agonistas para receptores β_2 -AR têm um importante papel na terapia da asma, ao passo que antagonistas dos receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR) são utilizados como medicação de primeira linha para pacientes com hipertensão, doenças coronárias ou falência cardíaca (62).

Apenas os receptores α_2 inibem a liberação de noradrenalina pelas terminações simpáticas e por neurônios adrenérgicos no sistema nervoso central (SNC) (12), atuando, portanto, como autorreceptores. Estes são receptores localizados em membranas pré-sinápticas que tem como ligantes apenas os neurotransmissores liberados pelos neurônios em que estão situados. A ligação receptor-neurotransmissor inibe a liberação do próprio neurotransmissor. Dessa forma, os autorreceptores fazem parte de uma alça de feedback negativo que modula a liberação de neurotransmissores. Assim sendo, apenas os adrenoceptores α_2 modulam a liberação das catecolaminas.

Além de estarem localizados em membranas pré-sinápticas de terminações simpáticas e em neurônios adrenérgicos do sistema nervoso central, os α_{2C} – ARs

estão localizados em uma série de tecidos, incluindo vasos, veias, miométrio e ilhotas pancreáticas (60) e atuam na regulação da pressão arterial, do processo de analgesia e sedação, da modulação do comportamento e controlam negativamente a liberação de noradrenalina, entre outros efeitos (63). Os receptores α_1 localizam-se no SNC, átrio direito, ventrículo, fígado, baço, íleo, glândulas parótidas, mucosa nasal, bexiga, uretra, corpo cavernoso, próstata e também nos vasos e veias de diversos tecidos (60), atuando principalmente na regulação do tônus vascular e no desenvolvimento cardíaco (62).

Já os receptores β adrenérgicos localizam-se nos vasos sanguíneos e no coração e participam da regulação do sistema cardiovascular e do metabolismo do tecido adiposo (62). As isoformas desses receptores, em sua maioria, estimulam a adenilato ciclase, induzindo, assim, a síntese de AMPc (64), que é, portanto, o segundo mensageiro das ações da noradrenalina mediadas por esses receptores. Por outro lado, os receptores α_2 inibem a adenilato ciclase e, portanto, diminuem a formação de AMPc, muitas vezes antagonizando as ações mediadas pelos receptores β -adrenérgicos.

1.5 O Sistema Nervoso Simpático e o Tecido Ósseo

A investigação da ação do SNS sobre o tecido ósseo teve início ao se estudar um pequeno hormônio polipeptídico, secretado principalmente por adipócitos, a leptina. Estudos mostraram que, além de agir sobre o controle do peso corporal e da função gonadal (65), a leptina inibe a formação óssea, isto é, tem um importante efeito antiosteogênico, quando atua no Sistema Nervoso Central (66), mais precisamente no núcleo ventromedial do hipotálamo (67, 68). A infusão de doses mínimas de leptina no terceiro ventrículo leva a marcantes reduções da massa óssea, tanto em camundongos selvagens quanto em deficientes de leptina. Através de lesões no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), demonstrou-se que esse núcleo medeia o efeito central da leptina (69). Além disso, estudos mostraram que esse efeito é mediado pelo SNS e, mais especificamente, pelos receptores β_2 -adrenérgicos (70), ou seja, a leptina, atuando centralmente, ativa o SNS (71), e este atua no tecido ósseo através dos receptores β_2 -adrenérgicos, presentes nos osteoblastos.

Takeda et al, demonstrou que o SNS regula negativamente a formação óssea in vivo (69), além de demonstrarem a presença de receptores β_2 -adrenérgicos em culturas primárias de osteoblastos e em osteoblastos de ossos longos de camundongos, não encontrando outro receptor β adrenérgico nessas células. A funcionalidade dos receptores β_2 -adrenérgicos nos osteoblastos foi demonstrada tratando-se essas células, em cultura, com noradrenalina ou isoproterenol, um agonista β -adrenérgico não seletivo, e medindo-se a produção de AMPc. O isoproterenol e a noradrenalina aumentaram a produção de AMPc, sendo que esses efeitos foram inibidos pelo propranolol. Demonstrou-se, ainda, que a proliferação osteoblástica é inibida pelo isoproterenol, efeito este que é anulado pelo tratamento com o propranolol. Takeda e seus colaboradores mostraram, em 2002 (69), que o tratamento de camundongos selvagens e ob/ob (obesos e deficientes de leptina) com isoproterenol resultou em uma importante perda de massa óssea nas vértebras e ossos longos, secundária a uma diminuição na taxa de formação óssea e no número de osteoblastos, enquanto que a reabsorção óssea não foi alterada e nem o peso corporal. Além disso, demonstrou-se, por microscopia eletrônica, a presença de fibras nervosas amielínicas na medula óssea adjacente às trabéculas ósseas e aos osteoblastos. Esses achados indicam o SNS, atuando via receptores β_2 adrenérgicos (β_2 -AR), como um regulador da formação óssea independentemente do seu efeito no peso corporal.

O estudo de camundongos com inativação gênica do β_2 -AR (β_2 -AR^{-/-}) trouxe importantes evidências com relação ao papel do SNS no controle do remodelamento ósseo (70). Esses camundongos apresentam níveis séricos normais de leptina e estrógeno, e apresentam uma massa óssea ainda mais elevada do que aquela dos animais Ob/Ob, associada a um aumento da formação óssea e redução da reabsorção óssea. Esse fenótipo é mais uma forte evidência do papel inibitório do SNS sobre a formação óssea, além de sugerir que o SNS também ative a reabsorção óssea. Por outro lado, a infusão intracérebro ventricular de leptina nos camundongos β_2 -AR^{-/-} não causou qualquer efeito sobre a formação e reabsorção óssea, o que também evidencia a importância do SNS em mediar a ação da leptina, via receptores β_2 -adrenérgicos, na regulação do remodelamento ósseo.

Surpreendentemente, estudos recentes realizados em nosso laboratório demonstraram que camundongos com inativação gênica dos adrenoceptores α_{2A} e

α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) também apresentaram um fenótipo de alta massa óssea (72). Além disso, observamos a presença de receptores α_{2A} e α_{2C} adrenérgicos (α_{2A} -AR e α_{2C} -AR, respectivamente) no tecido ósseo da tíbia de camundongos selvagens. Como dito anteriormente, os receptores α_2 adrenérgicos são autorreceptores e, portanto, inibem a liberação de catecolaminas pelas terminações nervosas simpáticas e pelos neurônios adrenérgicos do SNC (73). Uma evidência disso é que a ativação destes receptores no tronco cerebral leva a uma redução do tônus simpático (74, 75).

Hein et al (12); em 1999, através da inativação dos genes dos receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2C} e α_{2A}/α_{2C} de camundongos, mostraram que os subtipos α_{2A} e α_{2C} são requeridos para o controle da liberação de noradrenalina pelos nervos simpáticos no coração e pelos neurônios adrenérgicos centrais. Mostraram, ainda, que o α_{2A} -AR inibe a liberação de noradrenalina quando estimulado em alta frequência, enquanto que o receptor α_{2C} modula a neurotransmissão em baixa frequência de estimulação nervosa. Além disso, mostraram que a regulação de alta e baixa frequência parecem ser importantes fisiologicamente, uma vez que camundongos com a dupla deleção dos receptores α_{2A} e α_{2C} (camundongos α_{2A}/α_{2C} AR^{-/-}) apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de noradrenalina e desenvolveram hipertrofia cardíaca, o que configura aumento do tônus simpático.

Diante das fortes evidências de que a estimulação simpática tem efeito negativo sobre a massa óssea e do fato de que os camundongos α_{2A}/α_{2C} AR^{-/-} apresentam aumento do tônus simpático, o fenótipo de alta massa óssea apresentado por esses animais era totalmente inesperado. Esta observação somada à presença de receptores α_{2A} e α_{2C} no tecido ósseo, sugere que esses receptores, e não só os β_2 -ARs, sejam importantes para mediar as ações osteopênicas do SNS.

1.6 Evidências de que o hormônio tireoidiano interage com o SNS via receptores α_2 adrenérgicos para regular a massa e metabolismo ósseos

Uma característica importante do HT, mas ainda pouco entendida, é a sua interação com o SNS. É bem sabido que essa interação é necessária para que ocorra a máxima termogênese, lipólise, glicogenólise e gluconeogênese (76). Estudos anteriores mostraram que pacientes com hipertireoidismo apresentam

hiperatividade simpática (77). Considerando que o excesso de HT causa perda de massa óssea e que a ativação do SNS também apresenta efeito negativo na massa óssea, levantamos a hipótese de que o HT também interage com o SNS para regular o metabolismo ósseo e, conseqüentemente, a massa óssea. Uma evidência dessa possível interação é o fato de que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol (um antagonista β -adrenérgico) corrige secundariamente a hipercalcemia (78). Além disso, pacientes com hipotireoidismo tratados com propranolol apresentam redução da excreção de hidroxiprolina pela urina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea (79).

Para investigar essa hipótese, camundongos fêmeas selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ de 40 dias de idade foram tratados com aproximadamente 10 vezes a dose fisiológica de T3 ($10 \times T3 = 3,5 \mu\text{g}/100\text{g PC}/\text{dia}$) durante 80 dias ou permaneceram sem tratamento (Selv e KO controles) (80). Como esperado, os animais Selv tratados com T3 apresentaram diminuição na densidade mineral óssea (DMO) do fêmur (13%, $p < 0,01$), vértebras (14%, $p < 0,001$) e corpo posterior, que inclui a coluna lombar, pélvis e membros posteriores (11%, $p < 0,01$). Surpreendentemente, vimos que os animais KO tratados com T3 não apresentaram diminuição da DMO, ou seja, são resistentes à osteopenia induzida pelo T3. Observamos, ainda, que o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e $\alpha_{2C}\text{-AR}$ são expressos na tíbia de camundongos Selv e nas células osteoblásticas MC3T3-E1. Além disso, vimos que o T3 inibe a expressão do $\alpha_{2C}\text{-AR}$ no osso de camundongos. Também observamos que o T3 reduziu significativamente a expressão da osteoprotegerina (OPG), uma proteína que limita a atividade osteoclástica, nos animais Selv, mas não nos animais KO (72).

Assim sendo, os nossos estudos sugerem que o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e/ou $\alpha_{2C}\text{-AR}$ apresentam um papel importante na fisiologia óssea, e que o SNS interage com o HT através desses receptores para regular a massa óssea. Para a confirmação dessas hipóteses, fez-se necessário caracterizar o fenótipo ósseo e estudar o efeito do HT em camundongos com inativação individual do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e $\alpha_{2C}\text{-AR}$. Considerando-se que o $\alpha_{2C}\text{-AR}$ se mostrou responsivo ao HT, no presente estudo, avaliamos o efeito do tratamento com dose suprafisiológica de T3 na morfofisiologia óssea de camundongos com inativação isolada do $\alpha_{2C}\text{-AR}$ ($\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$). Além disso, caracterizamos o fenótipo ósseo desses animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

- 1- Avaliar se a inativação isolada do α_{2C} -AR interfere na estrutura e fisiologia ósseas, caracterizando o fenótipo ósseo de camundongos α_{2C} -AR^{-/-}.
- 2- Avaliar se a ação do hormônio tireoidiano no tecido ósseo depende do α_{2C} -AR, avaliando o efeito do HT na estrutura e fisiologia ósseas de camundongos α_{2C} -AR^{-/-}.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Caracterizar o fenótipo ósseo de camundongos α_{2C} -AR^{-/-}, avaliando:
  - a. a estrutura do osso trabecular e cortical, por microtomografia computadorizada (μ CT);
  - b. os parâmetros biomecânicos do fêmur e tíbia, pelo teste de flexão de três pontos;
  - c. a expressão de genes relacionados com a fisiologia óssea;
- 2- Analisar o efeito do tratamento com dose suprafisiológica de HT no esqueleto de camundongos selvagens (Selv - C57BL/6J) e com inativação isolada do α_{2C} -AR (α_{2C} -AR^{-/-}), nos seguintes parâmetros:
  - a. na estrutura do osso trabecular e cortical, por microtomografia computadorizada (μ CT);
  - b. em parâmetros biomecânicos do fêmur e tíbia, por teste de flexão de três pontos;
  - c. a expressão de genes relacionados com a fisiologia óssea;
  - d. a resposta de osteoclastos primários derivados de animais Selv ao tratamento com hormônio tireoidiano e com um agonista e um antagonista dos adrenoreceptores α_2 (UK 14, 304 e Yohimbina, respectivamente).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Tratamentos

Setenta e cinco camundongos fêmeas com 30 dias de idade, Selv (linhagem C57BL/6J) e com inativação gênica do α_{2C} -AR (α_{2C} -AR^{-/-}), foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura. Os camundongos α_{2C} -AR^{-/-} foram cedidos pela Dra. Patrícia C. Brum, Professora Associada da Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, que é colaboradora deste estudo. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: (1) **Selv** = selvagem não tratado; (2) **Selv-T3** = selvagem recebendo dose suprafisiológica de T3 (20 x T3= 7 µg/100 g PC/dia); (3) **α_{2C} -AR^{-/-}** = camundongos com inativação gênica não tratados; e (4) **α_{2C} -AR^{-/-}-T3**= camundongos α_{2C} -AR^{-/-} tratados com T3. O T3 foi administrado intraperitonealmente uma vez ao dia. Todos os animais foram pesados uma vez por semana para acompanhamento da variação da massa corporal ao longo do período experimental e para o ajuste da quantidade de T3 a ser administrada a fim de se manter a dose de 7 µg/100 g PC/dia. O tratamento com T3 foi iniciado à medida que os animais atingiam a idade de 30 dias. Os camundongos foram tratados com T3 por 30 ou 90 dias e sofreram eutanásia por exposição a CO₂ de acordo com a **Tabela 1**.

Tabela 1- Plano de tratamento com T3 e eutanásia dos animais ao longo do estudo.

Idade ao sacrifício (dias)	30	60	120
Grupos			
Selv	n=6	n=7	n=7
Selv-T3		n=7	n=7
		tt=30	tt=90
α_{2C}-AR^{-/-}	n=6	n=9	n=11
α_{2C}-AR^{-/-}-T3		n=9	n=9
		tt=30	tt=90

O tratamento com T3 (7 µg/100 g PC/dia) foi via intraperitoneal e iniciado à medida que os animais atingiam a idade de 30 dias. n refere-se ao número de animais que sofreram eutanásia e tt, ao tempo de tratamento com T3 no momento da eutanásia.

3.2 Dosagens séricas de T3 e T4

Após coletado por punção cardíaca, o sangue foi mantido a 37 °C por 10 minutos e centrifugado a 3000 rpm em temperatura ambiente (TA), por mais 10 minutos, para obtenção do soro. O soro foi isolado e imediatamente congelado, para posterior aferição de T3 e T4 por RIE (RIA-gnost T4 and RIA-gnost T3, CIS biointernational - Schering, Paris, França).

3.3 Composição corporal

A medida da composição corporal foi realizada através da aferição da massa úmida dos conteúdos de gordura retroperitoneal e axilar e da massa seca e úmida dos seguintes músculos esqueléticos: reto femoral, gastrocnêmio e extensor longo dos dedos (EDL). Para tanto, após a eutanásia dos animais, a gordura retroperitoneal, axilar e os músculos esqueléticos foram dissecados e pesados em balança analítica de precisão (Denver Instrument M-220D) para aferição da massa úmida. Os músculos foram, em seguida, colocados em estufa a 60 °C durante 48

horas e pesados novamente para aferição da massa seca. A massa das gorduras e a massa úmida e seca dos músculos foram divididas pela massa em gramas do animal e, portanto, expressas como $\text{g/g} \cdot \text{PC} \times 1000$.

3.4 Teste biomecânico do fêmur e da tíbia

A tíbia direita de cada animal foi dissecada e mantida em salina a -20°C até o momento das análises. Parâmetros biomecânicos foram obtidos pelo Ensaio de Flexão de Três Pontos (EFTP), utilizando-se o sistema para teste de materiais Instron, modelo 3344 (Instron Corporation, MA, USA). Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 100 kgf. Durante o ensaio, as extremidades dos ossos foram apoiadas em dois roletes, com diâmetro de 2,0 mm, posicionados sobre um suporte, como é possível ver na Fig. 2. Uma força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso no ponto médio entre os dois apoios, no sentido ântero-posterior no fêmur e no sentido látero-medial na tíbia, por uma haste cilíndrica de 2,0 mm, a uma velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento de ruptura do osso.

Figura 2 – Fêmur no apoio do teste de flexão de três pontos.

Teste de flexão de três pontos. Imagem cedida por Gisele M. Martins.

A força aplicada e o deslocamento da haste cilíndrica (deformação) foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento (Instron Series IX). A deformação é medida em milímetros (mm) e equivale à distância percorrida pelo cilindro de carga. Através desses dados, constrói-se a curva força-deformação (Fig. 3). Nessa curva, observa-se uma porção inicial – *região elástica* da curva – onde há uma relação linear entre a força aplicada ao osso e a deformação reversível com a retirada da força. Seguindo essa região, começa uma porção não linear da curva – *região plástica da curva* – em que ocorrem deformações não reversíveis (82). A fronteira dessas duas regiões é chamada *yield point*, que corresponde ao limite elástico. Através da curva força-deformação, pode-se detectar a força no limite elástico, a força máxima (carga máxima) e a força no ponto de ruptura do osso.

No presente estudo, apresentaremos resultados referentes à carga máxima (N), que corresponde à maior força aplicada durante o ensaio, referindo-se à força máxima à qual o osso é capaz de resistir, carga em quebra (carga aplicada no momento em que o osso se rompe {N}), resiliência (reflete a habilidade do osso em sofrer uma deformação elástica {J}) e rigidez (reflete a rigidez intrínseca do osso {N/mm}).

Figura 3 – Gráfico representativo da curva força-deformação

Gráfico representativo da curva força-deformação obtida através do teste biomecânico. A- Limite elástico; B- Ponto de força máxima; C- Ponto de ruptura do osso; R- Reta ajustada à fase elástica; F1- Força no limite elástico; F2- Força máxima; F3- Força de ruptura; D1- Deformação no limite elástico; D2- Deformação no ponto de força máxima e D3- Deformação no ponto de ruptura.

3.5 Microtomografia computadorizada (μ CT)

O fêmur direito e quinta vértebra lombar (L5) foram dissecados e mantidos em salina a -20°C até o momento das análises. Parâmetros em 2D e 3D dos ossos foram obtidos através do Microtomógrafo (SkyScan 1174 v2, SkyScan, Aartselaar, Belgium), em que as amostras sofreram rotação de 180° . Os parâmetros de raio X foram normalizados a 100 kV com exposição de 4500 ms. Um filtro de alumínio com espessura de 0,5 mm foi usado para minimizar o aparecimento de ruído nas imagens. O software CTNrecon versão 1.6.8 (SkyScan) foi utilizado para reconstrução das imagens, o CTAn versão 1.12 (SkyScan) para análise das imagens e o CT-Vol versão 2.2.2.2 (SkyScan), para obtenção das imagens em 3D.

As regiões de interesse dos fêmures foram padronizadas de acordo com o comprimento dos ossos. Para análise do osso trabecular, examinamos parte da metáfise distal do fêmur. Para tanto, o comprimento total de cada fêmur foi dividido em quatro partes iguais. Em seguida, o comprimento do quarto distal foi dividido por

1,5, sendo que a parte proximal desta divisão foi selecionada para análise. Esse procedimento foi adotado a fim de excluir a lâmina epifisial das análises (Fig. 4).

Já a região de interesse a ser analisada nas vértebras foi determinada de acordo com as distâncias ântero-posterior e latero-lateral do osso. A partir de uma padronização, foi desenhado uma elipse com diâmetro específico para cada amostra e foi analisado todo o conteúdo trabecular da região interna da elipse, excluindo as lâminas epifisiais (Fig. 5).

Figura 4 – Esquema de área de interesse analisada por μ CT do fêmur.

Esquema de seleção das áreas de interesse (quadriculado). **A.** Osso trabecular. **B.** Osso cortical. Imagem cedida por Gisele M. Martins.

Figura 5 – Esquema da área de interesse analisada por μ CT da quinta vértebra lombar (L5)

Esquema representativo das regiões analisadas da vértebra L5 através da microtomografia computadorizada em 3D. Imagem cedida por Tatiana Fonseca.

Os parâmetros trabeculares analisados foram: volume trabecular (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número de trabéculas (Tb.N), índice do modelo estrutural (SMI) e o grau de anisotropia (DA).

O SMI indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas) (Fig. 6). Este parâmetro é de suma importância na análise da estrutura trabecular, uma vez que a deterioração do osso trabecular, em função do envelhecimento ou patologia, é caracterizada pela conversão de trabéculas achatadas para cilíndricas. Assim sendo, o predomínio de trabéculas cilíndricas resulta em um maior valor de SMI e em trabéculas menos resistentes ao *stress* mecânico (83).

Figura 6 – Imagem de trabéculas em formas cilíndricas e achatadas.

Imagem obtida por microtomografia óssea. A - trabéculas em forma de “rods” (cilíndricas). B – trabéculas em forma de “plates” (achatadas) (84).

O DA é a medida da simetria em 3 dimensões. Também pode ser considerada a existência (ou não) do alinhamento de estruturas ao longo de um eixo específico. No caso do osso, que é um material não contínuo, repleto de estruturas (trabéculas) orientadas em diferentes direções, a mensuração do DA reflete a capacidade de reagir diferentemente a cargas vindas de sentidos diferentes. Quanto menos simétrico o objeto, maior o DA. Com relação ao osso, quanto maior o DA, melhor será a sua resposta a diferentes forças mecânicas (83).

Para a análise do osso cortical, parâmetros em 2D foram obtidos e analisados conforme descrito anteriormente. Primeiramente, o osso foi dividido em metades

proximal e distal. Em seguida, a metade distal foi subdividida em quatro partes iguais. Por fim, o segundo quarto proximal foi selecionado para análise (ROI). Com relação à vértebra, para análise dos parâmetros corticais, foi analisado o corpo vertebral total, excluindo-se apenas as placas epifisiais superior e inferior.

Os parâmetros corticais analisados foram: área perióstica - área total delimitada pelo perióstio, inclui a área medular e cortical (T.Ar), perímetro do perióstio (T.Pm), área da cortical (B.Ar), área medular (T.Ar-B.Ar), perímetro do endóstio (B.Pm-T.Pm), espessura cortical (Ct.Th) e porosidade da cortical (Po).

3.6 Expressão gênica por PCR em tempo real (Real-Time PCR)

O fêmur esquerdo e a terceira vértebra lombar (L3) foram dissecados rapidamente sobre uma superfície resfriada (0 – 4 °C), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. Para a extração do RNAm, os ossos foram pulverizados, na presença de nitrogênio líquido, em um *mortar* e pistilo de aço (Fisher Scientific International, Inc., Hampton, NH, USA) previamente resfriados em gelo seco. Ao "pó" de osso, foi adicionado Trizol (Gibco, BRL).

O RNA total dos ossos foi extraído de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do Trizol e tratado com o kit TURBO DNA-free (Ambion, AM 1907, Foster City, CA, USA), segundo indicação do fabricante. A concentração e pureza do RNA foi determinada por espectrofotometria medindo-se a absorbância em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, e 1 mM EDTA) a 260 e 280 nm. O DNA complementar (DNAC) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (1,0 µg), utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme indicação do fabricante. Os *primers* de oligonucleotídeos para amplificação por PCR foram desenhados através do software *Primer Express Version 1.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a partir das sequências dos genes de interesse, sintetizados pela XXIDT integrated (DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Os genes de interesse foram: α_{2A} -adrenérgico (α_{2A} -AR), α_{2B} -adrenérgico (α_{2B} -AR), β_1 -adrenérgico (β_1 -AR), β_2 -adrenérgico (β_2 -AR), β_3 -adrenérgico (β_3 -AR), receptores de HT, TR α e TR β , osteocalcina, RANKL, OPG, RANK, TRAP e suas sequências estão apresentadas na tabela 2. As condições para construção de cada *primer* foram: (1)

cruzar os limites intron-exon; (2) temperatura de anelamento entre 58-60 °C; (3) 15-30 pares de base e (4) manter uma porcentagem entre 30-80 % de bases G e C.

Os valores relativos à amplificação do RNAm referente a cada gene estudado foram avaliados através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador Corbett RG 6000 (Qiagen, Hilden, Alemanha), comparando todas as amostras e o controle interno em duplicatas. Após a padronização da quantidade de DNAc e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 20 µl, com 450 nM de *primers* e *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O gene 18s foi selecionado como controle interno para corrigir a variabilidade nas amplificações. O DNAc foi amplificado em duplicatas nas seguintes condições: 1 ciclo a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (anelamento). Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados com o controle interno e a quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método do $\Delta\Delta Ct$ como previamente descrito por Livak (60).

Tabela 2 - Sequência dos *primers* para PCR em tempo real

Gene	Sequência do <i>Primer</i>	Acesso no <i>GenBank</i>
β_1 -AR	F: TCG TCC GTC GTC TCC TTC TAC R: ACA CCC GCA GGT ACA CGA A	NM_007419
β_2 -AR	F: GCC ACG ACA TCA CTC AGG AAC R: CGA TAA CCG CAC TGA GGA TGG	NM_007420
β_3 -AR	F: TCC TTC TAC CTT CCC CTC CTT R: GCG CTT AGC CAC AAC GAA CAC	NM_013462
α_{2A} -AR	F: CGC AGG CCA TCG AGT ACA A R: GAT GAC CCA CAC GGT GAC AA	NM_0074173
A_{2C} -AR	F: CAT GGG CGT GTT CGT ACT GT R: CAG GCC TCA CGG CAG ATG	NM_0074183
OC	F: CTC ACA GAT GCC AAG CCC A R: CCA AGG TAG CGC CGG AGT CT	NM_U11542
RANKL	F: GGC CAC AGC GCT TCT CAG R: GAG TGA CTT TAT GGG AAC CCG AT	NM_0116132
RANK	F: TCT GCA GCT CTT CCA TGA CAC T R: CGA TGA GAC TGG GCA GGT AAG	NM_009399
OPG	F: AGT CCG TGA AGC AGG AGT G R: CCA TCT GGA CAT TTT TTG CAA A	NM_U94331
TRAP	F: TGC ACA GAT TGC ATA CTC TAA GAT CTC R: TTT TGA AGC GCA AAC GGT AGT	NM_007388
TR α	F: GCT GTG CTG CTA ATG TCA ACA GA R: GCC TCC TGA CTC TTC TCG ATC TT	NM_178060
TR β	F: AAG CCA CAG GGT ACC ACT ATC G R: GGA GAC TTT TCT GAA TGG TTC TTC TAA	NM_001113417
NFATc1	F: GGT AAC TCT GTC TTT CTA ACC TTA AGC TC R: GTG ATG ACC CCA GCA TGC ACC AGT CAC AG	NC_000866
Cat K	F: AGG CAG CTA AAT GCA GAG GGT ACA R: AGC TTG CAT CGA TGG ACA CAG AGA	NC_000696
c-Fos	F: CAA GCG GAG ACA GAT CAA CTT G R: TTT CCT TCT CTT TCA GCA GAT TGG	NC_000786
Calc R	F: CAA GAA CCT TAG CTG CCA GAG R: CAA GCA CGC GGA CAA TGT TG	NC_000726
18S	F: GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT R: CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	NM_11188

F: *Forward primer*, R: *Reverse primer*

3.7 Metodologia *in vitro*

3.7.1 Osteoclastogênese

Macrófagos oriundos da medula óssea (BMMs) dos ossos longos e das vértebras lombares de animais Selv (C57BL/6) foram obtidos através de centrifugação usando o meio de cultura α -MEM [incluindo 10 % de soro fetal bovino (FBS), 1 % penicilina/streptomicina, 1 % glutamina e 100 ng/mL de CMG-supernadante como fonte de M-CSF]. Após 5 dias de cultura, foram plaqueadas 8×10^3 células por poço em placa de 96 poços e foram mantidas em meio de diferenciação osteoclástica (o mesmo descrito acima com acréscimo do fator de diluição 1:25 de CMG e 25ng/ml GTS-RANKL). Junto com o meio de diferenciação, UK 14,304 (agonista α_2), Yohimbina (antagonista α_2) e hormônio tireoidiano (T3) foram adicionados ao meio em diversas concentrações, e a troca de meio foi feita a cada dois dias. Após uma curva dose resposta, foram definidas as seguintes quantidades de cada droga: UK 14,304 (6×10^{-5} M), Yohimbina (1 μ M) e T3 (10^{-8} M).

3.7.2 Marcação com *Trap+*

Após 5 dias do plaqueamento, os osteoclastos foram fixados em formaldeído 4 % e Triton X-100 1 % por 5 minutos, e corados para tartrate resistant acid-phosphatase (TRAP) de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Aldrich), para avaliar a diferenciação osteoclástica.

3.7.3 Western Blot

O total de proteína das amostras foi extraído como descrito previamente (85). A quantificação foi feita com o kit DC protein assay (BioRad), e 20-30 μ g do total de proteína foi submetido à eletroforese em um gel de SDS-acrilamida. A transferência foi feita para membranas de PVDF. Os blots foram incubados durante uma hora em leite em pó 5 % e, em seguida, em anticorpos primários específicos (Cell Signalling) de um dia para o outro, seguida de anticorpos secundários anti-mouse ou anti-rabbit conjugados com HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc.). A expressão protéica foi

então avaliada por quimiluminescência através do Super Signal Substrates (Pierce) e as imagens foram obtidas com o software Genesnap, usando Syngene Imaging System (Synoptics). O controle interno foi feito com beta actina.

3.7.4 Hiper expressão de NFATc1

Os vetores retro virais pMX-puro foram construídos para a hiper expressão de NFATc1. Eles são derivados do vetor específico (harbors a simianvirus 40) que contém o gene de resistência a puromicina, um antibiótico que permite a seleção de células que foram transfectadas com sucesso. O vetor controle e o vetor contendo a construção de indução da hiper expressão de NFATc1 foram transfectadas para células Plat-Es para produzir o retrovírus, usando a metodologia de CaCl_2 . Após 48 hs., foi feita a troca do meio e o supernadante foi coletado. As BMMs foram infectadas com o supernadante viral recolhido das Plat-Es na presença de 4 $\mu\text{g/ml}$ de polybrene por 24 horas. As células infectadas sofreram seleção com 2 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina por, no mínimo, 3 dias.

3.7.5 Anéis de Actina

Pré-osteoclastos foram plaqueados junto com fragmentos de osso cortical bovino e induzidos a diferenciação com RANKL e M-CSF. Após 5 dias, para análise dos anéis de actina, fragmentos ósseos bovinos foram fixados em paraformaldeído 4% (Polysciences) e Triton X-100 0,2 % por 10 minutos. Em seguida, foram lavados 3 vezes com PBS. Os fragmentos foram então incubados no escuro com Alexa 488-phalloidin (Invitrogen) por 15 minutos e colocados sobre lâmina de microscópio. As imagens foram obtidas com software Qcapture.

3.7.6 Pontos de reabsorção óssea

Para visualizar os pontos de reabsorção, pré-osteoclastos foram plaqueados junto com pequenos pedaços de osso cortical bovino e induzidos a diferenciação com RANKL e M-CSF. Após 6 dias, os osteoclastos foram removidos do fragmento ósseo usando uma escova de dentes macia, lavados com PBS e em seguida foram

incubados a 37 °C com 20 µg/ml de peroxidase-conjugated wheat germ agglutinin (Sigma-Aldrich) por 30 minutos. Os fragmentos foram lavados mais uma vez com PBS e foi adicionado 3,3- diaminobenzidina para uma nova fase de incubação, também de 30 minutos. Após esse período, houve mais uma lavagem com PBS e os fragmentos ficaram expostos ao ar para secagem e posterior quantificação e obtenção de imagens no microscópio de luz com auxílio do software Qcapture. A quantificação foi feita com o software ImageJ.

3.7.7 Viabilidade Celular (MTT test)

Esse teste tem como objetivo a avaliação de viabilidade celular, podendo, portanto, funcionar como um teste de toxicidade. Tanto as BMMs quanto as BMSCs foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 48 horas, em meio de diferenciação, com adição ou não das drogas utilizadas, foi acrescentado ao meio, MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide - Sigma), na dose de 5 ng/ml diluído em PBS e deixado incubando em 37 °C por 3 horas. Após esse período, o meio foi retirado e adicionado 150 µl/poço de DMSO. Em seguida a quantificação foi feita por absorbância (565 nm).

3.8 Análise Estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos para qualquer parâmetro foi testada pela análise de variância (ANOVA) ou pelo teste-t (*Student t-test*). ANOVA foi sempre seguida pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls, para detectar quais grupos são significativamente diferentes entre si. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* Instat Biostatistics; para a construção de gráficos foi utilizado o *software* Prism (ambos provenientes da GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS *IN VIVO*

4.1 Dosagem Sérica de T3 e T4

A Figura 7 (A e B) mostra, como esperado, que a concentração sérica de T3 foi significativamente maior tanto nos animais Selv quanto nos animais KOs tratados com 20 vezes a dose fisiológica de T3 (7 µg/100 g PC/dia) durante 30 (8 e 9,5 vezes respectivamente - Fig. 7A) ou 90 dias (8 e 4 vezes, respectivamente - Fig. 7B), quando comparados aos seus respectivos animais controle (animais tratados com salina).

Figura 7 - Níveis Séricos de T3 nos animais Selv e α_{2C} -AR tratados com salina ou com dose suprafisiológica de T3.

Animais foram tratados com salina ou dose suprafisiológica de T3 (7 µg/100 g PC/dia) por 30 (A) ou 90 (B) dias. O hormônio foi administrado através de injeções intraperitoneais diárias. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=5-7). As comparações estatísticas foram feitas por ANOVA, seguida pelo pós teste de Turkey. *p<0,05, **p<0,01, animais tratados com T3 vs tratados com salina.

De forma oposta, porém coerente, as concentrações de T4 foram significativamente menores nos animais Selv e KO tratados durante 30 dias (2 e 1,5 vezes, respectivamente – Fig. 8A) ou 90 dias (10 e 2 vezes, respectivamente - Fig.

8B) quando comparados a seus controles, tratados com salina, o que reflete a inibição da síntese e secreção de TSH promovida pelo excesso de T3 (86).

Figura 8 - Níveis séricos de T4 nos animais Selv e α_{2C} -AR tratados com salina ou com dose suprafisiológica de T3.

Animais foram tratados com salina ou dose suprafisiológica de T3 (7 μ g/100 g PC/dia) por 30 (A) ou 90 (B) dias. O hormônio foi administrado através de injeções intraperitoneais diárias. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-7). As comparações estatísticas foram feitas por ANOVA, com pós teste de Turkey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, animais tratados com T3 vs tratados com salina.

4.2 Composição corporal

4.2.1 Massa corporal

Praticamente não houve diferença entre os animais Selv e KO quanto à massa corporal. Entretanto, ao final das 12 semanas de estudo, os animais α_{2C} -AR^{-/-} apresentaram-se mais leves, sendo essa diferença de 4% e de 3% quando os animais apresentavam 11 e 12 semanas de idade, respectivamente (Fig. 9A).

Figura 9 - Massa corporal dos animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com salina ou com dose suprafisiológica de T3.

(A) Animais controles, tratados com salina, (B) Animais Selv e (C) $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv + T3 e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ + T3) por 90 dias. A medição da massa corporal foi iniciada quando os animais tinham 30 dias de idade, sendo pesados semanalmente. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=7-9). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

4.2.2 Massa seca do coração e músculos esqueléticos

A Fig. 10 mostra que não houve diferença significativa na massa seca do coração dos animais Selv em relação aos KO tratados com salina, em nenhuma das idades analisadas.

O hipertireoidismo alterou a massa seca do músculo cardíaco dos animais Selv, causando aumento de 15% nos animais Selv tratados por 30 dias e de 22% nos tratados por 90 dias, corroborando com estudos anteriores que mostram hipertrofia cardíaca em condição de tirototoxicose (87). Porém, essa alteração não foi observada nos animais KO.

Figura 10 -: Massa seca do coração dos animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$, tratados com salina ou dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias.

Massa do músculo cardíaco de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ que foram tratados diariamente com salina ou com dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias. Os valores são expressos em g de coração/g de peso corporal x 100. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-10). ***p<0,001 vs grupo tratado com T3.

A massa seca do músculo Extensor Longo dos Dedos se mostrou 11% menor nos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ de 60 dias de idade em comparação aos Selv (Tabela 3). A tabela também mostra que o tratamento com T3 não alterou a massa desse músculo nos animais Selv, porém foi observada uma diminuição de 50% nos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ tratados durante 30 dias quando comparados aos animais controle.

A massa seca do músculo Gastrocnêmio não se mostrou alterada nos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ quando comparados aos Selv, como pode ser visto na tabela 3. De maneira oposta ao músculo EDL, o tratamento com T3 diminuiu significativamente a massa seca do Gastrocnêmio nos animais Selv tratados durante 30 (23%) ou 90 dias (23%) (Tabela 3 e 4, respectivamente) e nos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ tratados durante 30 dias (8%) (Tabela 3).

Diferentemente dos outros músculos avaliados, o Reto Femoral não se mostrou alterado nos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ em relação aos Selv, e nem foi responsivo ao tratamento com T3.

Tabela 3 - Efeito de 30 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos em animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$.

		Selv.	Selv (T3)	$\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$	$\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ (T3)
ELD	MS	1±0,3	1,1±0,2	0,9±0,1**	0,6±0,2 ^{AA}
	UM	3,1±0,7	2,7±0,5	2,5±0,4	2,1±0,3
Gastro	MS	16±1,5	13±1,7 ^{AA}	13±1	12±1,5
	UM	56±5,2	48±5,3	46±4,4	41±6,8
Reto	MS	9±1	10±2	9±1	8±2
	UM	33±2	37±7	33±2	28±3

Efeito do tratamento com T3 nos músculos esqueléticos. Os animais foram tratados com salina ou dose supra fisiológica de T3 (7 ug/100 g PC/dia) por 30 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. ELD = extensor longo dos dedos, Gastro = gastrocnêmio, Reto = reto femoral, MS = massa seca, MU= massa úmida. A MS e MU do Gastro e ELD foi expressa em mg/comprimento da tíbia em mm x 100. A MS e MU do Reto foi expressa em g/comprimento do fêmur em mm x 100. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=5-9 por grupo). **p<0,01 vs Selv e AA **p<0,01animais tratados com salina vs mesma linhagem tratada com T3.

Tabela 4 - Efeito de 90 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos em animais Selv. e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$.

		Selv.	Selv (T3)	$\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$	$\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ (T3)
ELD	MS	1,1±0,2	1±0,3	1,3±0,4	1±0,4
	UM	2,7±0,8	3,2±0,7	3±0,6	3,4±1
Gastro	MS	16±0,8	13±0,22 ^{AAA}	16±0,37	14±0,75 ^{AA}
	UM	56±3,9	48±2,8	60±4	59±1,1
Reto	MS	10±0,37	10±0,37	11±0,37	10±0,36
	UM	38±5	35±2	42±5	49±2,3

Efeito do tratamento com T3 nos músculos esqueléticos. Os animais foram tratados com salina ou dose supra fisiológica de T3 (7 ug/100 g PC/dia) por 90 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. ELD = extensor longo dos dedos, Gastro = gastrocnêmio, Reto = reto femoral, MS = massa seca, MU= massa úmida. A MS e MU do Gastro e ELD foi expressa em mg/comprimento da tíbia em mm x 100. A MS e MU do Reto foi expressa em g/comprimento do fêmur em mm x 100. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=5-9 por grupo). **p<0,01 vs Selv e AA **p<0,01animais tratados com salina vs mesma linhagem tratada com T3.

4.2.3 Massa úmida da gordura

Na Fig. 11, observamos que os animais α_{2C} -AR^{-/-} de 60 dias de idade apresentaram 33% menos gordura axilar do que os animais Selv de mesma idade. Além disso, o tratamento com T3 apenas alterou esse coxim adiposo nos animais Selv tratados durante 30 ou 90 dias, apresentando uma diminuição de 25% e 30%, respectivamente (Fig. 11).

Figura 11 - Massa úmida da Gordura Axilar dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou T3 durante 30 ou 90 dias.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano em animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}, que foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias. Os valores são expressos em g de gordura/g de peso corporal x 100. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-10). ** p<0,01 vs o grupo tratado com T3, ## p<0,01 vs Selv.

Como esperado, os animais α_{2C} -AR^{-/-} apresentaram menor quantidade de gordura retroperitoneal comparados aos animais Selv em todas as idades analisadas, 30, 60 e 120 dias, sendo essas diferenças de 60%, 140% e 128% respectivamente (Fig. 12). Mais uma vez, apenas os animais Selv foram sensíveis ao tratamento com dose suprafisiológica de T3, sendo que os animais Selv tratados durante 30 dias apresentaram 2 vezes menos e os tratados durante 90 dias apresentaram 90% menos gordura retroperitoneal quando comparados a mesma linhagem tratada com salina.

Figura 12 - Massa úmida da Gordura Retroperitoneal dos animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou T3 durante 30 ou 90 dias.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano em animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}, que foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias. Os valores são expressos em g de gordura/g de peso corporal x 100. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-10). *** p<0,001 animais tratados com salina vs animais da mesma linhagem tratados com T3, ### p<0,001 vs Selv.

4.2.4 Comprimento corporal

A Fig. 13 mostra o comprimento corporal dos animais Selv e KOs, e pode-se observar que não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 13 - Comprimento corporal dos animais Selv e $\alpha_2\text{C}\text{AR}^{-/-}$ de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina e com T3.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano no comprimento corporal, que compreende a medida linear desde o focinho até a base da cauda do animal. Animais Selv e KOs tratados diariamente com salina ou com dose suprafisiológica de T3 (SELV T3 e $\alpha_2\text{C}\text{AR}^{-/-}$ T3) por 30 ou 90 dias. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-10).

4.2.5 Comprimento do fêmur

Observa-se, na Fig. 14, que o comprimento do fêmur dos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ é menor do que os Selv em todas as idades avaliadas, 30, 60 e 120 dias, sendo essas diferenças de 6%, 4% e 5%, respectivamente. Nota-se que apenas os animais Selv foram sensíveis ao tratamento com T3 durante 30 ou 90 dias, sendo que os primeiros apresentaram uma diferença de 3% e os últimos de 7% quando comparados aos animais tratados com salina.

Figura 14 - Comprimento do Fêmur dos animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou com T3.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano no comprimento dos fêmures, que foram medidos através de um paquímetro. Animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ que foram tratados diariamente com salina ou com dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-10). *p<0,05, ***p<0,001 animais tratados com salina vs animais da mesma linhagem tratados com T3, #p<0,05, ### p<0,001 vs Selv.

4.2.6 Comprimento da tíbia

Diferentemente dos fêmures, a tíbia não apresentou diferenças significativas entre animais Selv e KOs tratados com salina e o tratamento também não afetou o comprimento desse osso (Fig. 15).

Figura 15 - Comprimento da Tíbia dos animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ de 30, 60 e 120 de idade, tratados com salina ou T3.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano no comprimento das tíbias, que foram medidas através de um paquímetro. Animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ que foram tratados diariamente com salina ou com dose suprafisiológica de T3 (SELV T3 e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ T3) por 30 ou 90 dias. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-10). *p<0,05, ***p<0,001 animais tratados com salina vs animais da mesma linhagem tratados com T3, #p<0,05, ###p<0,001 vs Selv.

4.2.7 Comprimento da cauda

Como se observa na Fig. 16, o comprimento da cauda não foi diferente em nenhum dos grupos analisados.

Figura 16 - Comprimento da cauda dos animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ de 30, 60 e 120 de idade.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano no comprimento da cauda, que foram medidas com uma régua de 15 cm. Animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ que foram tratados diariamente com salina ou com dose suprafisiológica de T3 (Selv T3 e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ T3) por 30 ou 90 dias. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-10).

4.3 Microtomografia Computadorizada

4.3.1 Fêmur

4.3.1.1 Trabecular

Nas tabelas abaixo (Tabelas 5 e 6), pode-se observar os dados obtidos através das análises por microtomografia computadorizada em 3 dimensões da metáfise distal do fêmur, em que se observou que os animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ de 60 e 120 dias de idade apresentaram menor volume trabecular (BV/TV) do que os animais Selv da mesma idade, sendo essas diferenças de 1,8 e 8 vezes respectivamente. Os animais KO de 60 dias de idade também mostraram menor número de trabéculas (50%, $p<0,05$) e grau de anisotropia (30%, $p<0,05$), quando comparados com o grupo Selv de mesma idade. Observa-se que o tratamento com T3 alterou, significativamente, os parâmetros avaliados. Nota-se que os animais Selv foram sensíveis aos dois tratamentos, de 30 e de 90 dias, apresentando diminuição no volume trabecular (5-6 vezes, $p<0,001$), no número de trabéculas (3-5 vezes, $p<0,001$) e no grau de anisotropia (50%, $p<0,01$). Consequentemente, o excesso de hormônio tireoidiano foi capaz de aumentar a separação trabecular (50% $p<0,05$ e 80%, $p<0,001$) e porosidade (5%, $p<0,01$) dos animais Selv. Já o fêmur dos animais KO foram sensíveis apenas ao tratamento mais longo, de 90 dias, apresentando uma diminuição no volume trabecular de 20%, $p<0,001$. Com relação ao número de trabéculas (Tb.N), os animais KO tratados apresentaram 4 vezes menos trabéculas do que o mesmo grupo não tratado, e de forma semelhante aos Selv, apresentaram aumento significativo na separação trabecular, sendo essa diferença de 50%.

Tabela 5 – Efeito do tratamento com HT, durante 30 dias (60 dias de idade), nos parâmetros trabeculares do fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}.

	Selv.	Selv (T3)	α_{2C} -AR ^{-/-}	α_{2C} -AR ^{-/-} (T3)
BV.TV (%)	3,4±0,52	0,67±0,06 ^{AAA}	1,21±0,23 ^{BBB}	1,61±0,15
Tb.Th (µm)	49±0,9	43±1,2	46±1,8	47±1,4
Tb.N (x1000)	5,3±0,1	1,8±0,2 ^{AA}	2,65±0,3 ^B	2,8±0,5
Tb.Sp	443±19	654±46 ^A	439±49	525±48
SMI	2,71±0,03	3±0,03	2,8±0,08	2,94±0,035
DA	4,2±0,4	2,85±0,19 ^{AA}	3±0,08 ^B	2,94±0,32
Porosidade (%)	96±0,5	99,2±0,12 ^{AA}	97±0,6	98±0,28

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetro trabeculares do fêmur. Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 ug/100 g PC/dia) por 30 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. BV/TV=volume ósseo/volume de tecido, Tb.Th= espessura trabecular, Tb.N=número de trabéculas, Tb.Sp= separação trabecular, SMI= índice de módulo estrutural, DA=grau de anisotropia. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=6-11 por grupo). A p<0,05, AA p<0,01 e AAA p<0,001 animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B p<0,05, BB p<0,01 e BBB p<0,001 Selv vs KO controles.

Tabela 6 – Efeito do tratamento com T3, durante 90 dias (120 dias de idade), nos parâmetros trabeculares do fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}.

	Selv.	Selv (T3)	α_{2C} -AR ^{-/-}	α_{2C} -AR ^{-/-} (T3)
BV.TV (%)	2,93±0,4	0,50±0,05 ^{AAA}	0,66±0,06 ^{BBB}	0,30±0,04 ^{AAA}
Tb.Th (µm)	51±3	47±3	43±3,3	45±6
Tb.N (x1000)	5,2±0,5	1±0,1 ^{AAA}	2,8±1,1	0,6±0,05 ^{AAA}
Tb.Sp	365±14	656±55 ^{AAA}	550±61	773±72 ^{AAACCC}
SMI	3±0,08	3,5±0,1	3,1±0,09	3,2±0,1
DA	2,3±0,13	2,7±0,3	2,6±0,3	5,8±1 ^{AAACCC}
Porosidade (%)	97±0,4	99±0,1	98±0,6	99±0,13

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetro trabeculares do fêmur. Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 ug/100 g PC/dia) por 90 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. BV/TV=volume ósseo/volume de tecido, Tb.Th= espessura trabecular, Tb.N=número de trabéculas, Tb.Sp= separação trabecular, SMI= índice de módulo estrutural, DA=grau de anisotropia. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=6-11 por grupo). A p<0,05, AA p<0,01 e AAA p<0,001 animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B p<0,05, BB p<0,01 e BBB p<0,001 Selv vs KO controles. CC p<0,01 e CCC p<0,001 vs Selv T3.

4.3.1.2 Cortical

Nas tabelas 7 e 8, pode-se observar que o tratamento com 20 vezes a dose fisiológica de T3 durante 90 dias causou a diminuição da área cortical (T.Ar) em 15% ($p<0,01$) nos animais Selv, efeito esse também observado nos animais KO (11%, $p<0,05$). O tratamento também diminuiu a área da cortical (B.Ar) tanto nos animais Selv em 15%, $p<0,05$, quanto nos $\alpha_{2c}\text{-AR}^{-/-}$ em 11%, $p<0,05$. A área medular foi aumentada pelo excesso de hormônio tireoidiano nos animais Selv em 4 vezes, $p<0,01$, e nos KO em 5 vezes, 0,001. A espessura da cortical (Ct.Th) também foi alterado nas duas linhagens, aumentando 27%, $p<0,001$, nos animais Selv e 15%, $p<0,001$ nos KO tratados.

Tabela 7 – Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias (60 dias de idade), nos parâmetros corticais do fêmur de animais Selv e $\alpha_{2c}\text{-AR}^{-/-}$.

	Selv.	Selv (T3)	$\alpha_{2c}\text{-AR}^{-/-}$	$\alpha_{2c}\text{-AR}^{-/-}$ (T3)
T.Ar (μm^2)	66 $\pm$ 0,3	66 $\pm$ 0,2	67 $\pm$ 0,1	61 $\pm$ 2,1
T.Pm (μm)	10,4 $\pm$ 0,01	10,7 $\pm$ 0,9	10,3 $\pm$ 0,2	10,3 $\pm$ 0,8
B.Ar (μm)	66 $\pm$ 0,3	66 $\pm$ 0,2	67 $\pm$ 1,6	62 $\pm$ 2,6
Área Medular	260 $\pm$ 18	1166 $\pm$ 158 ^{AAA}	801 $\pm$ 477 ^{BBB}	1713 $\pm$ 44 ^{AAA}
Perímetro Endosteal	50 $\pm$ 3,8	74 $\pm$ 12	64 $\pm$ 58	47 $\pm$ 6,4
Ct.Th (μm)	126 $\pm$ 5,6	121 $\pm$ 4,8	124 $\pm$ 6,3	118 $\pm$ 5,2
Porosidade Cortical (%)	0,03 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,001

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetros corticais do fêmur. Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 $\mu\text{g}/100\text{ g PC}/\text{dia}$) por 30 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. T.Ar= Área dentro do periosteio, T.Pm=Perímetro do periosteio, B.Ar= Área de secção transversal, Ct.Th= Espessura cortical. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=6-11$ por grupo). A $p<0,05$, AA $p<0,01$ e AAA $p<0,001$ animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B $p<0,05$, BB $p<0,01$ e BBB $p<0,001$ Selv vs KO controles.

Tabela 8 – Efeito do tratamento com T3, durante 90 dias (120 dias de idade), nos parâmetros corticais do fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}.

	Selv.	Selv (T3)	α_{2C} -AR ^{-/-}	α_{2C} -AR ^{-/-} (T3)
T.Ar (μm^2)	80 $\pm$ 1,5	68 $\pm$ 1,8 ^{AA}	77 $\pm$ 2,2	69 $\pm$ 3,7 ^A
T.Pm (μm)	9,4 $\pm$ 0,09	10 $\pm$ 0,18	9,5 $\pm$ 0,11	9,6 $\pm$ 0,26
B.Ar (μm)	80 $\pm$ 1,5	68 $\pm$ 1,8 ^{AA}	77 $\pm$ 2,3	69 $\pm$ 3,7 ^A
Área Medular	296 $\pm$ 22	1157 $\pm$ 105 ^{AA}	450 $\pm$ 105	2275 $\pm$ 1100 ^{AAA}
Perímetro Endosteal	41 $\pm$ 5,2	107 $\pm$ 32,5	170 $\pm$ 23,6	266 $\pm$ 90 ^{CCC}
Ct.Th (μm)	169 $\pm$ 3,7	133 $\pm$ 3,7 ^{AAA}	160 $\pm$ 4,5	143 $\pm$ 10,5 ^A
Porosidade Cortical (%)	0,03 $\pm$ 0,001	0,06 $\pm$ 0,001	0,02 $\pm$ 0,004	0,03 $\pm$ 0,007

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetros corticais do fêmur. Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 $\mu\text{g}/100\text{ g PC}/\text{dia}$) por 30 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. T.Ar= Área dentro do periosteio, T.Pm=Perímetro do periosteio, B.Ar= Área de seção transversal, Ct.Th= Espessura cortical. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=6-11 por grupo). A p<0,05, AA p<0,01 e AAA p<0,001 animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B p<0,05, BB p<0,01 e BBB p<0,001 Selv vs. KO controles. CC p<0,01 e CCC p<0,001 vs. Selv T3.

Figura 17 - Imagens 3D obtidas por μCT do fêmur de camundongos Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados por 30 ou 90 dias com salina ou T3.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano nos parâmetros trabeculares e corticais da metáfise distal do fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}. Imagens obtidas por microtomografia computadorizada (μCT).

4.3.2 Vértebra

4.3.2.1 Trabecular

A microtomografia computadorizada do corpo vertebral da L5 apresentou resultados interessantes que serão descritos a seguir e estão detalhados nas tabelas 9 e 10.

De maneira completamente oposta ao que foi visto no fêmur, a vértebra dos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentou maior volume ósseo trabecular (BV/TV) do que os animais Selv nas duas idades analisadas, 60 e 120 dias, sendo essas diferenças de 50%, $p<0,001$, e 65%, $p<0,01$, respectivamente. De forma consistente, os KO apresentaram maior número de trabéculas (25-60%, $p<0,01$) quando comparados com os Selv. Além disso, os $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mostraram menor separação trabecular (35%, $p<0,001$, e 13%, $p<0,05$), o que era totalmente esperado, uma vez que um número maior de trabéculas tende a diminuir a distância entre elas.

O tratamento com 20 vezes a dose fisiológica de T3, como esperado, alterou negativamente os parâmetros analisados nos animais Selv. Com relação ao volume trabecular, os animais tratados por 30 ou 90 dias apresentaram diminuição de 80%, $p<0,01$, e 90%, $p<0,001$, respectivamente. A espessura trabecular (Tb.Th) também sofreu diminuição devido aos tratamentos, tanto o curto quanto o longo, nos animais Selv, sendo menores em 30%, $p<0,001$, e 13%, $p<0,01$, quando comparados com a mesma linhagem tratada com salina. O número de trabéculas (Tb.N) também diminuiu com os tratamentos de 30 e 90 dias nos animais Selv, que apresentaram 80%, $p<0,001$, e 97%, $p<0,01$ menos trabéculas do que os animais tratados com salina. Coerentemente, o tratamento mais longo foi capaz de aumentar a separação trabecular dos animais Selv em 22%, $p<0,001$. De maneira interessante, nota-se que os animais KO foram resistentes aos efeitos deletérios do excesso de hormônio tireoidiano na vértebra.

Tabela 9 – Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias (60 dias de idade), nos parâmetros trabeculares da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}.

	Selv.	Selv (T3)	α_{2C} -AR ^{-/-}	α_{2C} -AR ^{-/-} (T3)
BV.TV (%)	5,5±0,5	2,9±0,3 ^{AA}	11±0,6 ^{BBB}	13±0,9 ^{CCC}
Tb.Th (µm)	46±1,1	36±0,5 ^{AAA}	51±0,7	50±1,3 ^{CCC}
Tb.N (x1000)	13±1,2	7±0,4 ^{AAA}	22±1 ^{BBB}	24±1,8 ^{CCC}
Tb.Sp	302±10	297±19	219±5,5 ^{BBB}	210±4,1 ^{CCC}
SMI	2,5±0,11	2,5±0,04	2,3±0,04	2±0,09 ^C
DA	3±0,21	2±0,14 ^{AA}	2,2±0,2 ^{BB}	2,5±0,08
Porosidade (%)	94±0,9	96±0,4 ^{AA}	89±0,7 ^{BBB}	87±1,1

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetros trabeculares da vértebra. Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 ug/100 g PC/dia) por 30 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. BV/TV=volume ósseo/volume de tecido, Tb.Th=espessura trabecular, Tb.N=número de trabéculas, Tb.Sp= separação trabecular, SMI= índice de módulo estrutural, DA=grau de anisotropia. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=6-11 por grupo). A p<0,05, AA p<0,01 e AAA p<0,001 animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B p<0,05, BB p<0,01 e BBB p<0,001 Selv vs KO controles. CC p<0,01 e CCC p<0,001 vs. Selv T3.

Tabela 10 - Efeito do tratamento com T3, durante 90 dias (120 dias de idade), nos parâmetros trabeculares da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}.

	Selv.	Selv (T3)	α_{2C} -AR ^{-/-}	α_{2C} -AR ^{-/-} (T3)
BV.TV (%)	5,7±0,3	2,7±0,3 ^{AAA}	8,7±0,6 ^{BB}	4,9±0,5 ^{CCC}
Tb.Th (µm)	45±0,5	40±0,8 ^{AA}	47±0,3	46±2 ^{CCC}
Tb.N (x1000)	12±0,7	6±0,8 ^{AA}	16±2 ^{BB}	10±0,8 ^{CCC}
Tb.Sp	300±10	382±24 ^{AAA}	267±17 ^B	303±13 ^{CCC}
SMI	2,4±0,04	2,4±0,07	2,3±0,1	2,5±0,07
DA	2,7±0,3	3,5±0,5 ^{AA}	2,2±0,2	4,2±0,8 ^{AA}
Porosidade (%)	94±0,3	97±0,3 ^{AAA}	92±0,9 ^B	95±0,5 ^{AA}

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetros trabeculares da vértebra. Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 ug/100 g PC/dia) por 90 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. BV/TV=volume ósseo/volume de tecido, Tb.Th=espessura trabecular, Tb.N=número de trabéculas, Tb.Sp= separação trabecular, SMI= índice de módulo estrutural, DA=grau de anisotropia. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=6-11 por grupo). A p<0,05, AA p<0,01 e AAA p<0,001 animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B p<0,05, BB p<0,01 e BBB p<0,001 Selv vs KO controles. CC p<0,01 e CCC p<0,001 vs. Selv T3.

4.3.2.2 Cortical

Através das análises por microtomografia computadorizada da L5, pode-se observar parâmetros corticais das vértebras, como está mostrado nas tabelas a seguir e exemplificado nas imagens ao final.

O hipertireoidismo foi capaz de diminuir a área total (30%, $p<0,001$ e 36%, $p<0,01$), área óssea (35%, $p<0,001$), e perímetro endosteal (127%, $p<0,001$ e 130%, $p<0,001$) dos animais Selv. Mais uma vez, os animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ se mostraram resistentes a esses efeitos. A área medular foi diminuída nas duas linhagens tratadas com T3 por 30 dias, sendo que nos Selv essa diminuição foi de 2 vezes, $p<0,001$ e nos KO de 70%, $p<0,001$.

Tabela 11 – Efeito do tratamento com T3, durante 30 dias (60 dias de idade), nos parâmetros corticais da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$.

	Selv.	Selv (T3)	$\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$	$\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ (T3)
T.Ar (μm^2)	61 $\pm$ 2,7	47 $\pm$ 1,5 ^{AAA}	55 $\pm$ 6,3	48 $\pm$ 2,5
T.Pm (μm)	17 $\pm$ 0,6	16 $\pm$ 0,3	18 $\pm$ 2,2	14 $\pm$ 0,5
B.Ar (μm)	56 $\pm$ 2,8	45 $\pm$ 1,6	51 $\pm$ 5	46 $\pm$ 2,2
Área Medular	54 $\pm$ 3,9	21 $\pm$ 1,2 ^{AAA}	43 $\pm$ 6,6	26 $\pm$ 1,5 ^{AAA}
Perímetro Endosteal	189 $\pm$ 21	83 $\pm$ 5 ^{AAA}	203 $\pm$ 37	164 $\pm$ 10
Ct.Th (μm)	57 $\pm$ 2,7	53 $\pm$ 1,4	53 $\pm$ 2,2	62 $\pm$ 2,2
Porosidade Cortical (%)	0,31 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,18	0,3 $\pm$ 0,04

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetros corticais do fêmur. Os animais foram tratados com dose supra fisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 $\mu\text{g}/100$ g PC/dia) por 30 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. T.Ar= Área dentro do periosteio, T.Pm=Perímetro do periosteio, B.Ar= Área de secção transversal, Ct.Th=Espessura cortical. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=6-11 por grupo). A $p<0,05$, AA $p<0,01$ e AAA $p<0,001$ animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B $p<0,05$, BB $p<0,01$ e BBB $p<0,001$ Selv vs KO controles.

Tabela 12 – Efeito do tratamento com HT, durante 90 dias (120 dias), nos parâmetros corticais da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}.

	Selv.	Selv (T3)	α_{2C} -AR ^{-/-}	α_{2C} -AR ^{-/-} (T3)
T.Ar (μm^2)	45 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1 ^{AA}	52 $\pm$ 2	44 $\pm$ 3 ^C
T.Pm (μm)	13 $\pm$ 0,2	12 $\pm$ 0,1	13 $\pm$ 0,2	13 $\pm$ 0,3
B.Ar (μm)	42 $\pm$ 1	31 $\pm$ 1 ^{AAA}	48 $\pm$ 2	42 $\pm$ 1,5 ^{CC}
Área Medular	25 $\pm$ 6	13 $\pm$ 1,1 ^{AAA}	23 $\pm$ 1,3	20 $\pm$ 1,2 ^C
Perímetro Endosteal	122 $\pm$ 4,5	53 $\pm$ 1,5 ^{AAA}	115 $\pm$ 6,6	105 $\pm$ 6,7 ^{CCC}
Ct.Th (μm)	58 $\pm$ 0,7	51 $\pm$ 1,6	57 $\pm$ 2,9	61 $\pm$ 3,7
Porosidade Cortical (%)	0,14 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,06

Efeito do hipertireoidismo nos parâmetros corticais do fêmur. Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 7 $\mu\text{g}/100$ g PC/dia) por 30 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. T.Ar= Área dentro do periosteio, T.Pm=Perímetro do periosteio, B.Ar= Área de secção transversal, Ct.Th=Espessura cortical. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=6-11 por grupo). A p<0,05, AA p<0,01 e AAA p<0,001 animais tratados com salina vs. animais da mesma linhagem tratados com T3. B p<0,05, BB p<0,01 e BBB p<0,001 Selv vs KO controles. CC p<0,01 e CCC p<0,001 vs Selv T3.

Figura 18 - Imagens 3D obtidas por μCT da quinta vértebra lombar (L5) de camundongos Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados por 30 ou 90 dias com solução salina ou T3.

Efeito do excesso de hormônio tireoidiano nos parâmetros trabeculares e corticais da quinta vértebra lombar (L5) de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}. Imagens obtidas por microtomografia computadorizada (μCT).

4.4 Teste Biomecânico

Nosso próximo passo foi avaliar a resistência óssea do fêmur e da tíbia dos animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ através do teste de flexão de três pontos. Observa-se, na Fig. 19 A e 19 B que os animais KO tratados com salina por 30 dias (60 dias de idade) apresentaram menor carga em quebra do que os animais Selv (50%, $p<0,01$). De forma semelhante, os animais KO tratados com salina por 90 dias mostraram menor carga máxima (60%, $p<0,01$) e carga em quebra (50%, $p<0,01$) no fêmur do que os animais Selv. O tratamento durante 30 dias com HT foi capaz de diminuir a carga em quebra apenas do fêmur dos animais Selv (33%, $p<0,001$) (Fig. 26 A), enquanto que o tratamento mais longo (90 dias) reduziu tanto a carga máxima como a carga em quebra femoral desses animais (23%, $p<0,05$ e 25%, $p<0,001$, respectivamente) (Fig. 19 F e G). O tratamento de 90 dias também diminuiu a carga máxima do fêmur dos animais KO em 23%, $p<0,05$ (FIG. 19 F).

De forma semelhante ao que foi encontrado no fêmur, os animais KO tratados com salina por 30 e 90 dias apresentaram redução significativa da carga máxima tibial (70%, $p<0,01$ e 60%, $p<0,01$, respectivamente) e da carga em quebra (75%, $p<0,01$ e 60%, $p<0,01$, respectivamente) (Fig. 19 K, P L Q), quando comparados com animais Selv na mesma condição. Os animais controle KO tratados com salina por 90 dias também apresentaram diminuição na resiliência, sendo essa diferença de 65%, $p<0,001$ (Fig. 19 T). A tirotoxicose induzida por 30 ou 90 dias diminuiu a carga máxima (50%, $p<0,01$ e 25%, $p<0,001$, respectivamente) (Fig. 19 K e P), carga em quebra (40%, $p<0,01$ e 35%, $p<0,01$, respectivamente) (Fig. 19 L e Q) e resiliência (40%, $p<0,05$ e 60% $p<0,001$, respectivamente) (Fig. 19 O e T) dos animais Selv. Os animais KO foram resistentes aos efeitos deletérios do excesso de HT na resistência do fêmur e da tíbia.

Figura 19 - Parâmetros biomecânicos em animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 e 90 dias.

Parâmetros biomecânicos do fêmur e tíbia de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} controles e tratados com dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias, com idade de 60 e 120 dias ao final do tratamento. Os dados foram obtidos através do teste de flexão de três pontos. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=10-12). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs. grupo não tratado (Selv vs. Selv T3, KO vs. KO T3). + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ vs. Selv ou Selv T3.

4.5 - Expressão gênica

4.5.1 Fêmur

Através de PCR em tempo real, avaliamos a expressão gênica de diversos fatores relacionados com o controle do metabolismo ósseo.

A Fig. 20 mostra a expressão gênica dos receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3) no fêmur dos animais Selv (Selv) e α_{2C} -AR^{-/-} que foram tratados com salina ou com T3 durante 30 ou 90 dias. Os animais KO tratados com salina durante 30 dias apresentaram maior expressão dos receptores β_3 do que os animais Selv (2,3 vezes, $p < 0,01$). Por outro lado, a expressão do β_1 foi 40% menor nos animais KO tratados com salina por 90 dias.

O tratamento durante 30 dias com T3 aumentou significativamente a expressão dos receptores β_2 e β_3 nos animais Selv (2 vezes e 2,1 vezes, respectivamente) e α_{2C} -AR^{-/-} (2,2 vezes 1,7 vezes, respectivamente).

Figura 20 - Expressão Gênica dos receptores β -adrenérgicos no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3.

Expressão dos receptores adrenérgicos β_1 , β_2 e β_3 no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou HT durante 30 ou 90 dias. O fêmur foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído com trizol e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=4-5$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ grupo salina vs. T3, + $p < 0,05$ vs. Selv + T3.

Também foi avaliada a expressão dos receptores α_{2A} e α_{2B} , e como pode ser observado na Fig. 21, os animais KO tratados com salina durante 30 dias, apresentaram menor expressão de α_{2B} (60%, $p<0,05$) quando comparados ao grupo selvagem. O tratamento de 30 dias com T3 foi capaz de diminuir em 50% a expressão desse mesmo receptor nos animais Selv, mas não nos animais KO (Fig. 21 B). Além disso, os animais KO tratados durante 90 dias apresentaram menor expressão do α_{2B} (60%, $p<0,01$) do que os Selv (Fig. 21 D).

Figura 21 - Expressão gênica dos receptores α -adrenérgicos no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3.

Expressão dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2B} no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou HT por 30 ou 90 dias. O fêmur foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído com trizol e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=4-5$). * $p<0,05$ grupo salina vs. T3, + $p<0,05$, ++ $p<0,01$ vs. Selv + T3.

Para melhor investigar o envolvimento dos α_{2C} -AR na fisiologia óssea e na interação HT-SNS no controle do metabolismo ósseo, avaliou-se o efeito do T3 na expressão gênica do sistema RANKL-RANK-OPG. Os níveis de RNAm de RANKL foram maiores no fêmur (95%) nos animais KO tratados com salina durante 30 dias (60 dias de idade), quando comparados com os animais Selv controles. Essa diferença não foi observada nos animais tratados com salina por 90 dias (120 dias de idade). Também foi observado que o tratamento com T3 durante 30 dias aumentou significativamente os níveis de expressão do RNAm do RANK e do RANKL (2,5 e 2,6 vezes, respectivamente) e diminuiu a expressão de OPG (50%) no fêmur dos animais Selv, mas isso não aconteceu nos animais KO (Fig. 22 A-C). Esses efeitos não foram observados quando o tratamento se alongou por 90 dias (Fig. 22 F-H). O único efeito visto no tratamento mais longo foi a diminuição da expressão da OPG (Fig. 22 H), que foi observada no fêmur dos animais Selv quanto nos KO (93% e 50% respectivamente). Também foi avaliada a expressão gênica de genes relacionados com a formação e reabsorção ósseas, tais como osteocalcina

(OC) e tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), respectivamente. O tratamento com T3, tanto o de 30 quanto o de 90 dias de duração, aumentou significativamente a expressão de osteocalcina no fêmur em 2,6 e 1,2 vezes, respectivamente nos animais Selv. (Fig. 22 D, I, E, J). Esse efeito do excesso de HT não foi observado no fêmur dos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ após 30 dias de tratamento (Fig. 22 D), mostrando certa resistência dos KO ao aumento da expressão de OC induzida por T3, um conhecido efeito do hormônio tireoidiano (88). A expressão de TRAP, por sua vez, foi significativamente aumentada pelos dois tratamentos com T3 (30 e 90 dias de duração) em 2 e 2.5 vezes, respectivamente, nos animais Selv e, esse efeito foi claramente bloqueado pela falta dos receptores $\alpha_{2C}\text{-AR}$ no tratamento curto (Fig. 22 E).

Figura 22 - Expressão Gênica de genes relacionados com o metabolismo ósseo no fêmur de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Expressão do RANKL (A e F), RANK (B e G), OPG (C e H), OC (D e I) e TRAP (E e J) em animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com salina ou HT por 30 ou 90 dias. O fêmur foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído com trizol e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-5). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ grupo salina vs. tratado com T3, + $p < 0,05$ vs. Selv + T3.

Com relação à expressão dos receptores nucleares do hormônio tireoidiano (TR α e TR β), o tratamento com T3 durante 30 dias foi capaz de diminuir a expressão do TR α apenas nos animais Selv (22% p<0,05) (Fig. 23 A).

Figura 23 - Expressão gênica dos TR α e TR β no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR $^{-/-}$ tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Expressão do TR α (A e C) e do TR β (B,e D) no fêmur de animais Selv e α_{2C} -AR $^{-/-}$ tratados com salina ou HT por 30 ou 90 dias. O fêmur foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído com trizol e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-5). *p<0,05 grupo salina vs. tratado com T3.

4.5.2 Vértebra

Também foi avaliada a expressão gênica na terceira vértebra lombar (L3) de animais Selv e α_{2C} -AR $^{-/-}$.

A Fig. 24 mostra a expressão dos receptores β -adrenérgicos, em que se observa que o tratamento com hormônio tireoidiano, tanto o de 30 como o de 90 dias de duração, aumentou significativamente a expressão desses receptores tanto nos animais Selv quanto nos KO. Nas Figs. 24 B e C nota-se que o tratamento de 30 dias aumentou a expressão dos receptores β_2 e β_3 nos animais Selv (66% e 3 vezes, respectivamente), efeito esse que foi bloqueado pela falta dos receptores α_{2C} . Por outro lado, o tratamento longo, de 90 dias, aumentou os níveis de β_1 , β_2 e β_3 nos animais Selv (1.5 vezes, 28% e 60%, respectivamente) e de β_1 e β_2 (66 e 31%, respectivamente) nos KO.

Figura 24 - Expressão Gênica dos receptores β -adrenérgicos na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Expressão dos receptores adrenérgicos β_1 , β_2 e β_3 na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou HT durante 30 ou 90 dias. A vértebra foi coletada imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído com trizol e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-5). *p<0,05, **p<0,01 grupo salina vs. tratado com T3, + p<0,05, +++p<0,001 vs. Selv + T3.

O tratamento durante 90 dias com hormônio tireoidiano dobrou significativamente a expressão dos receptores α_{2A} e α_{2B} na vértebra dos animais Selv, mas não nos animais α_{2C} -AR^{-/-} (Fig. 25 C e D).

Figura 25 - Expressão Gênica dos receptores α -adrenérgicos na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Expressão dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2B} na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-} tratados com salina ou HT por 30 ou 90 dias. A vértebra foi coletada imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído com trizol e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-5). *p<0,005, ***p<0,001 grupo salina vs. tratado com T3, + p<0,05, ++p<0,01 vs. Selv + T3.

Opostamente ao que foi observado no fêmur, a expressão do RANKL na terceira vértebra lombar foi menor nos animais KO tratados com salina durante 30 dias (60 dias de idade) quando comparados aos animais Selv. (Fig. 29 B e G). Essa diferença não foi observada nos animais tratados com salina durante 90 dias (120 dias de idade). A expressão de RANKL diminuiu 40% pelo tratamento com T3

durante 30 dias e aumentou 2,3 vezes pelo tratamento de 90 dias nos animais Selv, efeito esse que não foi observado nos animais KO (Fig. 29 B e G). O RANK não foi afetado por nenhum tratamento (Fig. 29 A e F), enquanto a expressão de OPG aumentou de 42% a 100% pelos tratamentos de 30 e 90 dias, respectivamente, tanto nos animais Selv quanto nos animais KO (Fig. 29 C e H). O excesso de HT, durante 30 ou 90 dias, causou aumento significativo da expressão de OC em 1,6 e 1,7 vezes na vértebra dos animais Selv (Fig. 29 D e I). Apenas o tratamento curto, de 30 dias, aumentou a expressão de OC nos animais KO em 21% (Fig. 29 I). Assim como no fêmur, a expressão de TRAP foi aumentada de 2 a 2,5 vezes na vértebra dos animais Selv tratados por 30 ou 90 dias, e esse efeito, mais uma vez, não foi observado nos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ (Fig. 29 E e J).

Figura 26 - Expressão Gênica de genes relacionados com o metabolismo ósseo no fêmur de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Expressão do RANKL (A e F), RANK (B e G), OPG (C e H), OC (D e I) e TRAP (E e J) na vértebra de animais Selv e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com salina ou HT por 30 dias ou 90. A vértebra foi coletada imediatamente após o sacrifício, o RNA extraído com trizol e a expressão gênica mensurada através de PCR em tempo real, a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-5). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 grupo salina vs. tratado com T3 ++p<0,01 e +++p<0,001 vs Selv + T3.

Conforme a Fig. 27 C, nota-se que os níveis dos receptores TR α estão 70% maiores nos animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ controles tratados com salina durante 90 dias do que nos animais Selv.

Além disso, observa-se que o tratamento com T3 durante 30 e 90 dias dobrou a expressão dos receptores TR α e TR β nos animais Selv, mas não nos animais KO.

Figura 27 - Expressão gênica dos TR α e TR β na vértebra de animais Selv e α_{2C} -AR $^{-/-}$ tratados com salina ou T3 por 30 ou 90 dias.

Expressão do TR α (A e C) e do TR β (B,e D) na vértebra de animais Selv (Selv) e α_{2C} -AR $^{-/-}$ tratados com salina ou HT por 30 ou 90 dias. A vértebra foi coletada imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído com trizol e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real a partir do cDNA. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-5). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 grupo salina vs. tratado com T3, +p<0,05, ++p<0,01 vs Selv + T3.

5 RESULTADOS *IN VITRO*

5.1 Osteoclastogênese

Após as análises de microtomografia óssea, teste biomecânico e expressão gênica, ficou claro que os receptores α_{2C} adrenérgicos possuem papel importante na fisiologia óssea. Assim, foi feito um desenho experimental *in vitro* com cultura primária de osteoclastos oriundos da medula óssea dos ossos longos, como fêmur, tíbia e úmero para avaliar uma possível ação direta desses receptores na diferenciação e função osteoclásticas.

O primeiro objetivo foi avaliar a ação de um agonista α_2 adrenérgico, o UK 14,304 (UK), e de um antagonista, a Yohimbina (YOH), na diferenciação de macrófagos em osteoclastos maduros. As células que foram tratadas com o agonista (UK) durante todo o processo de indução da diferenciação apresentaram diminuição na osteoclastogênese quando comparadas com as células não tratadas (aproximadamente 5 vezes menos) (Fig. 28 A-C). De forma oposta, porém consistente, o tratamento com o antagonista (Yohimbina) causou aumento de 30% na diferenciação osteoclástica (Fig. 28 D-F).

Figura 28 – Influência do agonista α_2 adrenérgico UK 14,304 e do antagonista Yohimbina na diferenciação osteoclástica de macrófagos oriundos da medula óssea de ossos longos (Fêmur, tíbia e úmero).

A - Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias de cultura em meio de diferenciação. B - Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias sob tratamento com UK 14,304 (6×10^{-5} M) adicionado ao meio de diferenciação. C – Número de osteoclastos por poço em placa de 96 poços. D – Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias de cultura em meio de diferenciação. E – Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias sob tratamento com Yohimbina (1 μ M) adicionado ao meio de diferenciação. F – Número de osteoclastos por poço em placa de 96 poços. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3). *p<0,05 e **p<0,01.

Os resultados *in vivo* mostraram que os animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam fenótipos ósseos opostos no fêmur e na quinta vértebra lombar. O volume ósseo e o número de trabéculas são menores nos fêmures e maiores nas vértebras dos animais KO quando comparados com camundongos Selv. Dessa forma, o experimento a seguir foi desenvolvido para avaliar se a resposta osteoclástica *in vitro* é diferente de macrófagos oriundos de ossos longos (fêmur e tíbia) (Fig. 29 A-C) e vértebras (L4-L6) (Fig. 29 D-F).

Como se observa nas imagens a seguir, a diferenciação osteoclástica *in vitro* ocorre de forma semelhante em células oriundas de fêmur ou de vértebra. Também pudemos verificar que a diminuição da formação de osteoclastos causada pelo agonista α_2 adrenérgico UK 14,304 ocorre de forma semelhante nos dois casos, assim como mostrado na figura anterior.

Figura 29 – Influência do agonista UK 14,304 na diferenciação osteoclástica de macrófagos oriundos de ossos longos e de vértebras lombares (L4-L6).

Efeito do agonista UK 14, 304 na osteoclastogênese. A - Osteoclastos TRAP positivos oriundos da medula óssea de ossos longos (fêmur e tibia), após 5 dias de cultura em meio de diferenciação. B - Osteoclastos TRAP positivos oriundos da medula óssea de ossos longos, após 5 dias sob tratamento com UK 14,304 (6×10^{-5} M) adicionado ao meio de diferenciação. C - Número de osteoclastos por poço em placa de 96 poços. D - Osteoclastos TRAP positivos oriundos da medula óssea das vértebras lombares L4, L5 e L6 após 5 dias de cultura em meio de diferenciação. E - Osteoclastos TRAP positivos oriundos da medula óssea das vértebras lombares L4, L5 e L6, após 5 dias sob tratamento com UK14,304 adicionado ao meio de diferenciação. F - Número de osteoclastos por poço em placa de 96 poços. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=3$). * $p<0,05$.

5.2 Teste de Toxicidade com MTT

A diminuição da osteoclastogênese causada pelo UK 14,304 poderia ser causada por toxicidade e diminuição do número de células ao longo do período de diferenciação. Para verificar essa possibilidade, fizemos o teste com MTT, um reagente que permite avaliação da viabilidade celular. Como se observa na figura 30, as doses utilizadas nos experimentos não causam morte celular e, portanto, legitimam os resultados obtidos.

Figura 30 – Avaliação da toxicidade das drogas adicionadas ao meio de cultura durante a diferenciação osteoclástica.

MTT teste com o agonista, UK 14, 304 e o antagonista, YOH. A – Absorbância obtida após tratamento das células em cultivo por 3 horas em MTT a 37 °C, com e sem tratamento prévio em UK14,304 (6×10^{-5} M) adicionado ao meio de cultura durante 48 horas. B – Absorbância obtida após tratamento das células em cultivo por 3 horas em MTT (mostra viabilidade celular) a 37 °C, com e sem tratamento prévio em YOH (0,1 µM e 1 µM). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5).

5.3 Expressão Gênica

O passo seguinte foi avaliar a expressão gênica dos receptores α_2 adrenérgicos em pré-osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4). Pode-se observar na Fig. 31 A que a expressão do receptor α_{2A} tanto em células pré osteoclásticas quanto em células já diferenciadas é superior à dos outros receptores.

Após confirmar a expressão dos receptores nos osteoclastos, o próximo experimento diz respeito ao efeito do agonista UK 14,304. Como se observa na Fig. 31 B, a expressão dos receptores α_{2A} e α_{2B} não é alterada estatisticamente em resposta ao tratamento com a droga.

Figura 31 – Expressão dos receptores adrenérgicos em pré-osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) e a influência do agonista UK 14,304.

A - Expressão dos receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4). B - Expressão dos receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com agonista UK 14,304. O RNA foi extraído após os respectivos dias e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3).

Em seguida, avaliamos a expressão de fatores já bem descritos na literatura por regularem a diferenciação e função osteoclástica.

Com relação ao fator de transcrição majoritário da osteoclastogênese, NFATc1 (*nuclear factor of activated T-cells calcineurin 1*) (Fig. 32 A), o tratamento com o agonista UK14,304, como esperado, diminuiu sua expressão tanto em pré-osteoclastos (25%, $p<0,01$), quanto em osteoclastos maduros (38%, $p<0,01$).

O tratamento com a mesma droga também causou diminuição significativa na expressão gênica da Catepsina K, que funciona como um marcador de diferenciação osteoclástica tardia. A diferença nos pré-osteoclastos foi de 20%, $p<0,05$, e em osteoclastos maduros de 36%, $p<0,01$, quando comparados com células não tratadas (Fig. 32 B).

Já a expressão de c-Fos não foi alterada, sugerindo que o controle dos receptores α_2 adrenérgicos na osteoclastogênese se dê distalmente (“downstream”) a esse componente (Fig. 32 C), na via de sinalização.

Figura 32 – Expressão dos marcadores de diferenciação osteoclástica e a influência do agonista UK 14,304

A - Expressão do fator de transcrição NFATc1 em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com agonista UK 14,304. B - Expressão do marcador de diferenciação tardia Catepsina K em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com agonista UK 14,304. C – Expressão do marcador de diferenciação c-Fos em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com agonista UK 14,304. O RNA foi extraído após os respectivos dias e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=3$). ** $p<0,01$ vs CTRL.

Também avaliamos por PCR em tempo real, a expressão gênica da Catepsina K e do receptor de Calcitonina sob efeito do tratamento com o antagonista α_2 Yohimbina (Fig. 33).

Como se observa na Fig. 33 A, o tratamento causou aumento significativo da transcrição de Catepsina K. Os pré-osteoclastos tratados apresentaram 2 vezes ($p<0,05$) mais catepsina K do que as células controle, enquanto nos osteoclastos maduros, a expressão foi 15% maior ($p<0,05$).

Com relação à expressão do receptor de calcitonina, um marcador importante de diferenciação osteoclástica, apenas os pré-osteoclastos apresentaram aumento, sendo de 30% ($p<0,05$).

Figura 33 – Expressão dos marcadores de diferenciação osteoclástica e a influência do antagonista Yohimbina

A - Expressão do marcador de diferenciação tardia Catepsina K em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com antagonista Yohimbina. B – Expressão do receptor de Calcitonina em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com antagonista Yohimbina. O RNA foi extraído após os respectivos dias e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=3$). * $p<0,05$ vs CTRL.

5.4 Expressão protéica

Em seguida, foi avaliada a expressão protéica de fatores controladores da diferenciação e sobrevivência osteoclástica. Nossa primeira tentativa foi avaliar a via das MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), a fim de verificar se os efeitos causados pelo agonista UK 14,304 ocorre, pelo menos parcialmente, via MAPK. Após 48 horas do plaqueamento, foi feito o tratamento com a droga durante 5, 10 ou 30 minutos. Após esse período, o conteúdo protéico total das células foi extraído e através de western blot, pudemos avaliar a expressão de fatores específicos, como p38 MAPK fosforilada, JNK (*jun amino-terminal kinases*) fosforilada e ERK

(*extracellular-signal-regulated kinases*) 1,2 fosforilada. O controle interno foi feito com β Actina.

Como pode ser observado na Fig. 34, após 30 minutos de exposição ao UK 14,304, as células apresentaram diminuição da expressão protéica de fJNK e fERK, sugerindo uma menor ativação dessa via, o que pode explicar, ao menos, parcialmente, a diminuição na diferenciação osteoclástica causada pelo agonista.

Figura 34 – Expressão protéica da via de sinalização da MAPK e a influência do agonista UK 14,304.

Expressão protéica por Western Blot de componentes da via da MAPK envolvida na diferenciação e função osteoclástica de macrófagos oriundos da medula óssea de ossos longos. As células foram tratados ou não com o agonista UK 14,304 durante 5, 10 ou 30 min e o conteúdo protéico total foi extraído com buffer específico (n=3).

Também foi feita a expressão protéica de NFATc1 e de c-Fos após o tratamento com o agonista (Fig. 35 A) e o antagonista (Fig. 35 B).

Corroborando com a expressão gênica, o UK 14,304 causou diminuição importante da expressão de NFATc1 no dia 4, enquanto que a expressão de c-Fos não foi alterada (Fig. 35 A). Por outro lado, coerentemente, o tratamento com o antagonista Yohimbina causou aumento da expressão de NFATc1, o que explica parcialmente o aumento da diferenciação osteoclástica causada pela ativação dos receptores α_2 adrenérgicos (Fig. 35 B).

Figura 35 – Expressão protéica dos fatores de diferenciação osteoclástica.

A - Expressão protéica por Western Blot de NFATc1 e c-Fos de macrófagos oriundos da medula óssea de ossos longos (Dia 0), pré osteoclastos (Dia 2) e osteoclastos maduros (Dia 4). As células foram tratadas ou não com o agonista UK 14,304 e o conteúdo protéico total foi extraído com buffer específico. B- Expressão protéica por Western Blot de NFATc1 e c-Fos de pré osteoclastos (Dia 2) e osteoclastos maduros (Dia 4). As células foram tratadas ou não com o antagonista Yohimbina e o conteúdo protéico total foi extraído com buffer específico (n=3).

5.5 Hiper expressão do NFATc1

Para confirmar que o controle da diferenciação osteoclástica pelos receptores α_2 adrenérgicos é feito através do NFATc1, foi desenvolvido um experimento cujo objetivo principal era avaliar a osteoclastogênese em células com hiper expressão desse fator de transcrição, com e sem tratamento com o UK 14,304.

Como pode ser observado na figura a seguir, a hiper expressão de NFATc1 causou, como esperado, o aumento da formação osteoclástica em 84%, $p < 0,001$ (Fig. 36 C). Porém essa hiper expressão não foi suficiente para recuperar totalmente a osteoclastogênese na presença de UK 14,304, sugerindo que o NFATc1 não é o único fator a sofrer influência da ativação dos receptores em questão.

Já a Fig. 36 F, mostra que o procedimento funcionou devidamente e que as células realmente apresentam aumento importante na expressão de NFATc1, tanto as PlatEs (células usadas para a obtenção do material viral), quanto os macrófagos infectados. Corroborando com os resultados da diferenciação, o NFATc1 foi negativamente regulado pelo UK 14,304.

Figura 36 – Avaliação do efeito do agonista α_2 adrenérgico UK 14,304 na osteoclastogênese de células previamente infectadas com o vetor de indução a hiper expressão de NFATc1.

Efeito do UK em células com hiper expressão de NFATc1. A - Osteoclastos TRAP positivos infectados com vetor vazio, após 5 dias de cultura em meio de diferenciação (VV). B - Osteoclastos TRAP positivos infectados com vetor vazio, após 5 dias de cultura com UK 14,304 (6×10^{-5} M) adicionado ao meio de diferenciação (VV+UK). C - Osteoclastos TRAP positivos infectados com vetor que carrega o fator de transcrição NFATc1, após 5 dias de cultura em meio de diferenciação (NFAT). D - Osteoclastos TRAP positivos infectados com vetor que carrega o fator de transcrição NFATc1, após 5 dias de cultura com UK 14,304 (6×10^{-5} M) adicionado ao meio de diferenciação (NFAT+UK). E - Número de osteoclastos por poço em placa de 96 poços (VV-Vetor vazio, VV+UK - vetor vazio mais tratamento com UK 14,304, NFAT - vetor carregado com o fator de transcrição NFATc1, NFAT+UK - Vetor carregado com o fator de transcrição NFATc1). F - Western Blot da expressão gênica de NFATc1 em todos os estágios do processo de transfecção (PlatEs) e infecção (Macrófagos). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3). ***p<0,001 vs VV, +++ p<0,001 vs NFAT.

5.6 Anéis de Actina

Outra forma de investigar metabolismo osteoclástico é avaliar a função celular. Existem duas metodologias principais para isso: a primeira é através da coloração dos anéis de actina, que mostram a superfície de adesão dos osteoclastos no osso. A segunda é através da coloração dos pontos de reabsorção em que é possível a visualização da área de osso reabsorvido.

A Fig. 37 mostra a influência do UK 14,304, o agonista dos receptores adrenérgicos α_2 , e da Yohimbina, o antagonista. Como podemos ver abaixo, a inativação dos receptores pela Yohimbina parece aumentar o potencial reabsorptivo dos osteoclastos, uma vez que eles apresentam maior número e diâmetro dos anéis de actina (Fig. 37 C).

Figura 37 – Influência do agonista UK 14,304 e do antagonista Yohimbina na formação dos anéis de actina

Anéis de actina obtidos através de fluorescência em aumento 400X após 6 dias de cultura em meio osteoclastogênico. A cultura foi feita em placas de 96 poços com um pedaço de osso em cada poço para que a mimetização da reabsorção pudesse ser real. A - Células sem tratamento. B – Células tratadas durante todo o período com agonista UK14,304. C – Células tratadas durante todo o período com antagonista Yohimbina.

5.7 Pontos de reabsorção óssea

A Fig. 38 A e B mostra a área de reabsorção em coloração marrom, e a quantificação (Fig.38 C) mostra que o UK 14,304, causou uma diminuição da área de reabsorção de 49%, $p < 0,01$, quando comparado com as células não tratadas. Esse resultado já era esperado, uma vez que macrófagos tratados com UK têm menor potencial de diferenciação osteoclástica.

Figura 38 – Influência do agonista UK 14,304 na função osteoclástica

Pontos de reabsorção obtidos através de coloração com DAP em aumento 400X após 6 dias de cultura em meio osteoclastogênico. A cultura foi feita em placas de 96 poços com um pedaço de osso em cada poço para que a mimetização da reabsorção pudesse ser real. A - Células sem tratamento. B - Células tratadas durante todo o período com agonista UK 14,304. C - Células tratadas durante todo o período com antagonista Yohimbina. ** $p < 0,01$ vs CTRL.

Por outro lado, osteoclastos tratados com Yohimbina durante a diferenciação parecem ser mais ativos, e, portanto, reabsorvem mais osso (Fig. 39 C). Mais uma vez, o resultado era esperado, uma vez que o antagonista causou um aumento na formação de osteoclastos, e, assim, a reabsorção, consequentemente, deve ser maior. Nesse caso, a diferença foi de 60%, $p < 0,001$.

Figura 39 – Influência do antagonista Yohimbina na função osteoclástica

Pontos de reabsorção obtidos através de coloração com DAP em aumento 400X após 6 dias de cultura em meio osteoclastogênico. A cultura foi feita em placas de 96 poços com um pedaço de osso em cada poço para que a mimetização da reabsorção pudesse ser real. A - Células sem tratamento. B - Células tratadas durante todo o período com antagonista Yohimbina. C - Células tratadas durante todo o período com antagonista Yohimbina. *** $p < 0,001$ vs CTRL.

5.7 Influência do hormônio tireoidiano na diferenciação e função osteoclásticas e suas interações com o SNS

O HT é um importante regulador do metabolismo ósseo e nós temos mostrado que o SNS interage com o HT para regular o remodelamento ósseo. Nesse sentido, foram feitos alguns experimentos para investigar se essa interação também acontece diretamente em osteoclastos.

O primeiro passo foi investigar a influência do hormônio tireoidiano na diferenciação osteoclástica e se o agonista do adrenoceptor α_2 , o UK 14,304, alteraria esse processo. As Figs. 40 A e B mostram que o hormônio tireoidiano sozinho não é suficiente para alterar a osteoclastogênese e o tratamento com UK causa o mesmo efeito com (Fig. 40 B) ou sem HT (Fig. 40 D), diminuindo a diferenciação dos osteoclastos por volta de 35%, $p < 0,05$ (Fig. 40 E).

Figura 40 – Efeito do tratamento combinado de UK+T3 na osteoclastogênese.

A - Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias de cultura em meio de diferenciação. B - Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias sob tratamento com hormônio tireoidiano ($T3-10^{-8}$ M) adicionado ao meio de diferenciação. C - Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias sob tratamento com UK 14,304 (6×10^{-5} M) adicionado ao meio de diferenciação. D - Osteoclastos TRAP positivos após 5 dias sob tratamento combinado com UK 14,304 (6×10^{-5} M) e hormônio tireoidiano T3 (10^{-8} M) adicionado ao meio de diferenciação. E - Número de osteoclastos por poço em placa de 96 poços. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=3$). * $p < 0,05$ vs CTRL e # $p < 0,05$ vs T3.

Como dito anteriormente, existem diversos marcadores da osteoclastogênese, como NFATc1 e c-Fos e, através de PCR em tempo real, analisou-se a expressão gênica desses fatores.

A Fig. 41 A mostra que, no dia 4, em que se espera osteoclastos maduros, a expressão de NFATc1 é diminuída com o tratamento com UK (26%, $p < 0,01$), mesmo quando há o tratamento combinado com hormônio tireoidiano (30%, $p < 0,01$).

Figura 41 – Efeito do T3 na expressão gênica de NFATc1 e c-Fos durante a osteoclastogênese.

Expressão gênica de NFATc1 e c-Fos em pré-osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4). A - Expressão do fator de transcrição NFATc1 em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com agonista UK 14,304, hormônio tireoidiano T3 ou uma combinação dos dois. B - Expressão do marcador de diferenciação c-Fos em pré osteoclastos (Dia 2) e em osteoclastos maduros (Dia 4) tratados ou não com agonista UK 14,304, hormônio tireoidiano T3 ou uma combinação dos dois. O RNA foi extraído após os respectivos dias e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3). **p<0,01 vs CTRL, #p<0,05 vs T3.

Também foi avaliada a formação dos anéis de actina e dos pontos de reabsorção sob o tratamento com hormônio tireoidiano, para avaliar se a reabsorção *in vitro* sofre alteração com HT.

Na Fig. 42, nota-se que os anéis de actina não parecem ser diferentes após a exposição ao hormônio tireoidiano.

Figura 42 – Efeito do T3 na função osteoclástica, na formação dos anéis de actina.

Anéis de actina obtidos através de fluorescência em aumento 400X após 6 dias de cultura em meio osteoclastogênico. A cultura foi feita em placas de 96 poços com um pedaço de osso em cada poço para que a mimetização da reabsorção pudesse ser real. A - Células sem tratamento. B - Células tratadas durante todo o período com agonista hormônio tireoidiano T3.

Por outro lado, quando avaliamos os pontos de reabsorção, fica claro que o hormônio tireoidiano aumentou a reabsorção óssea (Fig. 43 C). Porém, o tratamento

combinado de UK com hormônio tireoidiano não foi diferente do efeito do agonista sozinho (Fig. 43 D).

Figura 43 – Efeito do tratamento combinado de UK+T3 na função osteoclástica, na formação dos pontos de reabsorção.

Pontos de reabsorção obtidos através de coloração com DAP em aumento 400X após 6 dias de cultura em meio osteoclastogênico. A cultura foi feita em placas de 96 poços com um pedaço de osso em cada poço para que a mimetização da reabsorção fosse real. A - Células sem tratamento. B – Células tratadas durante todo o período com agonista UK14,304. C – Células tratadas durante todo o período com hormônio tireoidiano T3. D – Células tratadas durante todo o período com uma combinação de UK 14,304 e hormônio tireoidiano T3. *** $p < 0,001$ vs CTRL.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do fenótipo ósseo de camundongos com inativação do receptor adrenérgico α_{2C}

Os receptores α -adrenérgicos são conhecidos por possuírem um importante papel na auto-regulação da liberação de catecolaminas em nervos simpáticos e neurônios adrenérgicos no sistema nervoso central (73), funcionando, portanto, como autorreceptores. Porém, as funções individuais de cada um dos subtipos de receptores (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) nesse processo ainda não foram totalmente elucidadas.

Sabe-se que o subtipo α_{2C} modula a neurotransmissão em condições de baixos níveis de atividade neural (12), e que está diretamente relacionado com o complexo de memória e funções comportamentais (89). Apesar de todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos (61) poderem ser ativados pela adrenalina e noradrenalina, apenas os subtipos α parecem estar ligados à inibição pré-sináptica da liberação de catecolaminas.

Estudos histológicos têm mostrado que tanto o tecido ósseo quanto o periósteo recebem um rico suprimento de fibras nervosas simpáticas e sensoriais. Além disso, axônios contendo catecolaminas têm sido identificados perto de osteoblastos (90), sugerindo uma regulação neuroendócrina do remodelamento ósseo (91).

Os receptores α_2 -adrenérgicos também são expressos em células não neuronais, agindo na função cardiovascular, regulando termogênese, pressão intraocular, metabolismo lipídico, analgesia, modulação da liberação de noradrenalina entre outros (92), que já foram muito bem descritos pela literatura. Estudos do nosso grupo têm sugerido influência desses receptores no controle do remodelamento ósseo.

Um trabalho do nosso grupo, publicado recentemente (72), mostrou que animais com dupla inativação dos adrenoceptores α_{2A} e α_{2C} ($\alpha_{2A}\alpha_{2C}$ -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo generalizado de alta massa óssea, apesar de apresentarem níveis plasmáticos elevados de noradrenalina e sinalização normal dos β_2 -ARs, sugerindo que não somente os receptores β_2 -adrenérgicos estão envolvidos no efeito deletério da ativação simpática no esqueleto, mas que as isoformas α_2 -AR

também podem estar envolvidas nesse processo. Nesse mesmo trabalho, foi mostrada a presença desses receptores em osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e condrócitos de camundongos (72). Além disso, os receptores α_{2A} foram recentemente detectados em células humanas da linhagem osteoblástica (93).

Dessa forma, no presente estudo, foram avaliados animais com deleção isolada do receptor adrenérgico α_{2C} , com o intuito de investigar o seu papel na estrutura e fisiologia ósseas. Para tanto, camundongos fêmeas C57 e α_{2C} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram acompanhados por 30 e 90 dias. Ao final desses períodos, os seus tecidos foram coletados para análises.

Os animais duplo knockouts são bastante conhecidos por apresentarem aumento de tônus simpático (12) e consequente hipertrofia cardíaca. De forma semelhante, animais com deleção isolada do α_{2C} -AR também apresentam hiperatividade simpática, hipertrofia cardíaca e consequente falha do músculo cardíaco em resposta a aumento de pressão (94). Esses animais também apresentam aumento dos níveis de adrenalina circulante e na urina, o que pode ser explicado pelo fato dos adrenoceptores α_{2C} atuarem no feedback negativo para a liberação de adrenalina pelas células cromafins da medula adrenal (94).

Considerando-se que a composição corporal pode afetar a massa e estrutura ósseas (95), inicialmente foram realizadas algumas análises relacionadas com a caracterização da composição corporal dos animais α_{2C} -AR^{-/-}, como peso corporal e massa de músculos e gordura.

Os animais α_{2C} -AR^{-/-} de 120 dias de idade apresentaram-se ligeiramente mais leves que os animais Selv apenas nas últimas duas semanas de estudos. Esse fenótipo difere daquele dos animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}, que se mostraram mais pesados do que os animais Selv (72). Esses dados sugerem que o controle da massa corporal depende de uma complexa interação entre os receptores α_2 adrenérgicos, e que esse controle se intensifique conforme os animais vão envelhecendo.

Nenhum dos animais apresentou diferenças importantes com relação ao peso de músculos esqueléticos, porém os animais α_{2C} -AR^{-/-} apresentaram uma redução bastante importante na quantidade de gordura retroperitoneal em todas as idades avaliadas, corroborando estudos que mostram a ação antilipolítica desses receptores, devido a uma intervenção na função dos receptores β -adrenérgicos (96, 97). Assim, esses animais KO perdem essa função antilipolítica, facilitando portanto

a ação dos β -AR em desencadear a lipólise. Isso mostra mais uma vez, como já foi descrito na literatura, que as catecolaminas são importantes reguladores da atividade lipolítica, através da ativação dos receptores adrenérgicos. Essa menor massa de gordura retroperitoneal pode explicar, parcialmente, a diminuição de peso encontrada nos animais KO. Com o intuito de avaliar mais detalhadamente a composição corporal desses animais, foi realizado o processamento das carcaças dos animais, porém os resultados não foram elucidativos, não havendo diferenças importantes entre a linhagem controle e a KO (dados não mostrados).

Inesperadamente, observamos que os animais KO de todas as idades analisadas apresentaram menor comprimento femoral em relação aos Selv, o que também pode ter contribuído para a diminuição no peso corporal desses animais. Isso vai contra o que foi observado nos animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}, que apresentaram maior comprimento femoral (72). Vale ser dito que foi observada expressão, por imunohistoquímica, dos α_{2A} -AR e α_{2C} -AR na lâmina epifisial de camundongos (72). Além disso, dados ainda não publicados do nosso grupo mostram que há uma importante desorganização da lâmina epifisial do fêmur de animais α_{2C} -AR^{-/-} (98). Esses achados juntos reforçam a idéia de que os receptores α_2 adrenérgicos participam de maneira complexa da regulação do crescimento longitudinal ósseo.

Em uma etapa seguinte, avaliamos, por microtomografia computadorizada, a composição óssea trabecular e cortical do fêmur e da quinta vértebra lombar (L5).

Surpreendentemente, o fenótipo ósseo dos animais α_{2C} -AR^{-/-} foi diferente daquele apresentado pelos duplo KO. Enquanto o último apresenta um fenótipo generalizado de alta massa óssea (99), os animais α_{2C} -AR^{-/-} apresentaram menor volume de osso trabecular (BV/TV) no fêmur quando comparados com animais Selv, resultado esse que foi acompanhado foi diminuição da resistência óssea no fêmur e na tíbia.

Por outro lado, a análise por μ CT do corpo vertebral da quinta vértebra lombar (L5) mostrou que os animais α_{2C} -AR^{-/-} apresentaram maior BV/TV em relação aos animais Selv, assim como foi visto nos animais $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-}. Esse fenótipo heterogêneo apresentado reforça a hipótese de que o SNS regula estrutura e fisiologia ósseas, via receptores α_{2C} -AR, e que esse controle seja sítio dependente.

É muito importante considerar que a diminuição da massa óssea observada no fêmur dos animais α_{2C} -AR^{-/-} pode ser resultado da ativação local dos receptores

β_2 adrenérgicos, uma vez que eles apresentam um estado hiperadrenérgico (62). Uma questão intrigante é porque isso não acontece na vértebra desses animais. O fato dos animais duplo KO apresentarem alta massa óssea, mesmo apresentando aumento de tônus simpático, sugere que os receptores α_{2A} e/ou α_{2C} -AR também medeiam os efeitos osteopênicos do SNS. Portanto, a falta dos dois receptores pode resultar em um efeito anabólico que supre os efeitos negativos da ativação dos receptores β_2 -AR no osso (72). Seguindo essa idéia, a comparação entre o fenótipo ósseo dos animais α_{2C} -AR^{-/-} e $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} sugere que a falta apenas dos receptores α_{2C} seja suficiente para superar o efeito osteopênico da ativação dos adrenoreceptores β_2 na vértebra, enquanto a abstenção do α_{2A} -AR também seja necessária para bloquear o efeito osteopênico dos β_2 -AR no fêmur. Outro mecanismo a ser considerado na diferença entre os dois fenótipos é a desensibilização dos adrenoreceptores substanciada pela exposição a elevados níveis séricos de catecolaminas. Essa desensibilização refere-se a uma diminuição da resposta do receptor, que pode incluir fosforilação, internalização ou “down-regulation” (100). Esse feito de desensibilização ocorre tanto com os α_2 - quanto com os β_2 -ARs. Uma série de estudos mostra que os α_2 - e β_2 -ARs geralmente possuem co-localização (101), e que a desensibilização dos α_2 -ARs é dependente da ativação das GRK (G-coupled receptor kinases) pelos β_2 -ARs. Esse mecanismo envolve uma importante interação entre os dois tipos de receptores adrenérgicos (101), e é possível que isso varie de uma forma sítio dependente no esqueleto, o que poderia explicar parcialmente o fenótipo heterogêneo dos animais α_{2C} -AR^{-/-}.

A presença dos subtipos dos receptores α_2 -AR em células ósseas humanas e de camundongo sugere ações diretas do SNS no esqueleto. Essa hipótese é substanciada pela responsividade de osteoblastos derivados de calvária e osteoclastos derivados da medula óssea a um agonista seletivo α_2 -AR, a clonidina e a um antagonista não específico, a fentolamina (72, 99). Dessa forma, esses dados mostram que esses receptores possuem ações centrais e diretas, o que permanece para ser melhor investigado.

Para investigar a base do complexo fenótipo ósseo apresentado pelos animais α_{2C} -AR^{-/-}, avaliamos a expressão gênica do sistema RANK-RANKL-OPG, o qual possui um papel essencial na diferenciação e função osteoclástica (102). RANKL é expresso por osteoblastos e é o ligante do RANK, um receptor presente na

membrana de osteoclastos. A interação RANK-RANKL induz a diferenciação, função e sobrevivência osteoclástica (102). OPG também é expresso pelos osteoblastos, e é um limitador da osteoclastogênese, uma vez que se liga ao RANKL impedindo, portanto, sua ligação ao RANK. Um resultado interessante foi que os níveis de RNAm de RANKL foram maiores no fêmur e menores na vértebra dos animais de 60 dias de idade KO comparados com os Selv tratados com salina. Isso explica parcialmente o fenótipo oposto encontrado na vértebra e no fêmur dos animais α_{2C} -AR^{-/-}. Essas diferenças, porém, não foram observadas nos animais mais velhos, de 120 dias de idade. Também avaliamos a expressão de genes relacionados com o remodelamento ósseo, como a osteocalcina (OC), que é largamente expressa por osteoblastos nos últimos estágios de diferenciação e durante a mineralização da matriz extracelular (103) e TRAP, expresso por osteoclastos maduros e que está envolvido com reabsorção óssea (104). Os animais α_{2C} -AR^{-/-} de 60 dias de idade apresentaram aumento significativo da expressão de OC e TRAP, o que sugere um aumento do remodelamento ósseo. Porém, essa diferença não permaneceu nos animais mais velhos.

Em síntese, nós mostramos que a inativação global dos receptores adrenérgicos α_{2C} -AR em camundongos jovens resulta em um fenótipo ósseo heterogêneo, com uma importante diminuição do comprimento femoral, diminuição da massa e resistência ósseas do fêmur e aumento da massa óssea vertebral, sugerindo, portanto, que: (1) os receptores α_{2C} -adrenérgicos possuem um papel importante no metabolismo ósseo, e que (2) o SNS atua de forma heterogênea em diferentes sítios do esqueleto.

6.2 Efeito do HT no esqueleto de animais α_{2C} -AR^{-/-}

O hormônio tireoidiano (HT) tem importante papel no desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos (105) e seu excesso é extremamente prejudicial a homeostase do tecido ósseo. O HT estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea, regulando a atividade de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. No hipertireoidismo, tanto a formação quanto a reabsorção óssea estão aumentadas (57, 106), com predominância da última (56), favorecendo a reabsorção óssea (57), balanço negativo de cálcio (107) e perda de massa óssea (108).

Uma das características do hormônio tireoidiano ainda pouco estudada é sua interação com o SNS. Uma evidência dessa interação é o aumento do tônus simpático em pacientes com hipertireoidismo (77). Considerando que o SNS interage com o HT para regulação de diversos processos fisiológicos, como termogênese, lipólise e glicogenólise (76), e que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol corrige a hipercalcemia (78) e diminui a excreção urinária de hidroxiprolina (79), um marcador bioquímico de reabsorção óssea, nós levantamos a hipótese de que o HT também poderia interagir com o SNS para regular metabolismo ósseo. De fato, em uma publicação recente do nosso grupo, mostrou-se que os animais $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} são resistentes à osteopenia induzida pela tirotoxicose (99), o que reforça a interação HT-SNS para controle da massa óssea e sugere que essa interação depende da sinalização dos receptores α_{2A} e/ou α_{2C} -AR.

Dessa forma, no presente estudo, um dos principais objetivos foi investigar se o SNS interage com o HT, via receptores adrenérgicos α_{2C} , para regular a estrutura e fisiologia ósseas, uma vez que foi previamente mostrado que a expressão gênica desse receptor foi negativamente regulada pelo HT (99). Para isso, camundongos Selv e α_{2C} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados com salina ou dose suprafisiológica de T3 (~20 vezes a dose fisiológica: 7µg/100g PC) durante 30 e 90 dias.

Como esperado, os dois tratamentos (30 e 90 dias) foram eficientes em induzir um estado tirotóxico nas duas linhagens, uma vez que os níveis séricos de T3 foram aumentados (aproximadamente 8 vezes) e os níveis de T4 diminuídos (50%). Isso reflete a ação do excesso de T3 no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, resultando na diminuição da secreção de iodotironinas, incluindo o T4, que representa aproximadamente 60% da produção da glândula tireóide em roedores (86).

O excesso de hormônio tireoidiano promovido pela administração da dose suprafisiológica de T3 causou efeitos esperados nos animais Selv (109-111), como hipertrofia cardíaca, perda de massa corpórea, diminuição de coxins adiposos, deterioração da estrutura óssea e uma redução da resistência óssea ao stress mecânico. Por outro lado, a resposta a tirotoxicose apresentada pelos animais α_{2C} -AR^{-/-} foi diferente. O tratamento falhou em desenvolver hipertrofia cardíaca, aumentou o peso corpóreo, ao invés de diminuir, não causou perda de gordura e

afetou muito pouco a estrutura e resistência ósseas, sugerindo uma participação do SNS, via adrenocetores α_{2C} , nos efeitos deletérios da tirotoxicose no coração, na massa corpórea e no esqueleto.

Como dito anteriormente, os animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentaram um fenótipo ósseo heterogêneo, com baixa massa óssea femoral e alta massa óssea vertebral. Porém, os dois sítios esqueléticos se mostraram resistentes aos efeitos deletérios do excesso de HT no osso, assim como os animais $\alpha_{2A/2C}\text{-AR}^{-/-}$ (99). Como esperado, a tirotoxicose regulou negativamente diversos parâmetros do osso trabecular na metáfise distal do fêmur e no corpo vertebral da quinta vértebra lombar, a L5, nos animais Selv, mas não nos animais KO. Além disso, os tratamentos crônicos com T3 (30 e 90 dias de duração) diminuíram os parâmetros biomecânicos (carga máxima e carga em quebra) no fêmur e na tíbia dos animais Selv, mas não nos animais KO. Esses achados suportam, fortemente, a hipótese de que há uma interação HT-SNS para controle da estrutura e fisiologia ósseas. Contudo, com esses dados não é possível dizer se a interação HT-SNS ocorre localmente (no esqueleto) ou a nível central.

Outro achado bastante interessante deste estudo refere-se ao efeito do HT no crescimento longitudinal ósseo. O comprimento do fêmur foi diminuído pelo tratamento com dose suprafisiológica de T3, corroborando com o conhecido efeito do hormônio tireoidiano em acelerar a maturação óssea, resultando em fusão prematura das lâminas epifisiais e redução do crescimento linear ósseo (112). Todavia, mais uma vez, os animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mostraram-se resistentes ao efeito do T3. Novos estudos estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório para avaliar a influência do HT e do SNS no crescimento longitudinal ósseo.

Receptores adrenérgicos são bastante estudados com relação às suas funções na regulação das funções cardiovascular, uterina e muscular lisa. Porém, após demonstrações histológicas de fibras noradrenérgicas no osso, estudos farmacológicos têm sido feitos em osteoblastos e osteoclastos (105). Tem-se mostrado que os receptores β_2 adrenérgicos, estimulados pela leptina, influenciam os condrócitos da lâmina epifisial, inibindo a diferenciação e alterando, portanto, o crescimento longitudinal (113). Como já mostrado por nosso grupo, em estudo anterior (72), os receptores α_{2C} adrenérgicos estão presentes na lâmina epifisial e, portanto, devem influenciar o seu metabolismo e crescimento. Já que os animais

α_{2C} -AR^{-/-} apresentam β_2 intacto, e mesmo assim há alteração no crescimento longitudinal do fêmur, fica claro que os receptores α_2 também influenciam os condrócitos presentes na lâmina epifisial. Além disso, o presente estudo traz importantes evidências de que o hormônio tireoidiano depende de interações com a via do receptor adrenérgico α_{2C} para regular o crescimento longitudinal ósseo.

Com esses resultados, tornou-se interessante a avaliação, no tecido ósseo, da expressão gênica dos receptores de hormônio tireoidiano TR α e TR β e dos 9 subtipos de receptores adrenérgicos, além da expressão de genes relacionados ao remodelamento ósseo, como o RANK, RANKL e OPG, e a expressão do marcador de atividade osteoclástica, TRAP e osteoblástica, OC. O tratamento com 20 vezes a dose fisiológica de T3 causou aumento na expressão dos receptores β_2 -adrenérgicos, tanto no fêmur quanto na vértebra, mostrando que há uma possível correlação entre esses receptores e a ação deletéria do hormônio tireoidiano no esqueleto. O tratamento de 30 dias também aumentou a expressão de RANK e RANKL e diminuiu de OPG no fêmur dos animais Selv, mas não no fêmur dos KO, o que pode explicar parcialmente, a falta dos efeitos do T3 no esqueleto desses animais. Esses efeitos, porém, não foram observados no tratamento mais longo. A resposta do sistema RANK-RANKL-OPG foi diferente nas vértebras e foram bem semelhantes entre os animais Selv e α_{2C} -AR^{-/-}. O excesso de T3 aumentou a expressão do RNAm da OC no fêmur e na vértebra dos animais Selv, o que corresponde a um conhecido efeito do HT (88). Esse efeito, porém, foi menos expressivo nos animais KO. A expressão de TRAP também foi positivamente regulada pela tirotoxicose no fêmur e na vértebra dos animais Selv, e claramente bloqueada pela falta dos receptores α_{2C} -AR. Esse aumento da OC e do TRAP indica um aumento do remodelamento ósseo. É bem sabido que o HT aumenta a formação e reabsorção ósseas, com predomínio da última, levando a uma perda importante de massa óssea (55, 114). A falta de responsividade da expressão de osteocalcina e de TRAP causada por excesso de T3 nos animais α_{2C} -AR^{-/-} sugere que a falta desse receptor bloqueia a indução da atividade osteoblástica e osteoclástica causada pela tirotoxicose, e, mais uma vez, corrobora com a hipótese de interação do HT-SNS para controle da fisiologia óssea via α_{2C} -AR.

Sumarizando, foi mostrado, no presente estudo, que a inativação global dos adrenoceptores α_{2C} em camundongos adultos jovens resulta em um fenótipo ósseo

heterogêneo, com diminuição da massa óssea no fêmur e aumento na vértebra. Apesar dessas diferenças, os animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ são resistentes aos efeitos da tireotoxicose nos dois sítios esqueléticos, reforçando a idéia de que o hormônio tireoidiano interage com o SNS para regulação da estrutura e fisiologia ósseas.

6.3 Caracterização da cultura de osteoclastos e a influência dos receptores $\alpha_{2C}\text{-AR}$ na osteoclastogênese e função osteoclástica

Os resultados *in vivo* obtidos no presente estudo, e discutidos acima, sugerem que os receptores α_{2C} -adrenérgicos podem afetar a massa óssea positivamente no fêmur e negativamente na coluna vertebral, e que o SNS atua de forma heterogênea em diferentes sítios do esqueleto.

Contudo, não fica claro se esses efeitos dos receptores $\alpha_{2C}\text{-AR}$ na massa óssea ocorrem localmente no tecido ósseo e/ou centralmente (via sistema nervoso central). Assim sendo, é importante avaliar a resposta de células ósseas ao tratamento com antagonistas e agonistas do $\alpha_{2C}\text{-AR}$. No presente estudo, analisamos o efeito de um agonista (UK 14,304) e de um antagonista (Yohimbina) do $\alpha_{2C}\text{-AR}$ em osteoclastos, com foco na diferenciação e função dessas células. Os osteoclastos têm origem mesenquimal e se diferenciam a partir da fusão de macrófagos existentes no sistema hematopoiético (115). O fator majoritário para que a diferenciação ocorra é o RANKL, um membro da super família dos fatores de necrose tumoral, que também é imprescindível para a função osteoclástica (116). Como outro macrófago qualquer, a presença do fator de crescimento M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) se faz imprescindível, tornando-se também essencial para a sobrevivência e diferenciação osteoclástica (117). Dessa forma, a diferenciação *in vitro* foi induzida com doses pré-estabelecidas de RANKL e M-CSF (118).

O primeiro passo foi determinar se os adrenoceptores α_2 são expressos em células pré-osteoclásticas e em osteoclastos maduros e em caso afirmativo, se os mesmos são ativos.

Após experimentos curva dose-resposta, foram definidas as doses das drogas a serem utilizadas. Esses experimentos também mostraram que os receptores α_{2C} são ativos em osteoclastos e que a respectiva ativação (através do agonista UK 14,304) ou bloqueio (através da Yohimbina), causou diminuição ou aumento da

diferenciação osteoclástica, sugerindo que não só os receptores são ativos, como eles também influenciam os processos ligados a diferenciação de macrófagos oriundos da medula óssea em osteoclastos, podendo, portanto, estarem relacionados com o controle do SNS no metabolismo ósseo. Esses resultados são contrários a achados prévios do nosso grupo (72), que mostrou aumento da diferenciação osteoclástica quando macrófagos são tratados com outro agonista α_2 , a clonidina. Essa diferença pode ser parcialmente explicada pelo fato da clonidina também ativar receptores da imidazolina-1, que medeia ações simpato-inibitórias (119). Porém, isso permanece para ser melhor avaliado.

Como dito anteriormente, o fator de transcrição mais importante para a osteoclastogênese é o NFATc1 (120). Portanto, nosso próximo passo foi investigar sua expressão gênica e protéica em pré osteoclastos e osteoclastos maduros. Como esperado, através de PCR e de “*western blotting*”, foi observada diminuição da expressão de NFATc1 em função do tratamento com UK 14,304. A Yohimbina, por sua vez, mostrou efeito oposto.

Esses resultados sugerem fortemente que os receptores α_2 adrenérgicos alteram a diferenciação osteoclástica via NFATc1, e para confirmar se essa é a única forma de ação desses adrenoceptores, foi feita a hiper expressão desse fator em macrófagos indiferenciados e a diferenciação foi induzida normalmente. Como esperado, as células infectadas com o “*empty vector*” apresentaram resultado semelhante das não infectadas. Porém, as células infectadas com o “*NFATc1 vector*” apresentou maior diferenciação, o que confirma a hipótese de que os receptores α_2 adrenérgicos agem via NFATc1. Entretanto, o resgate da diferenciação foi apenas parcial, o que indica que esse não é o único mecanismo de ação. Outro fator importante para a diferenciação dos osteoclastos, que por sua vez é ativado pela ligação do RANKL ao receptor RANK, é o c-Fos. Sabe-se que animais com KO dessa proteína desenvolvem fenótipo de osteopetrose severa (121). Sabe-se que sua ativação está diretamente ligada a ativação do NFATc1, sendo uma molécula “*upstream*” na via de sinalização. Contudo, tanto a expressão gênica, como a protéica dessa molécula permaneceram inalteradas com os tratamentos, sugerindo que possivelmente o controle da ativação do NFATc1 seja “*downstream*” c-Fos.

Outro mecanismo importante para a diferenciação e sobrevivência osteoclástica, que também ativa NFATc1, é a via das MAPKs, que além de regular a

expressão de genes indutores da osteoclastogênese, também é fundamental para evitar apoptose celular (122). A expressão da versão fosforilada, e, portanto, ativa, da ERK e do JNK foram negativamente reguladas pelo UK 14,304; entretanto, esse efeito foi curto, sendo perdido com o aumento do tempo de exposição das células à droga.

Dessa forma, conseguimos mostrar que o NFAc1 está sob controle dos receptores α_2 adrenérgicos e que isso aparentemente não ocorre via c-Fos. Por outro lado, os resultados sugerem que a via das MAPK, mesmo que em resposta aguda, controla de alguma forma a transcrição estimulada pelo NFAc1. Os mecanismos exatos, e como esse controle se dá, permanecem para serem melhor investigados. Também é bem sabido que algumas imunoglobulinas relacionadas com a diferenciação e atividade osteoclásticas são controladas pela sinalização do cálcio (123). Alguns experimentos foram feitos para tentar avaliar a liberação de cálcio em resposta ao agonista e antagonista α_2 adrenérgicos, porém os resultados foram pouco elucidativos. Dessa forma, faz-se necessário o uso de metodologias mais específicas e refinadas para a detecção do cálcio em célula isolada. Infelizmente, não tivemos tempo suficiente para esse tipo de experimento.

Outro fator que avaliamos foi a atividade osteoclástica de células tratadas com UK 14,304 ou Yohimbina. As proteínas que controlam a reabsorção óssea são diferentes daquelas que regulam a diferenciação osteoclástica. Dessa forma, muitas vezes vemos alterações na atividade mesmo tendo diferenciação normal, e vice-versa. Existem algumas metodologias possíveis para avaliação da atividade de osteoclastos. As mais usadas são a marcação dos anéis de actina e a coloração dos pontos de reabsorção.

Os resultados obtidos mostram que a atividade osteoclástica não é alterada, uma vez que menos osteoclastos vão reabsorver menos, e vice-versa. Porém, é possível que a normalização do número de pré-osteoclastos para re-plaqueamento traga informações mais conclusivas.

Assim, podemos concluir que os receptores α_2 adrenérgicos possivelmente controlam a diferenciação osteoclástica, sugerindo que há uma ação direta do SNS nas células ósseas.

7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Os dados obtidos no presente estudo mostram que a inativação global dos receptores adrenérgicos α_{2C} em camundongos adultos resulta em diminuição do comprimento femoral, diminuição de coxins adiposos e fenótipo ósseo heterogêneo, com diminuição da massa óssea femoral e aumento da massa óssea vertebral. Apesar dessas diferenças entre fêmur e vértebra, a falta desse receptor também resultou em uma importante resistência aos efeitos deletérios do excesso de hormônio tireoidiano na estrutura e resistência ósseas nos dois sítios esqueléticos.

Além disso, observou-se que os receptores α_2 -AR são expressos em células ósseas e possuem efeito direto em osteoclastos, uma vez que o tratamento com drogas agonistas e antagonistas α_2 adrenérgicas resulta em alteração importante na diferenciação e atividade osteoclástica.

8. CONCLUSÕES

Os achados do presente estudo mostram que as ações do SNS no esqueleto são complexas e sítio dependentes, e trazem novas evidências de que (i) o controle do metabolismo ósseo feito pelo SNS também ocorre via sinalização α_2 adrenérgica; que (ii) o HT interage com o SNS para controlar a massa e estrutura ósseas; e que (iii) essa interação depende da presença do α_{2C} -AR. Além disso, este estudo sugere que o controle do metabolismo ósseo feito pelo SNS também ocorre localmente no tecido ósseo, ou seja, de maneira direta em osteoclastos.

REFERÊNCIAS*

1. Tortora GJ. Princípios de Anatomia Humana. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. 1017p.
2. Ross MH RL, Kaye GI. Histologia Texto e Atlas. São Paulo: Panamericana; 1995. 652p.
3. Carneiro LC. Histologia Básica. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.358p.
4. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2009 Jul;20(5):230-6.
5. Lee DO, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, et al. Relationships between the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene G3174A polymorphism, serum IGF-I levels, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. J Bone Miner Metab. 2008;26(1):42-6.
6. Fattini De. Anatomia básica dos sistemas orgânicos. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2009.
7. Puzas J. The osteoclast. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 1993;15-21.
8. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. Calcif Tissue Int. 1981;33(5):509-12.
9. Kahn AJ, Simmons DJ, Krukowski M. Osteoclast precursor cells are present in the blood of preossification chick embryos. Dev Biol. 1981 May;84(1):230-4.
10. Bianco AC. Fisiologia do metabolismo osteomineral. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1999. 265p.
11. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. Rev Endocr Metab Disord. 2010 Dec;11(4):219-27.
12. Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature. 1999 Nov 11;402(6758):181-4.
13. Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. Metab Bone Dis Relat Res. 1984;5(5):243-52.

---

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul. 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

14. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997 May 30;89(5):755-64.
15. Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, et al. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006 Jun;7(1-2):1-16.
16. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):139-46.
17. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006 Mar 30;440(7084):692-6.
18. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25.
19. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):155-92.
20. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. 2000 Sep 29;103(1):41-50.
21. Yamashita T, Yao Z, Li F, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. *J Biol Chem*. 2007 Jun 22;282(25):18245-53.
22. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med*. 2005 Sep 5;202(5):589-95.
23. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol*. 2006 Feb;26(3):1002-13.
24. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*. 2006 Jul 15;107(2):289-98.
25. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1991-8.

26. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem*. 2005 Dec 16;280(50):41155-64.
27. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5050-5.
28. Guyton AC HJ. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro. Elsevier; 2006. 1115p.
29. Waung JA, Bassett JH, Williams GR. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Apr;23(4):155-62.
30. Nicholls JJ, Brassill MJ, Williams GR, Bassett JH. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol*. 2012 Jun;213(3):209-21.
31. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1091-6.
32. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2012 Sep 4;122(9):3035-43.
33. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1097-142.
34. Wagner M, Magagin S, Maia AL. The Role of Thyroid Hormone on Testicular Development and Function. *J Endocrinol*. 2008 Aug 26.
35. Galton VA. The roles of the iodothyronine deiodinases in mammalian development. *Thyroid*. 2005 Aug;15(8):823-34.
36. Bates JM, St Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology*. 1999 Feb;140(2):844-51.
37. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29(7):898-938.
38. Heuer H, Visser TJ. Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1078-83.
39. Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol*. 2011 Jan;25(1):1-14.
40. Stathatos N. Thyroid physiology. *Med Clin North Am*. 2012 Mar;96(2):165-73.

41. Abel E, Ahima R, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest*. 2001 Apr;107(8):1017-23.
42. O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY, et al. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 2003 Jul;17(7):1410-24.
43. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):789-99.
44. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010 Apr;31(2):139-70.
45. Davis PJ, Zhou M, Davis FB, Lansing L, Mousa SA, Lin HY. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. *Physiol Behav*. 2010 Feb 9;99(2):237-9.
46. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1990 Mar;19(1):35-63.
47. Bassett JH, Williams GR. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone*. 2008 Sep;43(3):418-26.
48. Rivkees SA, Bode HH, Crawford JD. Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. *N Engl J Med*. 1988 Mar 10;318(10):599-602.
49. Gouveia CH. The molecular and structural effects of thyroid hormone in bones. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Feb;48(1):183-95.
50. Ferrara AM, Onigata K, Ercan O, Woodhead H, Weiss RE, Refetoff S. Homozygous thyroid hormone receptor beta-gene mutations in resistance to thyroid hormone: three new cases and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Apr;97(4):1328-36.
51. Weiss RE, Refetoff S. Resistance to thyroid hormone. *Rev Endocr Metab Disord*. 2000 Jan;1(1-2):97-108.
52. Rodrigues Dare GL, Ribeiro Magalhaes PK, de Castro M, Zanini Maciel LM. Peripheral parameters of thyroid hormone action in resistance to thyroid hormone syndrome: a focus on mineral metabolism. *Thyroid*. 2009 Jul;19(7):785-7.
53. Allain TJ, Thomas MR, McGregor AM, Salisbury JR. A histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. *Bone*. 1995 May;16(5):505-9.
54. Mosekilde L, Melsen F, Christensen MS. Interrelationships between bone morphometry, thyroid function tests and serum parathyroid hormone in hyperthyroidism. *Calcif Tissue Res*. 1977 May;22 Suppl:229-35.

55. Mosekilde L, Melsen F, Bagger JP, Myhre-Jensen O, Schwartz Sorensen N. Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1977 Jul;85(3):515-25.
56. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and bone balance in hyperthyroidism. *Bone*. 1985;6(6):421-8.
57. Melsen F, Mosekilde L. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hyperthyroidism. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1977 Mar;85A(2):141-50.
58. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. *Bone*. 1986;7(2):101-8.
59. AB M. *Neuroanatomia Funcional*. 2 ed. Roi de Janeiro: Guanabara e Koogan; 1993. 363 p.
60. Civantos Calzada B, Aleixandre de Artinano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res*. 2001 Sep;44(3):195-208.
61. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1994 Jun;46(2):121-36.
62. Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Aug;283(2):R287-95.
63. Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V, Hein L. alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biol Cell*. 2004 Jun;96(5):343-8.
64. Rang. *Farmacologia*. Koogan G, editor. Rio de Janeiro 2001.
65. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
66. Ducky P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):197-207.
67. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. 1995/12/29 ed1995.
68. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 24;94(13):7001-5.

69. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):305-17.
70. Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):514-20.
71. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T, Hayase M, et al. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes*. 1999 Sep;48(9):1787-93.
72. Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *J Bone Miner Res*. 2011 Mar;26(3):591-603.
73. Miller RJ. Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:201-27.
74. Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, et al. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*. 1999 Jul;56(1):154-61.
75. Ruffolo RR, Jr., Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. Structure and function of alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1991 Dec;43(4):475-505.
76. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest*. 1991 Jan;87(1):125-32.
77. Pijl H, de Meijer PH, Langius J, Coenegracht CI, van den Berk AH, Chandie Shaw PK, et al. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;86(12):5848-53.
78. Rude RK, Oldham SB, Singer FR, Nicoloff JT. Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol. *N Engl J Med*. 1976 Feb 19;294(8):431-3.
79. Beylot M, Vincent M, Benzoni D, Bodson A, Riou JP, Mornex R. [Effects of propranolol and indomethacin upon urinary hydroxyproline in hyperthyroid patients (author's transl)]. *Nouv Presse Med*. 1982 Mar 20;11(13):989-91.
80. Fonseca TL. Interação do sistema nervoso simpático com hormônio tireoideano na regulação da massa e metabolismo ósseos. [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
81. Stansbie D, Brownsey RW, Crettaz M, Denton RM. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A

carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J.* 1976 Nov 15;160(2):413-6.

82. Feldman MR. Osteoporosis academic press. San Diego: EDS; 1996.
83. Hildebrand T, Ruegsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 1997;1(1):15-23.
84. Bucklen B. WM, Liebschner M. Mechanical Aspects of Tissue Engineering. *Tissue Repair, Regeneration and Engineering in Plastic Surgery.* 2005:261-70.
85. Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, Schreiber RD, Goeddel DV, Ross FP, et al. The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):771-81.
86. Willian. The Thyroid Gland. Pholadelphia E, editor. Philadelphia1989.
87. Rozanski A, Takano AP, Kato PN, Soares AG, Lellis-Santos C, Campos JC, et al. M-protein is down-regulated in cardiac hypertrophy driven by thyroid hormone in rats. *Mol Endocrinol.* 2013 Dec;27(12):2055-65.
88. Kondo A, Otsuka T, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, et al. AMP-activated protein kinase regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Int J Mol Med.* 2013 Jun;31(6):1457-62.
89. Knaus AE, Muthig V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R, et al. Alpha2-adrenoceptor subtypes--unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem Int.* 2007 Oct;51(5):277-81.
90. Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone.* 1999 Dec;25(6):623-9.
91. Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008 Apr-Jun;8(2):94-104.
92. Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS, Kobilka BK. Targeted inactivation of the gene encoding the mouse alpha 2c-adrenoceptor homolog. *Mol Pharmacol.* 1995 Jul;48(1):48-55.
93. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Zupan J, Komadina R, Prezelj J, Marc J. ADRA2A is involved in neuro-endocrine regulation of bone resorption. *J Cell Mol Med.* 2015 Mar 27.
94. Brede M, Wiesmann F, Jahns R, Hadamek K, Arnolt C, Neubauer S, et al. Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation.* 2002 Nov 5;106(19):2491-6.

95. Crabtree NJ, Kibirige MS, Fordham JN, Banks LM, Muntoni F, Chinn D, et al. The relationship between lean body mass and bone mineral content in paediatric health and disease. *Bone*. 2004 Oct;35(4):965-72.
96. Lafontan M, Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev*. 1995 Dec;16(6):716-38.
97. Gesta S, Hejnova J, Berlan M, Daviaud D, Crampes F, Stich V, et al. In vitro and in vivo impairment of alpha2-adrenergic receptor-dependent antilipolysis by fatty acids in human adipose tissue. *Horm Metab Res*. 2001 Dec;33(12):701-7.
98. Miranda-Rodrigues M. Avaliação da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático na regulação do crescimento ósseo via receptor Alfa 2C adrenérgico. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.
99. Fonseca TL, Teixeira MB, Rodrigues-Miranda M, Silva MV, Martins GM, Costa CC, et al. Thyroid hormone interacts with the sympathetic nervous system to modulate bone mass and structure in young adult mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Aug 15;307(4):E408-18.
100. Gilsbach R, Preissl S, Hein L. [alpha -Adrenoceptors: three subtypes for a broad spectrum of activity]. *Pharm Unserer Zeit*. 2011 Nov;40(6):462-8.
101. Bawa-Khalfe T, Altememi GF, Mandyam CD, Schwarz LA, Eikenburg DC, Standifer KM. The presence of beta2-adrenoceptors sensitizes alpha2A-adrenoceptors to desensitization after chronic epinephrine treatment. *BMC Pharmacol*. 2007;7:16.
102. Warren JT, Zou W, Decker CE, Rohatgi N, Nelson CA, Fremont DH, et al. Correlating RANK Ligand/RANK Binding Kinetics with Osteoclast Formation and Function. *J Cell Biochem*. 2015 Apr 10.
103. Kanbur NO, Derman O, Sen TA, Kinik E. Osteocalcin. A biochemical marker of bone turnover during puberty. *Int J Adolesc Med Health*. 2002 Jul-Sep;14(3):235-44.
104. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008 Apr;41(3):218-23.
105. Williams GR. Actions of thyroid hormones in bone. *Endokrynol Pol*. 2009 Sep-Oct;60(5):380-8.
106. Coindre JM, David JP, Riviere L, Goussot JF, Roger P, de Mascarel A, et al. Bone loss in hypothyroidism with hormone replacement. A histomorphometric study. *Arch Intern Med*. 1986 Jan;146(1):48-53.
107. Krane SM, Brownell GL, Stanbury JB, Corrigan H. The effect of thyroid disease on calcium metabolism in man. *J Clin Invest*. 1956 Aug;35(8):874-87.
108. Toh SH, Claunck BC, Brown PH. Effect of hyperthyroidism and its treatment on bone mineral content. *Arch Intern Med*. 1985 May;145(5):883-6.

109. Hu LW, Liberti EA, Barreto-Chaves ML. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats. *Virchows Arch.* 2005 Mar;446(3):265-9.
110. Sanford CF, Griffin EE, Wildenthal K. Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res.* 1978 Nov;43(5):688-94.
111. Siehl D, Chua BH, Lautensack-Belser N, Morgan HE. Faster protein and ribosome synthesis in thyroxine-induced hypertrophy of rat heart. *Am J Physiol.* 1985 Mar;248(3 Pt 1):C309-19.
112. Wojcicka A, Bassett JH, Williams GR. Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May 25.
113. Mitchell BD, Yerges-Armstrong LM. The genetics of bone loss: challenges and prospects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 May;96(5):1258-68.
114. Kragstrup J, Melsen F, Mosekilde L. Effects of thyroid hormone(s) on mean wall thickness of trabecular bone packets. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1981;3(3):181-5.
115. Novack DV, Teitelbaum SL. The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol.* 2008;3:457-84.
116. Novack DV, Faccio R. Osteoclast motility: putting the brakes on bone resorption. *Ageing Res Rev.* 2011 Jan;10(1):54-61.
117. Ross FP, Teitelbaum SL. α v β 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev.* 2005 Dec;208:88-105.
118. Novack DV. Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):169-82.
119. Wong ES, Man RY, Vanhoutte PM, Ng KF. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different α 2-adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Dec;335(3):659-64.
120. Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 May;42(5):576-9.
121. Huang H, Chang EJ, Ryu J, Lee ZH, Lee Y, Kim HH. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 8;351(1):99-105.
122. Tai TW, Su FC, Chen CY, Jou IM, Lin CF. Activation of p38 MAPK-regulated Bcl-xL signaling increases survival against zoledronic acid-induced apoptosis in osteoclast precursors. *Bone.* 2014 Oct;67:166-74.

123. Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1116:227-37.
124. Karsenty G, Wagner, EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002;2:389-406.
125. Mosekilde L, Melsen F. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1978 Jan;86(1):56-62.
126. Samuels HH, Stanley F, Casanova J. Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. *Endocrinology.* 1979 Jul;105(1):80-5.
127. Lu PW, Briody JN, Howman-Giles R, Trube A, Cowell CT. DXA for bone density measurement in small rats weighing 150-250 grams. *Bone.* 1994 Mar-Apr;15(2):199-202.
128. Fox KM, Kimura S, Plato CC, Kitagawa T. Bilateral asymmetry in bone weight at various skeletal sites of the rat. *Anat Rec.* 1995 Feb;241(2):284-7.
129. Bassett JHD, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrin Met.* 2003 Oct;14(8):356-64.
130. Garnero P, Vassy V, Bertholin A, Riou JP, Delmas PD. Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Apr;78(4):955-9.
131. Cray JJ, Jr., Khaksarfard K, Weinberg SM, Elsalanty M, Yu JC. Effects of thyroxine exposure on osteogenesis in mouse calvarial pre-osteoblasts. *PLoS One.* 2013;8(7):e69067.
132. Williams GR. Thyroid hormone actions in cartilage and bone. *Eur Thyroid J.* 2013 Mar;2(1):3-13.
133. Williams GR. Role of thyroid hormone receptor-alpha1 in endochondral ossification. *Endocrinology.* 2014 Aug;155(8):2747-50.
134. Elefteriou F, Campbell P, Ma Y. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcif Tissue Int.* 2014 Jan;94(1):140-51.
135. Kondo H, Nifuji A, Takeda S, Ezura Y, Rittling SR, Denhardt DT, et al. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *J Biol Chem.* 2005 Aug 26;280(34):30192-200.
136. Bjurholm A, Kreicbergs A, Terenius L, Goldstein M, Schultzberg M. Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *J Auton Nerv Syst.* 1988 Dec;25(2-3):119-25.

137. Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D, et al. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2007 Apr;22(4):578-88.
138. Bonnet N, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Collomp K, Benhamou CL, et al. Alteration of trabecular bone under chronic beta2 agonists treatment. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Sep;37(9):1493-501.
139. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest*. 1997 Feb 1;99(3):391-5.
140. Livak K. Sequence Detection System. 1997.
141. Senese R, Lasala P, Leanza C, de Lange P. New avenues for regulation of lipid metabolism by thyroid hormones and analogs. *Front Physiol*. 2014;5:475.
142. Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res*. 1997 Dec;12(12):2098-107.
143. Suwanwalaikorn S, Ongphiphadhanakul B, Braverman LE, Baran DT. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats. *Eur J Endocrinol*. 1996 May;134(5):655-9.
144. Scheibner J, Trendelenburg AU, Hein L, Starke K. Alpha2-adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in alpha2-adrenoceptor subtype-deficient mice. *Br J Pharmacol*. 2001 Feb;132(4):925-33.
145. Philbin KE, Bateman RJ, Mendelowitz D. Clonidine, an alpha2-receptor agonist, diminishes GABAergic neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Brain Res*. 2010 Aug 6;1347:65-70.
146. Bucheler MM, Hadamek K, Hein L. Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience*. 2002;109(4):819-26.
147. Gribble FM. Alpha2A-adrenergic receptors and type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):361-2.
148. Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res*. 2006 Nov;326(2):541-51.
149. Philipp M, Hein L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 2004 Jan;101(1):65-74.
150. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. 2002 Feb;23(1):38-89.

151. Trost Z, Trebse R, Prezelj J, Komadina R, Logar DB, Marc J. A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone*. 2010 Jan;46(1):72-80.
152. Beber EH, Capelo LP, Fonseca TL, Costa CC, Lotfi CF, Scanlan TS, et al. The thyroid hormone receptor (TR) beta-selective agonist GC-1 inhibits proliferation but induces differentiation and TR beta mRNA expression in mouse and rat osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*. 2009 Apr;84(4):324-33.

ANEXO**A – MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA PLoS ONE EM 30/07/2015****Lack of α_{2C} -adrenoceptor Results in Contrasting Phenotypes of Long Bones and Vertebra and Prevents the Thyrotoxicosis-induced Osteopenia**

Marilia B.C.G.Teixeira¹, Gisele M. Martins^{1,#a}, Manuela Miranda-Rodrigues¹, Iasmin Ferreira de Araujo¹, Ricardo Oliveira², Patrícia C. Brum³, Cecilia H. A. Gouveia^{*1}.

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil;

²RDODiagnosticosMedicos, Sao Paulo, Brazil

³Departament of Biodinamic of Human Body Moviment, School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

#a Current Address: Health Basic Department, Federal University of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author: cgouveia@usp.br (CHAG)

Abstract

A series of studies have demonstrated that activation of the sympathetic nervous system (SNS) causes osteopenia via β_2 -adrenoceptor (β_2 -AR) signaling. However, in a recent study, we found an unexpected and generalized phenotype of high bone mass in female mice with chronic sympathetic hyperactivity, due to double gene inactivation of adrenoceptors that negatively regulate norepinephrine release, α_{2A} - and α_{2C} -AR ($\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-}). These findings suggest that β_2 -AR is not the single adrenoceptor involved in bone turnover regulation and show that α_2 -AR signaling may also mediate the SNS actions in the skeleton. In addition, we found that $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} animals are resistant to the thyrotoxicosis-induced osteopenia, suggesting that thyroid hormone (TH) interacts with the SNS to control bone mass and structure, and that this interaction may also involve α_2 -AR signaling. To further investigate these hypotheses, in the present study, we have evaluated the bone phenotype of mice with the single gene inactivation of α_{2C} -AR, which mRNA expression was previously shown to be down regulated by triiodothyronine (T3). A cohort of 30 day-old female α_{2C} AR^{-/-} mice and their wild-type (WT) controls were treated with a supraphysiological dose of T3 for 30 or 90 days, which induced a thyrotoxic state in both mouse lineages. The micro-computed tomographic (μ CT) analysis showed that α_{2C} -AR^{-/-} mice present lower trabecular bone volume (BV/TV) and number (Tb.N), and increased trabecular separation (Tb.Sp) in the femur compared with WT mice; which was accompanied by decreased bone strength (determined by the three-point bending test) in the femur and tibia. The opposite was observed in the vertebra, where α_{2C} -AR^{-/-} mice show increased BV/TV, Tb.N and trabecular thickness (Tb.Th), and decreased Tb.Sp, compared with WT animals. In spite of the contrasting bone phenotypes of the femur and L5, thyrotoxicosis negatively regulated most of the micro architectural features of the trabecular bone in both skeletal sites of WT, but not of α_{2C} -AR^{-/-} mice. T3 treatment also decreased biomechanical properties (maximum load and ultimate load) in the femur and tibia of WT, but not of KO mice. The mRNA expression of osteocalcin, a marker of mature osteoblasts, and tartrate-resistant acid phosphatase, which is expressed by osteoclasts and is involved in collagen degradation, was increased by T3 treatment only in WT, and not in α_{2C} -AR^{-/-} mice. Altogether, these findings suggest that α_{2C} -AR mediates the effects of the SNS in the bone in a skeletal site-dependent manner, and support the hypothesis of a TH-SNS interaction, via α_{2C} adrenergic signaling, to modulate bone physiology and structure.

Introduction

The integrity of bone tissue is maintained by bone remodeling, a lifetime process that consists of the balanced actions of osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation (11). This process is under control of a number of cytokines and local factors, acting via paracrine and autocrine signaling (66, 124). Several systemic factors, including thyroid hormone (TH), also regulate bone remodeling. TH stimulates both bone formation and resorption by regulating the activity of osteoblasts and osteoclasts, respectively. In hypothyroidism, bone turnover is slowed and bone mass might be slightly increased (114, 125). In contrast, in hyperthyroidism, both bone formation and resorption are increased (57, 106), but the latter predominates (56), favoring resorption (57), negative calcium balance (107), and bone loss (108). The mechanisms through which TH regulates bone remodeling are not completely understood. It is known that TH can modulate bone metabolism indirectly, regulating the synthesis and/or secretion of other hormones and factors, such as growth hormone and IGF-I (126-128). A body of evidence also suggests that TH acts directly in bone cells, modifying their proliferation and differentiation and/or modulating the expression of several bone-related genes (88, 129, 130). It is generally accepted that most of T3 actions are mediated by its nuclear receptors, which were shown to be expressed in osteoblasts (131), osteoclasts (132), and chondrocytes (133).

Over the last 15 years, a series of studies has demonstrated that the sympathetic nervous system (SNS) also controls bone metabolism (134). Evidence shows that the SNS activation negatively regulates bone formation and positively regulates bone resorption, via β_2 -AR signaling, leading to bone loss (69, 91, 135). β_2 -AR mRNA expression was detected in osteoblastic and osteoclastic cells (69, 136), and β_2 -AR knockout mice (β_2 -AR^{-/-}), which do not present metabolic and endocrine abnormalities, present a generalized phenotype of high bone mass (HBM), with increased bone formation and decreased bone resorption (70). Accordingly, administration of propranolol, a β -blocker, and isoproterenol, a β -agonist, was demonstrated to increase and decrease bone mass, respectively, in adult animals (69, 137, 138).

On the other hand, later studies by our group have shown that female mice with chronic sympathetic hyperactivity, due to the double gene inactivation of adrenoceptors that negatively regulate norepinephrine release, α_{2A} -AR and α_{2C} -AR (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}), present an unexpected phenotype of HBM, with decreased bone resorption and increased bone formation (72). These findings suggest that β_2 -AR is not the single adrenoceptor involved in bone mass regulation and evoke that α_{2A} -AR and/or α_{2C} -AR signaling may also mediate the SNS actions in the skeleton.

Considering that TH interacts with the SNS to control several physiological processes, including thermogenesis, lipolysis, and glycogenolysis (76); and that treatment of hyperthyroid patients with propranolol corrects their hypercalcemia (78) and decreases their urinary excretion of hydroxyproline, a biochemical marker of bone resorption (79), we have raised the hypothesis that TH could also interact with the SNS to regulate bone metabolism. In fact, we have found that $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} animals are resistant to the thyrotoxicosis-induced osteopenia (99), which substantiates a TH-SNS interaction to control bone mass and suggests that this interaction depends on α_{2A} -AR and/or α_{2C} -AR signaling. To further investigate these hypotheses, we have evaluated the bone phenotype of mice with the single gene inactivation of α_{2C} adrenoceptor (α_{2C} -AR^{-/-}), which mRNA expression was previously shown to be modulated by TH (99).

In the present study, we show that α_{2C} -AR^{-/-} animals present critical skeletal alterations, with higher bone mass in the vertebra and lower bone mass in the femur, when compared with wild-type (WT) mice. In addition, these mice also showed to be resistant to the deleterious effects of thyrotoxicosis on bone microstructure and biomechanical properties, bringing new evidence that the regulation of bone remodeling by the SNS is extremely complex and that TH interacts with this system to control bone physiology and structure in a α_{2C} -AR-dependent manner.

Materials and Methods

Animal maintenance and manipulation

A cohort of 30-day old female congener α_{2C} -AR knockout mice in a C57BL6/J (B6) background and their wild-type (WT) controls were studied. The animals were considered young adults, since the pubertal maturation in B6 female mice begins

when serum estradiol increases by day 26 after birth and is complete when vaginal opening occurs by day 31 (139). The animals received an injection of T3 (Sigma-Aldrich, Germany), in a daily dose equivalent to 20 fold its physiological dose ($20 \times T3 = 7\text{g}/100\text{g body weight/day}$), per 30 or 90 days ($n = 8-10$ animals/group). T3 injections were administered intraperitoneally and at the same time each day. All animals were weighed once a week to monitor the changes in body mass over the experimental period and for adjusting the amount of hormone to be administered in order to maintain the supraphysiological dose of T3 ($20 \times T3$). All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Standing Committee on Animal Research of the University of São Paulo, which approved the study (Protocol n°. 35, page 85, book 02). At the end of the experimental period, the animals were euthanized, and the body length was measured from the tip of the snout to the base of the tail.

Heart mass

Immediately after the animals were euthanized, the heart was dissected out and weighed for wet-mass determination. The heart samples were dehydrated at 60°C for 48 hours and weighed again for dry-mass determination. All masses were expressed in milligrams per gram of body weight (BW).

Micro-Computed Tomography (μCT) analysis

The bone samples were scanned using a μCT unit (SkyScan 1172, SkyScan, Aartselaar, Belgium), where they were rotated through 360° at a rotation step of 0.7° . The X-ray settings were standardized to 100 kV for the baseline vertebral body and distal femur specimens, with an exposure time of 590 ms. A 0.05-mm-thick aluminum filter and a beam-hardening algorithm were used to minimize beam-hardening artifacts. The bone parameters were obtained with CtAn Version 1.5 (SkyScan). Total trabecular area of the fifth lumbar vertebra (L5) and the distal metaphysis of the femur were selected as the regions of interest (ROIs). The following 3D structural parameters of trabecular bone were determined: BV/TV (bone volume/tissue volume), Tb.Th (trabecular thickness), Tb.N (trabecular number), and TB.Sp (trabecular separation). The following morphometric variables of cortical bone were measured in 2D cross-sectional images of the vertebral body of L5 and in the diaphysis of the femur: T.Ar (Tissue area), B.Ar (Bone area), Medullary Area and Endosteal Perimeter.

Three-point bending test

The right femurs and tibias were tested in the same orientation in an Instron testing machine (Model 3344, Instron Corporation, MA, USA). For the femurs, the anterior cortex was placed in compression and the posterior cortex in tension during the test; for the tibias, the lateral right cortex was placed in compression and the lateral left cortex in tension during the test. A constant displacement rate of 5 mm/minute was applied until the bone fractured. Fracture was taken as complete loss of load carrying ability. To stabilize the specimen, a small preload (5% of the average maximal load) was applied before actual testing. During the bending test, load-displacement data were collected by a computerized data-acquisition system at a sampling rate of 80 Hz. The biomechanical properties evaluated were the maximum load [a measure of the maximum force that the bone withstood before fracture (N)], the ultimate load [the load at the fracture point (J)], Young's modulus (mPa), resilience [a measure of the ability of a bone to suffer elastic deformity (J)] and stiffness [a measure of the extrinsic rigidity of the bone tissue (N/mm)].

Gene expression by Real Time PCR

Expression of receptor activator of nuclear factor (RANK), RANK ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OC) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) were determined by real time PCR, as described previously (140) in the whole femur and vertebra L4 (fourth lumbar vertebra). The total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed using TURBO DNA-free kit (Ambion, Foster City, CA, USA). Syber Green Super Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) was used for the real-time PCR using the ABI Prism 7500 sequence detector. All primers used in this study: RANK_F: TCT GCA GCT CTT CCA TGA CAC T and R: CGA TGA GAC TGG GCA GGT AAG (NM_009399), RANK-L_F: GGC CAC AGC GCT TCT CAG and R: GAG TGA CTT TAT GGG AAC CCG AT (NM_011613.2), OPG_F: AGT CCG TGA AGC AGG AGT G and R: CCA TCT GGA CAT TTT TTG CAA A (NM_U94331), 18S_F: GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT and R: CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG (NM_11188), TRAP_F: F: TGC ACA GAT TGC ATA CTC TAA GAT CTC, R: TTT TGA AGC GCA AAC GGT AGT (NM_007388), OC_F: F:

CTC ACA GAT GCC AAG CCC A, *R*: CCA AGG TAG CGC CGG AGT CT (NM_U11542) were synthesized (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) specifically for real-time PCR using Primer Express software (Applied Biosystems). The amplification reaction was carried out for 40 cycles, with denaturation at 95°C for 5 seconds, and annealing/extension at 60°C for 31 seconds. Melt curve analysis was conducted after each run. The relative abundance of each target was calculated as $1,000 \times 2^{(C_t \text{ target gene} - C_t \text{ Gapdh})}$, in which C_t represents the threshold cycle for each transcript, and Cyclophilin or 18s is the reference.

Results

Induction of a thyrotoxic state in $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. We evaluate the effect of daily administration of 20 times the physiological dose of T3 ($20 \times T3 = 7 \mu\text{g} \times 100 \text{ g bw}^{-1} \times \text{day}^{-1}$) on bone of 30-day old female WT and $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice for 30 and 90 days. We first evaluated the induction of a thyrotoxic state by evaluating serum levels of TH, heart mass and body mass. Both 30- and 90-day-long T3 treatments increased by 8-fold the serum concentration of T3, and, as expected, decreased by half the T4 serum levels both in WT and KO mice (Fig 1A and B), which reflects TSH inhibition by negative feedback (29). Serum levels of T4 were not different between WT and KO mice (receiving saline or T3). On the other hand, by 120 days of age (90-day treatment group), saline- and T3-treated $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ animals (Fig 1B) presented important decrease on T4 levels (7- fold and 9-fold, respectively), compared with their WT controls (saline- and T3-treated mice), suggesting that the lack of $\alpha_{2C}\text{-AR}$ leads to a decline in the thyroid function, as the animals age. Corroborating previous studies that report cardiac hypertrophy in conditions of thyrotoxicosis (87), the 30-day and 90-day T3 treatments significantly increased heart mass in WT mice by 20% ($p < 0,001$), which is an indirect measure of cardiac hypertrophy. Surprisingly, the heart mass of KO mice was not affected by the thyrotoxic state (Fig 2). Body mass was quite similar between saline-treated WT and KO mice, but an unexpected result was also observed regarding to the effect of T3 on this parameter. As predicted, body mass decreased by 10-15%, as a consequence of the thyrotoxic state in WT mice (Fig 3B), which was clearly observed during the last 7 weeks of T3 treatment. In contrast, T3-treated $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice showed a 6-9% increase in body mass compared with untreated KO mice (Fig 3C). These latter results also suggest a participation of

α_{2C} -AR in the thyrotoxicosis-induced cardiac hypertrophy and body mass loss, two well known consequences of a chronic thyrotoxic condition (87, 141).

T3 effects on bone microarchitecture of WT and α_{2C} -AR^{-/-}

mice. Significant differences in trabecular bone microarchitecture were observed between WT and KO mice, whereas cortical bone showed to be quite similar between these two mice strains (Fig 4 and 5). The μ CT analysis of the distal metaphysis of the femur showed that the 30-day and 90-day saline-treated α_{2C} -AR^{-/-} mice (60-day and 120-day old animals, respectively) presented lower BV/TV (1,8-fold and 8-fold, respectively) and Tb.N (70% and 85%, respectively) than their WT controls (Fig 4 A,E,C,G), whereas Tb.Sp was increased by 95% in the 90-day saline-treated KO mice (Fig 4H). In contrast, the analysis of the lumbar vertebra (L5) showed the opposite (Fig 5A-H). The 30-day and 90-day saline-treated KO mice presented higher BV/TV (55 and 48%, respectively), Tb.Th (10 and 9%, respectively) and Tb.N (80 and 40%, respectively); and lower Tb.Sp (27 and 16%, respectively) than their WT controls. In spite of these site skeleton differences (low and high trabecular bone mass in the femur and vertebra of KO mice, respectively, compared with WT mice), α_{2C} -AR^{-/-} mice showed to be resistant to the deleterious effects of thyrotoxicosis on the trabecular bone of both femur and vertebra (Fig 4 A-H and Fig 5 A-H). In contrast and, as expected, in WT animals, T3 treatment negatively affected the trabecular μ CT parameters in both skeletal sites, but mainly in the femur, which is known to be more sensitive to the toxic effects of T3 (142, 143). 30- and 90-day T3-treatment decreased femoral BV/TV (5-fold and 6-fold, respectively) and Tb.N (3-fold and 5-fold, respectively), and increased femoral Tb.Sp (47 and 80%, respectively) in WT animals (Fig4 A,C,D,E,G,H). In the vertebra of WT animals, 30- and 90-day T3-treatment resulted in decreases in BV/TV (60 and 50%, respectively), Tb.Th (30 and 10%, respectively) and Tb.N (43 and 49%, respectively), and increased in Tb.Sp of 27% by 90-day long T3. As commented above, all these negative effects of T3, were not observed or were poorly noted in the femur and vertebra of KO mice. The thyrotoxic status also decreased some cortical parameters of the vertebra of WT mice, such as T.Ar (8-36%) and B.Ar (24-35%). Once again, KO mice showed to be resistant to these T3 effects (Fig 5).

TH effects on the bone biomechanical parameters of WT and α_{2C} -AR^{-/-} mice.

In agreement with the μ CT analysis that revealed lower BV/TV and Tb.N in the femur of α_{2C} -AR^{-/-} mice, the three-point bending test showed that maximum load and ultimate load, which are measures of bone strength, were significantly lower in the femur and tibia of KO mice, as compared with WT controls (Fig 6 A,B,D,E,G,H,J,K). Once again corroborating the μ CT findings, 30 or 90 days of T3 treatment significantly decreased femoral and tibial bone strength (maximum load and ultimate load) in WT animals, but not in KO mice (Fig 6 A,B,E,G,H,J,K), except for femoral maximum load that was also decreased by 90 days of T3-treatment in KO animals (Fig 6D). Resilience, which reflects the elasticity of a material, was decreased by T3 treatment (30- and 90-day long) in the tibia of WT mice, but not in the tibia or femur of α_{2C} -AR^{-/-} mice (Fig 6 I and L). Altogether, these data reinforce the bone resistance of KO mice to the negative effects of thyroid hormone excess.

TH effects on the gene expression of the RANKL-RANK-OPG system and on bone remodeling markers.

To further investigate the involvement of α_{2C} -AR in bone physiology and in the TH-SNS interaction to control bone remodeling, we evaluate the effect of T3 on the gene expression of the RANKL-RANK-OPG system. RANKL mRNA levels were higher in the femur (95%) and lower in the vertebra (56%) of 30-day saline-treated α_{2C} -AR^{-/-} mice (60-day old mice), as compared with WT controls (Fig 7A and K). These mRNA differences were not observed in 90-day saline-treated animals (120-day-old mice). We also observed that 30 days of T3 treatment increased RANK and RANKL mRNA expression (2.5- and 2.6-fold) and decreased OPG mRNA (50%) expression in the femur of WT mice, but not in the femur of KO mice (Fig 7 A-C). These effects were not observed when the T3 treatment was increased to 90 days (Fig 7 F-H). The single effect of this longer treatment was the decrease of OPG mRNA expression (Fig 7H), which was observed in the femur of both WT and KO animals (93% and 50%, respectively). The responses of the RANKL-RANK-OPG system to T3 treatment were quite different in the vertebra. RANKL was decreased in 40% by 30 days of T3 treatment and increased in 2.3-fold by 90 days of T3 treatment in WT animals, which was not observed in KO animals (Fig 7 K and P). RANK was not affected by any treatment (Fig 7 L and Q), whereas OPG mRNA expression was

increased (from 42% to 100%) by 30 and 90 days of T3 treatment both in WT and KO mice (Fig 7 M and R). We also evaluated the mRNA expression of the bone formation- and bone resorption-related genes, osteocalcin (OC) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), respectively. T3 treatment, 30- and 90-day long, increased OC mRNA expression both in the femur (2.6- and 1.2-fold, respectively) and vertebra (1.6- and 1.7-fold, respectively) of WT mice (Fig 7 D,I,N,S); this effect of T3 was not observed in the femur of α_{2C} -AR^{-/-} mice after 30 days of treatment (Fig 7D) and in the vertebra of KO mice after 90 days of treatment (Fig 7S), revealing certain KO resistance to the T3-induction of OC mRNA expression, a well known effect of T3 (88). TRAP mRNA expression was significantly increased (2- to 2.5-fold) by T3-treatment (30- or 90-day long), both in the femur and vertebra of WT animals, and this effect was cleared impaired by the lack of α_{2C} -AR (Fig 7 E, J, T).

Discussion

Considering that young adult mice with global double gene inactivation of α_{2A} -AR and α_{2C} -AR ($\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-}) present a phenotype of HBM (72) and are resistant to the osteopenic effects of thyrotoxicosis (99), we analyzed, in the present study, the bone phenotype of mice with the global single gene inactivation of α_{2C} -AR (α_{2C} -AR^{-/-} mice), and the skeletal responses of these animals to chronic conditions of thyroid hormone excess. There are three subtypes of α_2 adrenoceptors, α_{2A} -AR, α_{2B} -AR and α_{2C} -AR. All these receptors are expressed in the presynaptic membranes of adrenergic neurons, where they inhibit catecholamine release, acting, therefore, as autoreceptors (63). They are also expressed in non-adrenergic neurons of the peripheral and central nervous system (CNS), where they can act as heteroreceptors (63), inhibiting the release of many neurotransmitters, including serotonin (144), GABA (145) and dopamine (146). All α_2 receptor subtypes are also expressed in non-neuronal cells, where they have important roles, such as regulation of body temperature, intraocular pressure, lipolysis, insulin release, and pain perception (63, 147-149). All these receptors were also detected in mouse osteoblasts, osteócytes, osteoclasts and chondrocytes (72). In addition, α_{2A} -AR was recently detected in human osteoblasts and lining cells (93). We have previously shown that T3 treatment reduced α_{2C} -AR mRNA expression but not α_{2A} -AR mRNA expression in the bone of mice (99), further suggesting that it may be involved in the interaction between TH

and SNS to control bone physiology and structure. Similarly to $\alpha_{2A/2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice, $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ animals also present sympathetic over activity and show enhanced cardiac hypertrophy and heart failure in response to cardiac pressure overload (94). These single KO animals present increased circulating and urine levels of epinephrine, which is explained by the fact that $\alpha_{2C}\text{-AR}$ is the major negative feedback receptor of epinephrine release from chromaffin cells in the adrenal medulla (94).

In this study, young adult $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ and WT mice (30-day old) were treated with a supraphysiological daily dose of T3 for 30 or 90 days. Both T3 treatments efficiently induced a thyrotoxic state in both mouse lineages, since serum levels of T3 were increased (by 8-fold) and serum levels of T4 were decrease (by 50%). The latter reflects the inhibitory action of the exogenous T3 in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis, resulting in decreased synthesis and secretion of iodothyronines, including thyroxine (T4), which represents approximately 60% of the thyroid gland production in rodents(150). In WT mice, this thyrotoxic condition promoted expected effects (109-111), such as cardiac hypertrophy, body mass loss, bone structure deterioration, and reduction of bone resistance to biomechanical stress. In contrast, the responses of $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice were quite different. T3 treatment failed to induce cardiac hypertrophy; promoted an increase in body mass, instead of loss; and barely affected bone structure and strength; suggesting a participation of the SNS, via $\alpha_{2C}\text{-AR}$, in the deleterious effects of thyrotoxicosis in the heart, body mass and bone.

The bone phenotype of $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice showed to be different from that of $\alpha_{2A/2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. While the latter present a generalized phenotype of HBM (72), $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice present lower trabecular bone mass in the femur compared with WT mice, which was accompanied by decreased bone strength in the femur and tibia. The opposite was observed in the vertebra, where $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice show increased trabecular bone mass compared with WT animals, likewise $\alpha_{2A/2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. This heterogeneous bone phenotype presented by $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice reinforces the hypothesis that the SNS regulates bone structure and physiology, via $\alpha_{2C}\text{-AR}$ signaling, but also implies that this regulation occurs in a skeletal site-dependent way. It is important to consider that the lower bone mass observed in the femur of $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice may be the result of local activation of $\beta_2\text{-AR}$, since these animals present a hyperadrenergic state (94). An intriguing question is why it does not happen in the vertebra of $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice and in the whole skeleton $\alpha_{2A/2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. The fact that the double KO animals ($\alpha_{2A/2C}\text{-AR}^{-/-}$)

AR^{-/-}) present a generalized phenotype of HBM, regardless of the elevated sympathetic tone, suggests that α_{2A} -AR and/or α_{2C} -AR also mediate osteopenic actions of the SNS. Therefore, the lack of both receptors could result in anabolic effects that could overcome the negative effects of β_2 -AR activation in the bone (72). Following this reasoning, the comparison of α_{2C} -AR^{-/-} and $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} mice phenotypes suggests that the lack of only α_{2C} -AR is sufficient to surpass the osteopenic effects of β_2 -AR activation in the vertebra, while both α_{2A} -AR and α_{2C} -AR absences, or the single α_{2A} -AR absence, may be necessary to overcome the osteopenic effects of β_2 -AR activation in the femur. Another mechanism to be considered in the differential bone phenotypes of α_{2C} -AR^{-/-} and $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} animals is the adrenoceptor desensitization by the sustained exposure to the elevated serum levels of catecholamines. Desensitization refers to a declining receptor response, which generally includes receptor phosphorylation, internalization, and down-regulation(100). This effect occurs in all adrenoceptors, including α_2 - and β_2 -ARs. Interestingly, a series of studies show that α_2 - and β_2 -ARs are often co-localized (101), and that α_2 -AR desensitization is dependent on the β_2 -AR activation of G-coupled receptor kinases (GRK). This mechanism involves an important cross-talk between α_2 -AR and β_2 -AR(101), and it is possible that it may vary in a skeletal site dependent-way, which could explain the heterogenic bone phenotype of α_2 -AR^{-/-} mice.

It is clear that the mechanisms of α_2 -AR action in the bone are still unknown. The presence of α_2 adrenoceptor subtypes in mouse and human bone cells suggest direct actions of the SNS, via α_2 -AR signaling, in the skeleton. This hypothesis is supported by the responsiveness of in vitro mouse calvaria-derived osteoblasts and mouse bone marrow-derived osteoclasts to the selective α_2 -AR agonist clonidine and to the nonspecific α -AR antagonist phentolamine (72, 99). However, given the broad distribution of α_2 receptors in non-neuronal cells, and specially in the peripheral and CNS (as autoreceptors and heteroceptors), it is much more likely that α_2 -AR mechanisms of action involve both central and local pathways, which are important points to be investigated in future studies.

Further evidence for the involvement of α_2 -AR signaling in the neuro-endocrine regulation of bone remodeling was shown in humans. Mkalar et al, 2010 identified expression of α_{2A} -AR in osteoblasts and lining cells and showed associations of the

α_{2A} -AR gene locus with bone mineral density and with important bone remodeling markers, such as serum C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen, serum cathepsin K and plasma osteocalcin. In addition, α_{2A} -AR was shown to be upregulated in osteoblasts derived from osteoporotic patients relative to osteoblasts derived from non-osteoporotic patients (151).

In spite of the heterogeneous bone phenotype, low bone mass in the femur and high bone mass in the vertebra, α_{2C} -AR^{-/-} mice presented resistance to the thyrotoxicosis-induced bone deterioration in both skeletal sites, likewise $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} mice (99). As expected, thyrotoxicosis negatively regulated most of the micro architectural features of the trabecular bone of the distal metaphysis of the femur and vertebral body of L5 in WT, but not in α_{2C} -AR^{-/-} mice. In addition, the chronic T3 treatments (30- and 90-day long) decreased biomechanical properties (maximum load and ultimate load) in the femur and tibia of WT, but not of KO mice. These findings strongly support a TH-SNS interaction to control bone structure and physiology. In addition, they suggest that this mechanism occurs in an α_{2C} -AR signaling-dependent way. Once again, it is still unknown if the TH-SNS interaction occurs locally (in the skeleton) or at the CNS level. Previous in vitro studies with calvaria-derived osteoblasts, showed that the known negative effects of T3 on cell growth (131, 152) were completely absent or reversed in $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} cells. Additionally, the combination of T3 with clonidine had an additive effect on the inhibition of WT cell growth, whereas T3 attenuated the positive effect of clonidine on $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} cell growth. Altogether, these findings suggest that TH-SNS interaction involving α_2 -AR signaling may occur in osteoblasts to locally regulate bone physiology (99).

To further investigate the basis of the complex bone phenotype of α_{2C} -ARKO mice and their resistance to the T3-induced bone weakening, we evaluated the effect of T3 on gene expression of the RANKL-RANK-OPG system, which plays an essential role in the differentiation and activity of osteoclasts (102). RANKL is expressed by the osteoblasts and is the ligand of RANK, an osteoclast plasma membrane receptor. The RANKL-RANK interaction induces osteoclast formation, function, and survival (102). OPG is also expressed by the osteoblasts, and is the natural inhibitor of osteoclastic activity, since it binds RANKL and thereby impairs RANKL/RANK association. An interesting result was that RANKL mRNA levels were higher in the femur and lower in the vertebra of 60-day old α_{2C} -AR^{-/-} mice, as compared with WT

controls. This substantiates the lower and higher trabecular bone volume in the femur and vertebra of KO mice, respectively. These mRNA differences, however, were not observed in 120-day-old mice. We also observed that 30 days of T3 treatment increased RANK and RANKL mRNA expression and decreased OPG mRNA expression in the femur of WT mice, but not in the femur of KO mice, which may partially explain the lack of T3 effects in the bones of these animals. These effects, however, were no longer observed when T3 treatment was increased to 90 days. The responses of the RANKL-RANK-OPG system to T3 treatment were quite different in the vertebra and were fairly similar between WT and KO mice. These findings suggest that the RANKL-RANK-OPG system may mediate the effects of 30 days of T3-treatment only in the femur and that this system may need an intact α_{2C} -AR signaling to work properly. We also evaluated the mRNA expression of bone turnover-related genes, such as osteocalcin (OC), which is expressed by mature osteoblasts (103), and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), which is expressed by mature osteoclasts and is involved in bone resorption (104). As expected, the supraphysiological T3 treatment increased mRNA expression of OC in the femur and vertebra of WT mice, which is a known effect of TH (88). This effect, however, was much less evident in α_{2C} -AR^{-/-} mice. TRAP mRNA expression was also significantly increased by T3-treatment both in the femur and vertebra of WT animals, and this effect was cleared impaired by the lack of α_{2C} -AR as well. The increases in OC and TRAP mRNA expression reflect an increase in bone turnover. It is well known that thyroid hormone excess increases both bone formation and resorption, but the latter is favored leading to bone loss (55, 114). The unresponsiveness of OC and TRAP mRNA expression to T3 treatment in KO mice suggests that the lack of α_{2C} -AR considerably impairs the thyrotoxicosis-induced activation of both osteoblasts and osteoclasts and, once more, support a TH-SNS interaction to control bone physiology in a α_{2C} -AR-dependent manner.

In summary, we have shown that the global gene inactivation of α_{2C} -AR in young adult mice results in a heterogeneous bone phenotype, with decreased bone mass in the femur and increased bone mass in the vertebra. In spite of these differences, the global absence of α_{2C} -AR also results in resistance to the deleterious effects of thyrotoxicosis on bone structure and strength of both skeletal sites. Altogether, these results bring new evidence that (i) α_2 -AR signaling mediates sympathetic actions in

the skeleton; that (ii) TH interacts with the SNS to control bone mass and structure; and that (iii) this interaction is dependent on the presence of α_{2C} -AR signaling. In addition, the findings of the present study show that the SNS actions in the skeleton are more complex than initially proposed and that these actions may be dependent on the skeletal site.

Acknowledgments

We thank the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, for providing technical support to this study.

References

1. Tortora GJ. Princípios de Anatomia Humana. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
2. Ross MH RL, Kaye GI. Histologia Texto e Atlas. Panamericana, editor. São Paulo 1995.
3. Carneiro LCJeJ. Histologia Básica. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
4. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2009 Jul;20(5):230-6.
5. Lee DO, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, et al. Relationships between the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene G3174A polymorphism, serum IGF-I levels, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. J Bone Miner Metab. 2008;26(1):42-6.
6. Fattini De. Anatomia básica dos sistemas orgânicos. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2009.
7. Puzas J. The osteoclast. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 1993:15-21.
8. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. Calcif Tissue Int. 1981;33(5):509-12.
9. Kahn AJ, Simmons DJ, Krukowski M. Osteoclast precursor cells are present in the blood of preossification chick embryos. Dev Biol. 1981 May;84(1):230-4.
10. Bianco AC. Fisiologia do metabolismo osteomineral. 2 ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro 1999.
11. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. Rev Endocr Metab Disord. 2010 Dec;11(4):219-27.
12. Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature. 1999 Nov 11;402(6758):181-4.
13. Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic

- model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1984;5(5):243-52.
14. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997 May 30;89(5):755-64.
  15. Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, et al. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006 Jun;7(1-2):1-16.
  16. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):139-46.
  17. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. 2006 Mar 30;440(7084):692-6.
  18. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25.
  19. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):155-92.
  20. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. 2000 Sep 29;103(1):41-50.
  21. Yamashita T, Yao Z, Li F, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, et al. NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. *J Biol Chem*. 2007 Jun 22;282(25):18245-53.
  22. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med*. 2005 Sep 5;202(5):589-95.
  23. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol*. 2006 Feb;26(3):1002-13.
  24. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*. 2006 Jul 15;107(2):289-98.
  25. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1991-8.
  26. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem*. 2005 Dec 16;280(50):41155-64.
  27. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001 Dec;142(12):5050-5.
  28. Guyton AC HJ. *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier E, editor. Rio de Janeiro 2006.
  29. Waung JA, Bassett JH, Williams GR. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Apr;23(4):155-62.

30. Nicholls JJ, Brassill MJ, Williams GR, Bassett JH. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol*. 2012 Jun;213(3):209-21.
31. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1091-6.
32. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2012 Sep 4;122(9):3035-43.
33. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1097-142.
34. Wagner M, Magagin S, Maia AL. The Role of Thyroid Hormone on Testicular Development and Function. *J Endocrinol*. 2008 Aug 26.
35. Galton VA. The roles of the iodothyronine deiodinases in mammalian development. *Thyroid*. 2005 Aug;15(8):823-34.
36. Bates JM, St Germain DL, Galton VA. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology*. 1999 Feb;140(2):844-51.
37. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, et al. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29(7):898-938.
38. Heuer H, Visser TJ. Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1078-83.
39. Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol*. 2011 Jan;25(1):1-14.
40. Stathatos N. Thyroid physiology. *Med Clin North Am*. 2012 Mar;96(2):165-73.
41. Abel E, Ahima R, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest*. 2001 Apr;107(8):1017-23.
42. O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY, et al. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 2003 Jul;17(7):1410-24.
43. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):789-99.
44. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010 Apr;31(2):139-70.
45. Davis PJ, Zhou M, Davis FB, Lansing L, Mousa SA, Lin HY. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. *Physiol Behav*. 2010 Feb 9;99(2):237-9.
46. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1990 Mar;19(1):35-63.
47. Bassett JH, Williams GR. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone*. 2008 Sep;43(3):418-26.
48. Rivkees SA, Bode HH, Crawford JD. Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. *N Engl J Med*. 1988 Mar 10;318(10):599-602.
49. Gouveia CH. [The molecular and structural effects of thyroid hormone in bones]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Feb;48(1):183-95.
50. Ferrara AM, Onigata K, Ercan O, Woodhead H, Weiss RE, Refetoff S. Homozygous thyroid hormone receptor beta-gene mutations in resistance to thyroid

hormone: three new cases and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Apr;97(4):1328-36.

51. Weiss RE, Refetoff S. Resistance to thyroid hormone. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000 Jan;1(1-2):97-108.

52. Rodrigues Dare GL, Ribeiro Magalhaes PK, de Castro M, Zanini Maciel LM. Peripheral parameters of thyroid hormone action in resistance to thyroid hormone syndrome: a focus on mineral metabolism. *Thyroid.* 2009 Jul;19(7):785-7.

53. Allain TJ, Thomas MR, McGregor AM, Salisbury JR. A histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. *Bone.* 1995 May;16(5):505-9.

54. Mosekilde L, Melsen F, Christensen MS. Interrelationships between bone morphometry, thyroid function tests and serum parathyroid hormone in hyperthyroidism. *Calcif Tissue Res.* 1977 May;22 Suppl:229-35.

55. Mosekilde L, Melsen F, Bagger JP, Myhre-Jensen O, Schwartz Sorensen N. Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1977 Jul;85(3):515-25.

56. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and bone balance in hyperthyroidism. *Bone.* 1985;6(6):421-8.

57. Melsen F, Mosekilde L. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hyperthyroidism. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1977 Mar;85A(2):141-50.

58. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. *Bone.* 1986;7(2):101-8.

59. AB M. *Neuroanatomia Funcional.* 2 ed. Roi de Janeiro: Guanabara e Koogan; 1993.

60. Civantos Calzada B, Aleixandre de Artinano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res.* 2001 Sep;44(3):195-208.

61. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994 Jun;46(2):121-36.

62. Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Aug;283(2):R287-95.

63. Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V, Hein L. alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biol Cell.* 2004 Jun;96(5):343-8.

64. Rang. *Farmacologia.* Koogan G, editor. Rio de Janeiro 2001.

65. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998 Oct 22;395(6704):763-70.

66. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000 Jan 21;100(2):197-207.

67. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. 1995/12/29 ed1995.

68. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):7001-5.

69. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002 Nov 1;111(3):305-17.

70. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):514-20.
71. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T, Hayase M, et al. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes*. 1999 Sep;48(9):1787-93.
72. Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *J Bone Miner Res*. 2011 Mar;26(3):591-603.
73. Miller RJ. Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:201-27.
74. Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, et al. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*. 1999 Jul;56(1):154-61.
75. Ruffolo RR, Jr., Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. Structure and function of alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1991 Dec;43(4):475-505.
76. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest*. 1991 Jan;87(1):125-32.
77. Pijl H, de Meijer PH, Langius J, Coenegracht CI, van den Berk AH, Chandie Shaw PK, et al. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Dec;86(12):5848-53.
78. Rude RK, Oldham SB, Singer FR, Nicoloff JT. Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol. *N Engl J Med*. 1976 Feb 19;294(8):431-3.
79. Beylot M, Vincent M, Benzoni D, Bodson A, Riou JP, Mornex R. [Effects of propranolol and indomethacin upon urinary hydroxyproline in hyperthyroid patients (author's transl)]. *Nouv Presse Med*. 1982 Mar 20;11(13):989-91.
80. Fonseca TL. Interação do sistema nervoso simpático com hormônio tireoideano na regulação da massa e metabolismo ósseos. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
81. Stansbie D, Brownsey RW, Crettaz M, Denton RM. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J*. 1976 Nov 15;160(2):413-6.
82. Feldman MR. Osteoporosis academic press. San Diego: EDS; 1996.
83. Hildebrand T, Rueggsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. 1997;1(1):15-23.
84. Bucklen B. WM, Liebschner M. Mechanical Aspects of Tissue Engineering. *Tissue Repair, Regeneration and Engineering in Plastic Surgery*. 2005:261-70.
85. Novack DV, Yin L, Hagen-Stapleton A, Schreiber RD, Goeddel DV, Ross FP, et al. The IkappaB function of NF-kappaB2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J Exp Med*. 2003 Sep 1;198(5):771-81.
86. Willian. The Thyroid Gland. Philadelphia E, editor. Philadelphia 1989.
87. Rozanski A, Takano AP, Kato PN, Soares AG, Lellis-Santos C, Campos JC, et al. M-protein is down-regulated in cardiac hypertrophy driven by thyroid hormone in rats. *Mol Endocrinol*. 2013 Dec;27(12):2055-65.

88. Kondo A, Otsuka T, Kato K, Matsushima-Nishiwaki R, Kuroyanagi G, Mizutani J, et al. AMP-activated protein kinase regulates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Int J Mol Med*. 2013 Jun;31(6):1457-62.
89. Knaus AE, Muthig V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R, et al. Alpha2-adrenoceptor subtypes--unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem Int*. 2007 Oct;51(5):277-81.
90. Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone*. 1999 Dec;25(6):623-9.
91. Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008 Apr-Jun;8(2):94-104.
92. Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS, Kobilka BK. Targeted inactivation of the gene encoding the mouse alpha 2c-adrenoceptor homolog. *Mol Pharmacol*. 1995 Jul;48(1):48-55.
93. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Zupan J, Komadina R, Prezelj J, Marc J. ADRA2A is involved in neuro-endocrine regulation of bone resorption. *J Cell Mol Med*. 2015 Mar 27.
94. Brede M, Wiesmann F, Jahns R, Hadamek K, Arnolt C, Neubauer S, et al. Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation*. 2002 Nov 5;106(19):2491-6.
95. Crabtree NJ, Kibirige MS, Fordham JN, Banks LM, Muntoni F, Chinn D, et al. The relationship between lean body mass and bone mineral content in paediatric health and disease. *Bone*. 2004 Oct;35(4):965-72.
96. Lafontan M, Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev*. 1995 Dec;16(6):716-38.
97. Gesta S, Hejnova J, Berlan M, Daviaud D, Crampes F, Stich V, et al. In vitro and in vivo impairment of alpha2-adrenergic receptor-dependent antilipolysis by fatty acids in human adipose tissue. *Horm Metab Res*. 2001 Dec;33(12):701-7.
98. Miranda-Rodrigues M. Avaliação da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático na regulação do crescimento ósseo via receptor Alfa 2C adrenérgico. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014.
99. Fonseca TL, Teixeira MB, Rodrigues-Miranda M, Silva MV, Martins GM, Costa CC, et al. Thyroid hormone interacts with the sympathetic nervous system to modulate bone mass and structure in young adult mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Aug 15;307(4):E408-18.
100. Gilsbach R, Preissl S, Hein L. [alpha -Adrenoceptors: three subtypes for a broad spectrum of activity]. *Pharm Unserer Zeit*. 2011 Nov;40(6):462-8.
101. Bawa-Khalfe T, Altememi GF, Mandyam CD, Schwarz LA, Eikenburg DC, Standifer KM. The presence of beta2-adrenoceptors sensitizes alpha2A-adrenoceptors to desensitization after chronic epinephrine treatment. *BMC Pharmacol*. 2007;7:16.
102. Warren JT, Zou W, Decker CE, Rohatgi N, Nelson CA, Fremont DH, et al. Correlating RANK Ligand/RANK Binding Kinetics with Osteoclast Formation and Function. *J Cell Biochem*. 2015 Apr 10.
103. Kanbur NO, Derman O, Sen TA, Kinik E. Osteocalcin. A biochemical marker of bone turnover during puberty. *Int J Adolesc Med Health*. 2002 Jul-Sep;14(3):235-44.
104. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008 Apr;41(3):218-23.

105. Williams GR. Actions of thyroid hormones in bone. *Endokrynol Pol.* 2009 Sep-Oct;60(5):380-8.
106. Coindre JM, David JP, Riviere L, Gousset JF, Roger P, de Mascarel A, et al. Bone loss in hypothyroidism with hormone replacement. A histomorphometric study. *Arch Intern Med.* 1986 Jan;146(1):48-53.
107. Krane SM, Brownell GL, Stanbury JB, Corrigan H. The effect of thyroid disease on calcium metabolism in man. *J Clin Invest.* 1956 Aug;35(8):874-87.
108. Toh SH, Claunch BC, Brown PH. Effect of hyperthyroidism and its treatment on bone mineral content. *Arch Intern Med.* 1985 May;145(5):883-6.
109. Hu LW, Liberti EA, Barreto-Chaves ML. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats. *Virchows Arch.* 2005 Mar;446(3):265-9.
110. Sanford CF, Griffin EE, Wildenthal K. Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res.* 1978 Nov;43(5):688-94.
111. Siehl D, Chua BH, Lautensack-Belser N, Morgan HE. Faster protein and ribosome synthesis in thyroxine-induced hypertrophy of rat heart. *Am J Physiol.* 1985 Mar;248(3 Pt 1):C309-19.
112. Wojcicka A, Bassett JH, Williams GR. Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May 25.
113. Mitchell BD, Yerges-Armstrong LM. The genetics of bone loss: challenges and prospects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 May;96(5):1258-68.
114. Kragstrup J, Melsen F, Mosekilde L. Effects of thyroid hormone(s) on mean wall thickness of trabecular bone packets. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1981;3(3):181-5.
115. Novack DV, Teitelbaum SL. The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol.* 2008;3:457-84.
116. Novack DV, Faccio R. Osteoclast motility: putting the brakes on bone resorption. *Ageing Res Rev.* 2011 Jan;10(1):54-61.
117. Ross FP, Teitelbaum SL. α and β and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev.* 2005 Dec;208:88-105.
118. Novack DV. Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell Res.* 2011 Jan;21(1):169-82.
119. Wong ES, Man RY, Vanhoutte PM, Ng KF. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different α_2 -adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Dec;335(3):659-64.
120. Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. NFATc1: functions in osteoclasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 May;42(5):576-9.
121. Huang H, Chang EJ, Ryu J, Lee ZH, Lee Y, Kim HH. Induction of c-Fos and NFATc1 during RANKL-stimulated osteoclast differentiation is mediated by the p38 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 8;351(1):99-105.
122. Tai TW, Su FC, Chen CY, Jou IM, Lin CF. Activation of p38 MAPK-regulated Bcl-xL signaling increases survival against zoledronic acid-induced apoptosis in osteoclast precursors. *Bone.* 2014 Oct;67:166-74.
123. Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Nov;1116:227-37.
124. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002;2:389-406.

125. Mosekilde L, Melsen F. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1978 Jan;86(1):56-62.
126. Samuels HH, Stanley F, Casanova J. Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. *Endocrinology*. 1979 Jul;105(1):80-5.
127. Lu PW, Briody JN, Howman-Giles R, Trube A, Cowell CT. DXA for bone density measurement in small rats weighing 150-250 grams. *Bone*. 1994 Mar-Apr;15(2):199-202.
128. Fox KM, Kimura S, Plato CC, Kitagawa T. Bilateral asymmetry in bone weight at various skeletal sites of the rat. *Anat Rec*. 1995 Feb;241(2):284-7.
129. Bassett JHD, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrin Met*. 2003 Oct;14(8):356-64.
130. Garnero P, Vassy V, Bertholin A, Riou JP, Delmas PD. Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Apr;78(4):955-9.
131. Cray JJ, Jr., Khaksarfard K, Weinberg SM, Elsalanty M, Yu JC. Effects of thyroxine exposure on osteogenesis in mouse calvarial pre-osteoblasts. *PLoS One*. 2013;8(7):e69067.
132. Williams GR. Thyroid hormone actions in cartilage and bone. *Eur Thyroid J*. 2013 Mar;2(1):3-13.
133. Williams GR. Role of thyroid hormone receptor-alpha1 in endochondral ossification. *Endocrinology*. 2014 Aug;155(8):2747-50.
134. Eleftheriou F, Campbell P, Ma Y. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. *Calcif Tissue Int*. 2014 Jan;94(1):140-51.
135. Kondo H, Nifuji A, Takeda S, Ezura Y, Rittling SR, Denhardt DT, et al. Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30192-200.
136. Bjurholm A, Kreicbergs A, Terenius L, Goldstein M, Schultzberg M. Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *J Auton Nerv Syst*. 1988 Dec;25(2-3):119-25.
137. Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D, et al. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*. 2007 Apr;22(4):578-88.
138. Bonnet N, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Collomp K, Benhamou CL, et al. Alteration of trabecular bone under chronic beta2 agonists treatment. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Sep;37(9):1493-501.
139. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest*. 1997 Feb 1;99(3):391-5.
140. Livak K. Sequence Detection System. 1997.
141. Senese R, Lasala P, Leanza C, de Lange P. New avenues for regulation of lipid metabolism by thyroid hormones and analogs. *Front Physiol*. 2014;5:475.
142. Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res*. 1997 Dec;12(12):2098-107.
143. Suwanwalaikorn S, Ongphiphadhanakul B, Braverman LE, Baran DT. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats. *Eur J Endocrinol*. 1996 May;134(5):655-9.

144. Scheibner J, Trendelenburg AU, Hein L, Starke K. Alpha2-adrenoceptors modulating neuronal serotonin release: a study in alpha2-adrenoceptor subtype-deficient mice. *Br J Pharmacol*. 2001 Feb;132(4):925-33.
145. Philbin KE, Bateman RJ, Mendelowitz D. Clonidine, an alpha2-receptor agonist, diminishes GABAergic neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Brain Res*. 2010 Aug 6;1347:65-70.
146. Bucheler MM, Hadamek K, Hein L. Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience*. 2002;109(4):819-26.
147. Gribble FM. Alpha2A-adrenergic receptors and type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):361-2.
148. Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res*. 2006 Nov;326(2):541-51.
149. Philipp M, Hein L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 2004 Jan;101(1):65-74.
150. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. 2002 Feb;23(1):38-89.
151. Trost Z, Trebse R, Prezelj J, Komadina R, Logar DB, Marc J. A microarray based identification of osteoporosis-related genes in primary culture of human osteoblasts. *Bone*. 2010 Jan;46(1):72-80.
152. Beber EH, Capelo LP, Fonseca TL, Costa CC, Lotfi CF, Scanlan TS, et al. The thyroid hormone receptor (TR) beta-selective agonist GC-1 inhibits proliferation but induces differentiation and TR beta mRNA expression in mouse and rat osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*. 2009 Apr;84(4):324-33.

Figures

Fig. 1

Fig. 1. T3 and T4 serum levels in WT and $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. (A) Serum levels of T3. (B) Serum levels of T4. Animals were treated with saline or a supraphysiological dose of T3 ($7 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g body wt}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). Significance between groups was determined by two-way ANOVA followed by Tukey's test. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n = 8\text{-}10/\text{group}$). * $P < 0.05$, versus the respective saline-treated animals (WT vs. WT+T3, KO vs. KO+T3).

Fig. 2

Fig. 2. Effect of T3-treatment on heart mass of WT and $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. 30d and 90d, refer, respectively, to 30 and 90 days of treatment with saline or a supraphysiological dose of T3 ($7 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g body wt}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). Significance between groups was determined by two-way ANOVA followed by Tukey's test. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n=10-12$ per group). *** $P < 0.001$ versus the respective saline-treated animals (WT vs. WT+T3, WT KO vs. KO+T3).

Fig. 3

Fig. 3. Body mass of WT and $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. (A) WT versus $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. (B) WT versus WT+T3. (C) $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ versus $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ +T3. Animals were treated with saline or a supraphysiological dose of T3 ($7 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g body wt}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). The significance between all groups, presented in figures A, B and C, was determined in a single test by two-way ANOVA, followed by Tukey's test. The groups were separated in figures A, B and C to more clearly show the differences between groups. Values represent the mean $\pm$ SEM ($n=10-12$ per group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, versus the respective saline-treated animals (WT vs. WT+T3, KO vs. KO+T3), + $P < 0.05$ (WT vs. KO).

Fig. 4

Fig. 4. Effect of T3-treatment on the structural parameters of the trabecular and cortical bone of the distal metaphysis of the femur in WT and α_{2C} -AR^{-/-} mice assessed by μ CT. (A–D) Effect of 30-day treatment on trabecular parameters. (E–H) Effect of 90-day treatment on trabecular parameters. (I–L) Effect of 30-day treatment on cortical parameters. (M–P) Effect of 90-day treatment on cortical parameters. Animals were treated with saline or a supraphysiological dose of T3 (7 μ g/100 g body wt⁻¹·day⁻¹). Significance between groups was determined by two-way ANOVA followed by Tukey's test. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n = 10$ –12 per group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. the respective saline-treated animals (WT vs. WT+T3, KO vs. KO+T3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ for differences between WT and KO mice, as indicated. BV/TV, trabecular bone volume; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular speculation; T.Ar, total area; B.Ar, bone area.

Fig. 5

Fig. 5. Effect of T3-treatment on the structural parameters of the trabecular and cortical bone of the vertebral body of L5 in WT and α_{2C} -AR^{-/-} mice assessed by μ CT. (A–D) Effect of 30-day treatment on trabecular parameters. (E–H) Effect of 90-day treatment on trabecular parameters. (I–L) Effect of 30-day treatment on cortical parameters. (M–P) Effect of 90-day treatment on cortical parameters. Animals were treated with saline or a supraphysiological dose of T3 ($7 \mu\text{g} \cdot 100 \text{g body wt}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). Significance between groups was determined by two-way ANOVA followed by Tukey's test. Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n = 10$ – 12 per group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. the respective saline-treated animals (WT vs. WT+T3, KO vs. KO+T3). + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ for differences between WT and KO mice, as indicated. BV/TV, trabecular bone volume; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular speculation; T.Ar, tissue area; B.Ar, bone area.

Fig. 6

Fig. 6. Effect of T3-treatment on the biomechanical parameters of the femur and tibia in WT mice and $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ mice. Data were assessed by means of the 3-point bending test. Animals were treated with saline or a supraphysiological dose of T3 ($7 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g body wt}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). Values are expressed as means $\pm$ SEM ($n = 10\text{-}12$ per group). Significance between groups was determined by two-way ANOVA followed by Tukey's test. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ vs. the respective saline-treated animals (WT vs. WT+T3, KO vs. KO+T3). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ for differences between WT and KO mice, as indicated.

Fig. 7

Fig. 7. Effect of T3-treatment on the relative mRNA expression of bone metabolism-related genes. (A-J) Genes expressed in the femur. (K-T) Genes expressed in the vertebra. (A-E and K-L) Effect of 30-day treatment. (F-J and P-T) Effect of 90-day treatment. Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK), RANK ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), osteocalcin (OC) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). mRNA expression was determined by real-time PCR analysis. Animals were treated with saline or a supraphysiological dose of T3 ($7 \mu\text{g} \cdot 100 \text{ g body wt}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) for 30 or 90 days. Values are expressed as means $\pm$ EPM ($n = 4$ to $52/\text{group}$). Significance between groups was determined by two-way ANOVA followed by Tukey's test. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. the respective saline-treated animals (WT vs. WT+T3, KO vs. KO+T3), + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ and +++ $P < 0.001$ for differences between WT and KO mice, as indicated.