Marcos Vinicius da Silva

Avaliação da Interação do Hormônio Tiroideano com o
Sistema Nervoso Simpático, via Receptor α_{2A}
Adrenérgico, na Regulação da Maturação e
Crescimento Ósseos

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

São Paulo
2016

Marcos Vinicius da Silva

Avaliação da Interação do Hormônio Tiroideano com o
Sistema Nervoso Simpático, via Receptor α_{2A}
Adrenérgico, na Regulação do Crescimento e
Maturação Ósseos

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: Anatomia Humana

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

Versão original

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Marcos Vinícius da.

Avaliação da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático, via receptor alfa 2A adrenérgico, na regulação da maturação e crescimento ósseos / Marcos Vinícius da Silva. – São Paulo, 2016.

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: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Estudo do papel do hormônio tireoideano e do sistema nervoso simpático na regulação do desenvolvimento e Metabolismo ósseo.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the interaction of hormone thyroid with the sympathetic nervous system pathway receptor alpha 2A adrenergic the regulation of maturation and bone growth.

1. Hormônio tireoideano 2. Crescimento ósseo 3. Receptor adrenérgico 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/SB/IBQ49/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcos Vinicius da Silva.

Título da Tese: Avaliação da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático, via receptor alfa 2A adrenérgico, na regulação da maturação e crescimento ósseos.

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

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 Alfa2"

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

Ilma.Sra.

Profa. Dra. CECÍLIA HELENA DE AZEVEDO G. FERREIRA
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Aos meus pais, avós (in memória)
Tia Augusta, irmãos e Amigos.*

Agradecimentos

“A percepção do desconhecido é mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada .”

Albert Einstein.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco; à medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”

Goethe

“Feliz Aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

Esses grandes pensamentos retratam o que penso e pretendo fazer com o mínimo de conhecimento que adquiri na pós-graduação.

“Agradeço a Deus por sua onipresença e onisciência na minha vida. Sempre me transmitindo força para vencer obstáculos que apareceram nessa minha jornada de pós-Graduação”

Agradecimentos aos meus Familiares:

Reconheço o primor de meus Familiares que estiveram unidos comigo. Sempre em ligações e visitas. Vale ressaltar meus Pais Adeildes Barboza da Silva e Luiz Augusto de Silva. Passamos juntos talvez a pior fase da nossa vida, foram três anos, dentre eles quatro meses de desesperos, lutando pela vida de meu Pai Luiz Augusto da Silva. Quero deixar aqui minha admiração pela grande mulher, mostrou sempre que cada lágrima deve ser enxugada com um sorriso, seu exemplo de amor e de respeito levarei comigo para sempre. Para meu pai, deixo meu respeito de luta pela vida e capacidade incrível de recuperação. Juntos na morbidade nos aproximamos e tivemos oportunidade de nos conhecer mais, aumentamos nosso amor e conseguimos vencer.

Deixo meu agradecimento a minha Tia-mãe, Maria Augusta Feitosa- quero aqui dizer que sou feliz por ter sido acolhido por você sempre, aqui meu respeito e meu grande amor pela dedicação que teve sempre, apoiando nas minhas decisões e por sempre pensar o melhor para mim.

Minha gratidão também ao meu irmão Fabiano Barbosa da Silva que sempre esteve de prontidão a me ajudar com as adversidades da minha distancia, você sempre mostrou uma pessoa que posso confiar. Também agradeço ao meu irmão Fabrício Luiz Barbosa da Silva, por suas preocupações constantes.

Não poderia deixar de agradecer minha Tia Sônia que foi uma das maiores incentivadoras para minha vinda a São Paulo e poder concretizar meu sonho. Obrigado por abrir sua casa e me acolher na sua família: Sandra Merli Feitosa, Amilton Merli, Andréia Feitosa, Laerte, Ricardo Feitosa, Ingridi, e seus tesouros netos: Lorena, Luiza, Izadora, Ítalo e Angelina.

Quero deixar meu reconhecimento de apoio a meu primo Renilson Feitosa e sua esposa Roseli Feitosa, obrigado pelo incentivo e acolhimento.

Agradeço uma grande irmã científica, a Aline Marosti, que sempre esteve presente, me apoiando desde o início da minha jornada, no Mestrado. Grandes conversas, aprendi muito com você, levarei você sempre comigo. Deus me deu a oportunidade de conhecer uma irmã que queria ter, desejo um caminho de sucesso e felicidades.

Agradeço a toda família Matos que sempre me recebeu bem em sua casa: Carlos Matos, Jacira Matos, Eduardo matos e Leandro Matos. Em especial quero agradecer a Leandro Matos pela sua amizade nos tornamos grandes irmãos de vida, nos divertimos e aprendi muito com você, desejo sucesso em sua vida. Muito obrigado!!!!

Agradecimentos aos meus Mentores na Pesquisa:

Primeiramente, quero agradecer a minha orientadora: **Profª. Drª. Cecília Helena de Azevedo Gouveia** que me acolheu em seu laboratório, acreditou na minha capacidade para desenvolver esse grande trabalho. Principalmente, quero agradecer pela pessoa paciente, incrível, professora e pesquisadora competente e humana. Nos momentos difíceis, sempre tive um grande apoio e compreensão, desejo felicitações em dobro e deixo minha gratidão. Você é um exemplo para minha vida.

Queria deixar minha gratidão ao primeiro que acreditou em minha capacidade, meu grande pai científico Prof. Dr. Francisco Prado Reis. Sempre me incentivou, construímos uma grande amizade com respeito e dignidade. Obrigado pelo grande exemplo de dedicação e competência.

Quero agradecer a grande equipe do laboratório de Morfofisiologia Óssea (LMO): Deixo aqui minha gratidão pela grande amiga, companheira e incentivadora, Professora e colega de laboratório Gisele Myamura Martins Beber e seu Esposo Professor Eduardo Beber.

A minha colega de laboratório Manuela Miranda Rodrigues que me ajudou muito discutindo resultados, nas grandes participações de congressos e a ajuda em experimentos, o PCR devo a você pela grande ajuda.

Minhas colegas também do Laboratório Marília Bianca e Cristiane Cabral por estarem sempre de prontidão para tirar dúvidas e ajudar sempre. E quero desejar a Bianca Neofiti Papi, nova integrante do LMO, desejo o melhor nesse seu início de carreira.

Agradecimento especial:

A Profa Dra. Patricia Brum, departamento de Educação Física e Esporte, obrigado por nos conceder os animais Alfa 2A para o desenvolvimento desse estudo.

Agradecimentos Institucionais:

Agradeço a Universidade de São Paulo pela abertura e oportunidade para desenvolver todo meu trabalho.

Agradeço ao Instituto de ciências biomédicas pela sua grande estrutura em pesquisa. Fico feliz por ter participado dessa grande instituição.

Agradeço ao Departamento de Anatomia, principalmente ao programa de pós-graduação Ciências Morfofuncionais.

Reconhecimento perante minha banca de Ingresso no programa:

Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Prof. Dr. Newton S. Canteras

Profa. Dra. Maria Luiza M. B. de Chaves

Outros Professores do departamento de Anatomia :

Profa. Dra. Patricia Castelucci

Prof. Dr. Edson A. Liberti (Anatomossaurom)

Profa. Dra. Silvia Lacchini

Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara

Profa. Dra. Silvia Boldrini (in memória)

Profa. Dra. Renata Frazão

Profa. Dra. Katiúscia Batista da Silva Paiva

Prof. Dr. Jackson C. Bittencourt

Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Profa. Dra. Claudimara F. Pacicco Lotfi

Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale

Profa. Dra. Gabriela Placoná Diniz

Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe

Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Marucia Chacur

Colegas departamento:

Ao grande João Guilherme que sempre esteve aberto a ajudar no que precisasse.

A grande ajuda que Joice Bertaglia nas imunohistoquímica, acompanhando em todo protocolo, sempre com paciência e competência.

Kelly Palombit e Cristina Eusebio Mendes nos nossos grandes almoços e conversas.

Quero agradecer a todos Colegas de departamento que conviveram e dividimos conhecimentos durante essa jornada como:

Ana Paula Takano, Pedro, Carlos, Adriano, Ivisson, Milena, Tabata, Vanessa, Igor , Thais, Fabio , Adriano , Gislane, Aline , Flavio,

Agradecimento a minha banca de Qualificação :

Profa. Dra. Katiúscia Batista da Silva Paiva

Prof. Dr. Edson A. Liberti (Anatomossauero)

Prof. Dr. Victor Arana

Minha gratidão, por seus apontamentos e colaborações fazendo com que o trabalho fosse finalizado com primor.

Agradecimentos aos Técnicos de Laboratórios :

Deixo aqui meu grande agradecimento a Técnica no Multiusuário de histologia , Marta Maria da Silva Righetti, agradeço pela sua atenção e dedicação sempre na histologia.

A tecnica atual de CEFAP Joelcimar por me ouvir e ser uma grande amiga.
Ao técnico Ricardo Bandeira pela amizade .

Técnicos do Biotério: Fábio , Renivaldo e Rodrigo

Ao tecnico de Laboratório Ney Robson, do departamento de Educação Física e Esporte –
Agradeço por me conceder, sempre paciente, os animais alfa 2A e todos outros que precisei.

Aos Técnicos de Anatomia : Adão, Milton, Nilson, Carlos

A grande conhecedora de estatística Cleide Rosana, obrigado pela ajuda, por ser uma boa ouvinte e ser uma grande amiga.

Agradecimentos externos :

Queria deixar minha grande gratidão para com meus colegas do **departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe** . Obrigado por me conceder o afastamento para que pudesse concluir minha tese.

Agradecimentos a Agencias Financiadoras :

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), obrigado pelo apoio e financiamentos concedidos.

Agradeço a todos que de alguma forma participou dessa minha jornada com palavras, incentivos ou somente escutar minhas angustias. Obrigado por estarem sempre comigo! Espero que na vida de vocês tenham retribuições em dobro o que fizeram por mim.

Deixo aqui minha gratidão de vida !!!

“Tempo x Vida”

Um dia tracei um sonho!

Não sabia que seria alcançado!

Não sabia das pedras!

Não sabia dos Sorrisos!

Não sabia das viagens!

Não sabia das possibilidades de conhecimentos!

Não sabia das amizades que iria construir!

Não sabia dos aplausos!

Não sabia das decepções!

Não sabia das dificuldades! Não sabia nem mais o que achava que sabia!

Agora sei que o sonho tornou-se real!

Que alcancei o que tinha traçado!

Que pulei pedras!

Que abri muitos sorrisos!

Que conheci lugares que nem imaginava!

Que tive grandes oportunidades!

Que fiz amizades eternas!

Que tive aplausos e decepções!

Que tive premiações!

Que vivi momentos inesquecíveis!

Que chorei muito e descobri um amor ainda maior pelos meus Pais!

E o melhor, disso tudo, que agora é recomeço!

“O não Saber” esta presente outra vez!

E começo traçar novos sonhos.

Mas agora com outros olhares !!

Marcos Vinicius da Silva

Resumo

Da Silva MV. Avaliação da Interação do Hormônio Tiroideano com o Sistema Nervoso Simpático, via Receptor α_{2A} Adrenérgico, na Regulação da Maturação e Crescimento Ósseos, [Tese (Doutorado em Ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

Sabe-se que o hormônio tiroideano (HT) regula o desenvolvimento e crescimento dos ossos, entretanto, os seus mecanismos de ação ainda são pouco conhecidos. Recentemente, identificamos a expressão dos adrenoceptores α_{2A} e α_{2C} (α_{2A} -AR e α_{2C} -AR) na lâmina epifisial (LE) de camundongos e uma diminuição no comprimento do fêmur e tíbia de camundongos com inativação gênica do α_{2A} -AR (α_{2A} -AR^{-/-}). No presente estudo, investigamos se o HT interage com o sistema nervoso simpático (SNS) para controlar o crescimento longitudinal ósseo (CLO), e se essa possível interação depende do α_{2A} -AR. Para tanto, avaliamos o efeito de 30 dias de hipotireoidismo (HIPO), induzido por metimazol e perclorato de sódio (adicionados à água de beber); e hipertireoidismo (HIPER), mimetizado por injeções diárias de 20 vezes a dose fisiológica de triiodotironina (20xT3 = 7 µg/100g peso corporal/dia) sobre o CLO de camundongos fêmeas selvagens (Selv = C57BL/6J) e α_{2A} -AR^{-/-} de 21 dias de idade. Vimos que os animais α_{2A} -AR^{-/-} apresentam menor comprimento no fêmur, tíbia, rádio, úmero e L4 quando comparados aos animais Selv. Como esperado, o HIPO e HIPER prejudicaram o CLO desses ossos nos camundongos Selv, entretanto, o efeito do HIPO foi mais deletério. Surpreendentemente, o fêmur, L4 e úmero dos animais α_{2A} -AR^{-/-} se mostraram resistentes aos efeitos negativos do HIPO e HIPER quanto ao CLO. Apenas um efeito ligeiramente negativo do HIPO foi observado na tíbia e rádio, enquanto que o HIPER promoveu um ligeiro aumento (11%, $p < 0,001$) no comprimento desses dois ossos. A análise da morfologia da LE distal do fêmur mostrou que os animais α_{2A} -AR^{-/-} eutireóideos (EUT) apresentam uma ampla desorganização na zona proliferativa (ZP) e uma importante redução no número de CH (70%, $p < 0,001$) e, conseqüentemente, na espessura da zona hipertrófica (ZH) em relação aos animais Selv. Como esperado, o HIPO promoveu importantes alterações na LE dos animais Selv: redução na espessura da LE e na zona proliferativa (ZP), hipertrófica (ZH), pré-hipertrófica (ZPH) e hipertrófica madura (ZHM); e redução no número de CP/coluna, CH, condrócitos pré-hipertróficos (CPH) e condrócitos hipertróficos maduros (CHM). Essas alterações não foram observadas nos animais α_{2A} -AR^{-/-} HIPO, com exceção de uma redução no número de CP/coluna e na espessura da ZHM. Em contraste, o HIPO induziu aumento na ZPH e no número de CPH nos animais α_{2A} -AR^{-/-}. Nos animais Selv, a tirotoxicose causou redução na espessura da ZH e ZPH e diminuição no número de CPH. No entanto, nos animais α_{2A} -AR^{-/-}, o HIPER promoveu redução na espessura de todas as zonas analisadas, e redução no número de CP/coluna, CH e CHM. Vimos que a expressão gênica do PTHrP e Ihh é bastante reduzida na LE dos animais α_{2A} -AR e que esses fatores praticamente não respondem ou respondem de forma oposta ao excesso e deficiência de HT, em relação aos animais Selv. Por outro lado, a expressão gênica de IGF-1 mostrou-se elevada nos animais α_{2A} -AR, enquanto que a resposta do receptor de IGF-1 (IGF-1R) ao HIPER na LE, quanto à sua expressão gênica e protéica, foi oposta àquela observada nos animais Selv. Esses dados sugerem que as vias PTHrP/Ihh e IGF-1/IGF-1R possam ser vias de convergência do SNS e HT na regulação da morfofisiologia da LE, envolvendo o α_{2A} -AR. Através da microtomografia computadorizada (µCT) do osso trabecular da metáfise distal do fêmur, observamos que os animais α_{2A} -AR^{-/-} apresentam menor número de trabéculas (Tb.N) e porosidade trabecular (Tb.Po), e maior espessura trabecular (Tb.Th) do que os animais Selv. Além disso, os animais α_{2A} -AR^{-/-} apresentam menor fator de padrão trabecular (Tb.Pf) e

índice de modelo estrutural(SMI) do que os animais Selv, o que caracteriza maior conectividade trabecular e maior predominância de trabéculas em forma de placa, respectivamente. Nos animais Selv, o HIPO promoveu aumento no volume trabecular (BV/TV) e redução na Tb.N, Tb.Po, TB.Pf e SMI. Em contraste, os animais α_{2A} -AR^{-/-} se mostraram resistentes aos efeitos do HIPO e HIPER na estrutura trabecular óssea. Em sumário, os achados deste estudo mostram que a ausência do α_{2A} -AR altera, de forma importante, a morfologia da LE e o crescimento longitudinal ósseo, além de alterar a estrutura trabecular óssea. Além disso, mostram que a ausência do α_{2A} -AR modifica os efeitos do HT na LE e crescimento ósseo. Em conjunto, esses achados sugerem fortemente que o SNS regula o crescimento ósseo e interage com o HT para regular esse processo de maneira dependente do α_{2A} -AR.

Palavras-Chaves: Hormônio Tireoideno. Crescimento Ósseo. Receptor Adrenérgico.

Abstract

Da Silva MV. Evaluation of the Interaction of Thyroid Hormone with the Sympathetic Nervous System , via α_2A Adrenergic Receptor, the regulation of maturation and Bone Growth [PhD thesis (Morphofunctional Sciences)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016

It is known that thyroid hormone (TH) regulates bone development and growth, however, its mechanisms of action are poorly understood. Recently, we identified the expression of α_{2A} and α_{2C} adrenoceptors (α_{2C} -AR and α_{2A} -AR) in the epiphyseal growth plate (EGP) of mice and decreased length of the femur and tibia of mice with gene inactivation of α_{2A} -AR (α_{2A} -AR^{-/-}). In the present study, we investigated whether TH interacts with the sympathetic nervous system (SNS) to control the longitudinal bone growth (LBG), and if this possible interaction depends on α_{2A} -AR. Therefore, we evaluated the effect of 30 days of hypothyroidism (HYPO) induced by methimazole and sodium perchlorate (added to the drinking water); and hyperthyroidism (HYPER) mimicked by daily injections of 20 times the physiological dose of triiodothyronine (20xT3 = 7g/100g body weight/day) on the LBG of 21-day-old female wild-type (WT= C57BL/6J) and α_{2A} -AR^{-/-} mice. We have found that α_{2A} -AR^{-/-} animals have shorter femur, tibia, radius, humerus and L4 compared to WT animals. As expected, HYPO and HYPER impaired the LBG of these bones in WT mice, however, the effect of HYPO was more deleterious. Surprisingly, the femur, humerus and L4 of α_{2A} -AR^{-/-} animals were resistant to the negative effects of HYPO and HYPER in the LBG. Only a slight negative effect of HYPO was observed in the tibia and radio, while HYPER promoted a slight increase (11%, p < 0.001) in the length of these two bones of the KO mice. The morphological analysis of the distal EGP of the femur showed that euthyroid (EUT) α_{2A} -AR^{-/-} animals present a wide disorganization in the proliferative zone (PZ) and a significant reduction in the number of hypertrophic chondrocytes (HC) (70%, p < 0.001) and consequently, a reduction in the thickness of the hypertrophic zone (HZ), as compared with WT animals. As expected, HYPO promoted significant changes in the LBG of WT animals: reduction in the thickness of the EGP, PZ, hypertrophic zone (HZ), pre-hypertrophic zone (PHZ) and mature hypertrophic zone (MHZ); and a reduction in the number of PC/column, HC, pre-hypertrophic chondrocytes (PHC) and mature hypertrophic chondrocytes (MHC). These changes were not observed in HYPO α_{2A} -AR^{-/-} animals, except for a reduction in the number of PC/column and the MHZ. In contrast, HYPO induced an increase in the MHC number and PHZ thickness in α_{2A} -AR^{-/-} animals. In WT animals, thyrotoxicosis caused a reduction in the HZ and

PHZ thickness and HPC number. However, in α_{2A} -AR^{-/-} animals, HYPER promoted a reduction in the thickness of all the analyzed zones and a reduction in the number of PC/column, HC and MHC. We have found that the gene expression of PTHrP and Ihh is greatly reduced in the EGP of α_{2A} -AR^{-/-} animals and that these factors almost do not respond or respond oppositely to TH excess and deficiency in relation to WT animals. Furthermore, the gene expression of IGF-1 was increased in α_{2A} -AR^{-/-} animals, whereas the gene and protein expression of IGF-1 receptor (IGF-1R) in the EGP responded to HYPER in an opposite way than that observed in WT animals. These data suggest that PTHrP/Ihh and IGF-1/IGF-1R can be pathways of convergence to the SNS and TH in the regulation of the EGP morphophysiology, involving α_{2A} -AR. By the computed microtomography (μ CT) analysis of the trabecular bone of the distal femoral metaphysis, we observed that α_{2A} -AR^{-/-} animals have lower trabecular number (Tb.N) and porosity (Tb.Po), and higher trabecular thickness (Tb.Th) than WT animals. Furthermore, α_{2A} -AR^{-/-} animals have lower trabecular pattern factor (Tb.Pf) and structural model index (SMI) versus WT animals, which characterizes increased trabecular connectivity and predominance of plate-shaped trabeculae, respectively. In WT animals, HYPO promoted an increase in the trabecular bone volume (BV/TV) and reduction in Tb.N, Tb.Po, Tb.Pf and SMI. In contrast, α_{2A} -AR^{-/-} animals were resistant to the effects of HYPO and HYPER in the trabecular bone structure. In summary, our findings show that the absence of α_{2A} -AR importantly affects the EGP morphology, LBG, and the trabecular bone structure. In addition, they show that the absence of α_{2A} -AR modifies the effects of TH in the EGP morphophysiology. Altogether, these findings strongly suggest that the SNS regulates bone growth and interacts with TH to regulate this process in a α_{2A} -AR dependent manner.

Keywords: Thyroid hormone. Bone Growth. Adrenergic Receptor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Esquema ilustrando a via Wnt β -catenina com seus receptores e proteínas correspondentes¹⁵27
- Figura 2–** Corte Histológico corado H & E (hematoxilina e eosina) e uma representação esquemática de zonas da lâmina epifisial. Zona de Reserva (ZR), Zona Proliferativa (ZP), Zona Hipertrófica (ZH) = Zona Pré- Hipertrófica(ZPH) + Zona Hipertrófica madura- (ZHM) e zona de ossificação e Invasão Vascular- Foto e esquema modificado (62).....36
- Figura 3 –** Efeito do hipertireoidismo e hipotireoidismo na massa cardíaca. Animais selvagens (SELV) versus α_{2A} - Animais α_{2A} -AR^{-/-}. Camundongos de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. A massa relativa do coração refere-se à massa seca do coração (g) dividida pela massa corporal (g), multiplicada por 100 [(gramas de coração/gramas de massa corporal) x 100]. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=6- 8 por grupo). ^{xxx}p<0,001 vs SELV (Student t-test), *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs EUT e ⁺p>0,05, ⁺⁺p<0,01 e ⁺⁺⁺p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).....41
- Figura 4–** Massa corporal. (A) Animais Selvagens versus α_{2A} -AR^{-/-}. (B) Animais selvagens. (C) α_{2A} -AR^{-/-}. Os animais foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. A medida da massa corporal foi iniciada quando os animais tinham 21 dias de idade, sendo pesados semanalmente. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EUT (n=8 por grupo). ^{xxx}p<0,001, SELV vs. α_{2A} -AR^{-/-} (Student t-test). *p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001 EUT vs HIPO e ⁺⁺p<0,01 EUT vs HIPER (Student-Newman-Keuls).....42
- Figura 5 –** Comprimento corporal dos animais Selvagens e α_{2A} -AR^{-/-}. Animais selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-} de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Animais Eutiroides (EUT), sem tratamento. A medida do comprimento corpora foi realizada do focinho até a base da calda quando os animais tinham 51 dias de idade, sendo medidos logo após a Eutanásia. Barras representam a média $\pm$ SE (n = 8). *P<0,1, **p<0,01 e ***p<0,001 vs EUT e ⁺⁺p<0,01, ⁺⁺⁺p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).....43
- Figura 6–** Comprimento corporal dos animais Selvagens e α_{2A} -AR^{-/-}. Animais selvagens (SELV) e α_{2A} -AR^{-/-} de 51 dias. A medida do comprimento corpora foi realizada do focinho até a base da cauda quando os animais tinham 51 dias de idade, sendo medidos logo após a Eutanásia. Barras representam a média $\pm$ SE (n = 8).....44

Figura 7- Efeito do Hipotireoidismo (HIPO) e Hipertireoidismo (HIPER) no comprimento dos ossos. Animais selvagens (SELV) e α_{2A} -AR^{-/-} de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Animais Eutiroides (EUT), sem tratamento. Barras representam a média $\pm$ SE (n = 8). * P <0,1, ** p <0,01 e *** p <0,001 vs EUT e ⁺⁺p <0,01, ⁺⁺⁺p <0,001 vs HIPO (Student Newman-Keuls).....45

Figura 8 - Morfologia da lâmina epifisial distal do fêmur. (A, C e E) Camundongos selvagens (SELV). (B, D e F) Camundongos α_{2A} -AR^{-/-}. Animais de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). Abreviações: ZR, zona de reserva, ZP, zona proliferativa, ZH, zona hipertrófica. Os cortes foram corados Safranina O e Fast Green. Barra de 400 μ m.....47

Figura 9 – Morfometria da Lâmina Epifisial (LE) Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e α_{2A} -AR^{-/-} de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol. Eutiroides (EUT). As zonas da LE foram divididas em: zona de reserva (ZR), zona proliferativa (ZP), zona hipertrófica (ZH), zona pré-hipertrófica (ZPH) e zona de condrócitos hipertróficos maduros (ZHM). Determinou-se o número de condrócitos proliferativos por coluna (CP/coluna), condrócitos hipertróficos (CH), condrócitos pré-hipertróficos (CPH), e condrócitos hipertróficos maduros (CHM). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs EUT e ^xp>0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs HIPO(Student-Newman-Keuls).....48

Figura 10 - Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e α_{2A} -AR^{-/-} de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO(Student-Newman-Keuls).....50

Figura 11- Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e α_{2A} -AR^{-/-} de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO(Student-Newman-Keuls).....51

Figura 12- Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e α_{2A} -AR^{-/-} de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO(Student-Newman-Keuls).....51

Figura 13- Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e α_{2A} -AR^{-/-}. de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroideo (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO(Student-Newman-Keuls)..... 52

Figura 14- Imunohistoquímica para *IGF-I* da placa epifisial do fêmur seccionados em cortes longitudinais (A,C e E) camundongos selvagens , (B,D e F) camundongos α_{2A} ^{-/-} . Eut (Controles), Hiper (Tratados 20x T3). HIPO (Tratados com Metimazol + Perclorato de sódio). Abreviaturas ZR- Zona de Reserva, ZP- Zona Proliferativa, ZH- Zona Hipertrófica. Setas – condrócitos imunoreativos à *IGF-I* e cabeças de setas –condrócitos não imunoreativos à *IGF-I*. Barra de 200m.....53

Figura 15- Imunohistoquímica para *IGF-IR* da placa epifisial do fêmur seccionados em cortes longitudinais (A,C e E) camundongos selvagens , (B,D e F) camundongos α_{2A} ^{-/-} . Eut (Controles), Hiper (Tratados 20x T3). HIPO (Tratados com Metimazol + Perclorato de sódio). Abreviaturas ZR- Zona de Reserva, ZP- Zona Proliferativa, ZH- Zona Hipertrófica. Setas – condrócitos imunoreativos à *IGF-IR* e cabeças de setas –condrócitos não imunoreativos à *IGF-IR*. Barra de 200m.....54

Figura 16 - Análise da Ossificação Endocondral de camundongos selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} eutireoideos de 15 dias de idade. (A, C, E) Camundongos selvagens (SELV). (B, D, F) Camundongos α_{2A} -AR^{-/-}. R, rádio; U, ulna; Ca, carpo; T, tibia; Fi, Fíbula; Ta; tarso. Barra: 1000 μ m. Animais foram corados com Vermelho de Alizarina e Azul de Alcian. Em vermelho, osso mineralizado; em azul, cartilagem.....56

Figura 17- Efeito do Hipotireoidismo na Ossificação Endocondral de camundongos selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} 15 dias de idade. (A-D) Pata anterior. (E-H) Joelho. (J-N) Pata posterior. (A,E,J) Camundongos selvagens (Selv) eutiroideos (EUT). (B, F,L) Camundongos Selv HIPO. (C,G,M) Camundongos α_{2A} -AR^{-/-} EUT. (D,H,N) Camundongos α_{2A} -AR^{-/-} HIPO, R, rádio; U, ulna; Ca, carpo; T, tibia; Fi, Fíbula; Ta; tarso. Barra: 1000 μ m. Animais foram corados com Vermelho de Alizarina e Azul de Alcian. Em vermelho, osso mineralizado; em azul, cartilagem. As setas indicam atraso na ossificação endoncondral.....57

Figura 18 – Efeito do HIPO e HIPER na estrutura trabecular do fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e α_{2A} ^{-/-}. de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroideo (EUT). (A) BV/TV = volume ósseo/volume trabecular. (B) Tb.N= número de trabéculas. (C) Tb.Th= espessura trabecular. (D) Tb.Sp= separação entre as trabéculas. (E) Tb.Po Porosidade trabecular, (F)Tb. Pf= fator de padrão de osso trabecular (G) SMI= índice de modulo estrutural. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-7 por grupo). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs EUT e ⁺p>0,05, ⁺⁺p<0,01 e ⁺⁺⁺p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).....59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Grupos de Animais.....	33
Tabela 2- Sequências de Primers para PCR em tempo real.....	37
Tabela 3- Grupos de Animais.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	- <i>Adenomatous polyposis coli</i>
AMO	- Alta massa óssea
2D	- Duas dimensões
3D	- Três dimensões
α2-AR	- Receptor Adrenérgico α 2
β2-AR	- Receptor Adrenérgico β 2
μCT	- Microtomografia Computadorizada
AMO	- Alta Massa Óssea
B.Ar	- Área da cortical
BMD	- Densidade Mineral Óssea
BV/TV	- Volume ósseo/Volume trabecular
CART	- Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CLO	- Crescimento Longitudinal ósseo
CO₂	- Dióxido de carbono
Ct.Th	- Espessura cortical
DA	- Grau de anisotropia
DNAc	- DNA complementar
Dsh	- Disheveled
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

EUT	- Eutiroideu
Fig.	- Figura
FGF23	-Fibroblast growth factor 23
Frizzled	-7-transmembrane domain-spanning frizzled receptors
GH	- Hormônio do crescimento
GR	- Gordura Retroperitoneal
GSK3	- Glycogen synthase kinase 3
HT	- Hormônio tireoideano
HIPER	- Hipertireoideo
HIPO	- Hipotireoideo
IGF-I	- <i>Insulin Growth Factor - I</i>
KO	- Knockout
LE	- Lâmina Epifisial
L2	- Segunda vértebra lombar
L3	- Terceira vértebra lombar
L4	- Quarta vértebra lombar
L5	- Quinta vértebra lombar
LRP5/6	- low-density lipoprotein receptor-related protein 5 e 6
MEC	- Matriz Extracelular
NE	- Noradrenalina
NF-κB	- Fator Nuclear kappa β
OPG	- Osteoprotegerina
Po	- Porosidade da cortical
RF	- Músculo Reto Femoral

RNAm	- RNA mensageiro
ROI	- Região de interesse
rT3	- T3 reverso
Selv	- Selvagem
SMI	- Índice do modelo estrutural
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
Tb.Pf	- Fator de padrão de osso trabecular
T.Pm	- Perímetro do perióstio
Tb.Th	- Espessura trabecular
Tb.Sp	- Separação entre as trabéculas
TRs	- Receptores de hormônio tireoideano
TRAP	- Fosfatase ácida tartrato-resistente
TRH	- Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	- Hormônio tireotrófico
TSHR	- Receptor de TSH
ZR	- Zona de Reserva
ZP	- Zona Proliferativa
ZH	- Zona Hipertrófica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Ações do Hormônio Tiroideano no Esqueleto.....	25
1.2 Ações do Sistema Nervoso Simpático no Esqueleto.....	28
1.3 Evidências de que o Hormônio Tiroideano Interage com o SNS via Receptores α_2 Adrenérgicos para Regular a Estrutura e Fisiologia Ósseas.	30
2 OBJETIVOS	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Animais e Tratamento.....	33
3.1.1 Estudo I.....	33
3.2 Massa do coração.....	34
3.3 Comprimento longitudinal ósseo	34
3.4 Comprimento corporal.....	34
3.5 Microtomografia computadorizada (μ_{CT})	35
3.6- Histologia e Morfometria da Lâmina Epifisial	35
3.7 Expressão gênica por PCR em tempo real (Real-Time PCR)	36
3.8 Imunoistoquímica de IGF-I E IGF-IR.....	38
3.9- Estudo II.....	39
3.9.1- Animais e Tratamento.....	3

<i>3.9.2 - Análise do Processo de Ossificação – Preparação dos Esqueletos</i>	39
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Massa do coração	41
5.2 Massa Corporal	42
5.3 Comprimento corporal	43
5.4 Comprimento longitudinal ósseo (CLO)	44
5.5 Histologia e morfologia da lâmina epifisial do fêmur	46
5.6 Expressão gênica na lâmina epifisial	49
5.7 Análise qualitativa imunohistoquímica para ifg-i e igf-ir.	52
5.8 Análise do processo de ossificação endocondral	55
5.9 Microtomografia computadorizada em 3d: análise do osso trabecular do fêmur	58
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ações do hormônio tireoideano no esqueleto

O hormônio tireoideano (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 ^{1,2}. O excesso de HT estimula mais a atividade osteoclástica do que a osteoblástica, o que resulta em aumento da calcemia e redução da massa óssea. Durante o desenvolvimento, a deficiência do hormônio tireoideano causa atraso generalizado na ossificação intramembranosa e endocondral, somando-se a importantes alterações na lâmina epifisial (LE), tais como redução da sua espessura, desorganização das colunas de condrócitos e prejuízo na diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos^{3,4}, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas ⁵. Por outro lado, o excesso de HT resulta em maturação esquelética acelerada com fechamento prematuro da LE, e com subsequente diminuição do crescimento longitudinal ósseo ^{5,6,7}.

Embora a importância do HT no desenvolvimento e metabolismo ósseos seja clara, pouco se sabe sobre os mecanismos que medeiam os efeitos desse hormônio no tecido ósseo. Sabe-se que o HT pode agir de maneira direta ou indireta no esqueleto. Acredita-se que grande parte das suas ações diretas seja mediada por receptores nucleares de hormônio tireoideano, os TRs. Existem quatro isoformas clássicas de TRs: TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2. A identificação das isoformas TR α 1, TR α 2 e TR β 1 nos osteoblastos e osteoclastos, e nos condrócitos da LE, assim como a responsividade dessas células ao T3 em culturas isoladas ^{3,4}, evidenciam a ação direta do T3 nos tecidos ósseo e cartilagíneos, contudo a importância funcional das diferentes isoformas de TR no esqueleto é ainda pouco conhecida.

O HT também age no esqueleto indiretamente, através do eixo GH/IGF-I (*growth hormone/insulin-like growth factor I*). Sabe-se que tanto o GH quanto o IGF-I apresentam efeitos importantes nos tecidos ósseo e cartilagíneos, tais como a indução da proliferação e diferenciação dos condrócitos da LE ⁸ e dos osteoblastos ⁹, regulando, assim o crescimento e a massa óssea. O GH é produzido pelos somatotrófos da hipófise anterior e age no esqueleto principalmente através do IGF-1, cuja expressão é regulada por ele. A transcrição do gene do GH também é estimulada pelo T3, o que faz com que o hipotireoidismo seja acompanhado por uma menor atividade do eixo GH/IGF-I¹¹. A interação entre as vias de ação do T3 e GH ocorre em vários níveis, além do efeito do T3 na regulação

da transcrição gênica do GH. Lewinson, Bialik e Hochberg¹¹ mostraram que a expressão protéica de IGF-I na cartilagem condilar está reduzida em ratos hipotireoideos e que o HT é requerido para sua restauração. Além disso, foi demonstrado que o T3 aumenta a expressão protéica de IGF-I em cultura de osteoblastos de ratos¹². O HT também atua no eixo GH/IGF-I, regulando a expressão dos receptores destes fatores. Foi mostrado que o tratamento com T3 restaura a expressão do receptor de GH (GHR) na LE de ratos hipofisectomizados⁸ e induz a expressão gênica do receptor de IGF-1 (IGF-1R) em condrócitos da lâmina epifisial de ratos¹³.

Evidências mais recentes mostram que o HT também regula a diferenciação terminal de condrócitos da LE através da modulação da via de sinalização do Wnt/ β -catenina¹⁴. A via de sinalização Wnt compreende uma família de dezenove proteínas que tem um importante papel no desenvolvimento e manutenção de vários órgãos e tecidos, incluindo o osso. Embora as proteínas Wnt sinalizem através de várias vias para regular o crescimento, diferenciação, função e morte celular, a via Wnt/ β -catenina, também conhecida como canônica, parece ser a mais importante para a biologia óssea (15). Se as proteínas Wnt não estiverem expressas ou se a ligação delas aos seus receptores estiver inibida, a degradação da β -catenina é facilitada através da sua interação com um complexo de proteínas que consiste da APC (*adenomatous polyposis coli*), axina e GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*). APC e axina atuam como proteínas de suporte permitindo que o GSK3 se ligue e fosforile a β -catenina, marcando-a, assim, para a degradação pela via ubiquitina/proteasoma. A ativação da via Wnt/ β -catenina se dá pela ligação das proteínas Wnt aos seus receptores Frizzled (*7-transmembrane domain-spanning frizzled receptors*) e ao LRP5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5 e 6*). Essa ligação inibe a atividade do GSK3, através de mecanismos envolvendo as proteínas axina, Frat-1 e Dsh (*disheveled*), fazendo com que haja um acúmulo de β -catenina que, por sua vez, é translocada para o núcleo, onde ela interage com os fatores de transcrição TCF/LEF e ativa a transcrição de genes responsivos ao Wnt¹⁵.

Recentemente, membros da família Wnt vêm sendo reconhecidos como reguladores chave da proliferação e diferenciação de condrócitos durante o desenvolvimento dos membros. A inativação da β -catenina em condrócitos de embriões de camundongos produz um fenótipo de nanismo com diminuição da proliferação de condrócitos, e atraso da diferenciação de condrócitos hipertróficos e da ossificação endocondral¹⁶.

A super expressão de Wnt-8c ou β -catenina induz a diferenciação terminal de condrócitos de galináceos¹⁷ e regula positivamente a expressão do gene Runx2 (um gene essencial para a diferenciação osteoblástica) através da ativação dos sítios de ligação de TCF/LEF no promotor do Runx2¹⁸. A super expressão de inibidor de β -catenina e TCF (ICAT) na cartilagem de camundongos

resulta no comprometimento do crescimento de ossos longos com atraso na diferenciação de condrócitos e no aparecimento de centros de ossificação secundários das epífises.

Wang et al (2007) mostraram que o HT estimula a expressão de Wnt-4 e a sinalização Wnt/ β -catenina na lâmina epifisial de ratos. Além disso, mostraram que antagonistas do Wnt, o Frzb/sFRP3 e o Dkk1 inibem a ativação, pelo T3, da via Wnt/ β -catenina e inibem os efeitos do T3 na maturação dos condrócitos da LE. Esses achados sugerem fortemente que o HT regula a diferenciação terminal dos condrócitos da lâmina epifisial, pelo menos em parte, através da modulação da via Wnt/ β -catenina. Mais recentemente, o mesmo grupo demonstrou que as interações do HT com a via Wnt/ β -catenina para regular a diferenciação de condrócitos da LE são moduladas pela via de sinalização do IGF-1/IGF-1R¹⁸. Com relação à massa óssea, uma série de estudos mostram que a inativação da via Wnt/ β -catenina leva a um fenótipo de baixa massa óssea^{18,20,21}.

Figura 1 - Esquema ilustrando a via Wnt- β -catenina com seus receptores e proteínas correspondentes¹⁵.

1.2 Ações do sistema nervoso simpático no esqueleto

Um dos mais importantes achados dos últimos anos foi o de que o remodelamento ósseo também está sujeito ao controle do Sistema Nervoso Central (SNC), com o Sistema Nervoso Simpático (SNS) agindo como efector periférico^{22,23}. Uma quantidade substancial de evidências demonstra que o SNS regula negativamente a formação óssea e positivamente a reabsorção óssea^{24,25,26}. Assim, é esperado que a diminuição e o aumento do tônus simpático resultem, respectivamente, em alto e baixo fenótipo de massa óssea.

O papel do SNS no controle do remodelamento ósseo foi evidenciado pelo fenótipo de alta massa óssea (AMO) em modelos de camundongos com baixa atividade simpática, como em animais Ob/Ob, que são deficientes de leptina, e em animais deficientes de dopamina β -hidroxilase (DbH^{-/-}), a enzima limitante responsável pela síntese de catecolaminas^{27,28}. Esses modelos animais, entretanto, apresentam disfunções endócrinas, incluindo hipercorticismo, hiperinsulinemia e hipogonadismo, que podem interferir nos efeitos do SNS no osso. Um papel mais preciso do β_2 -AR na massa óssea foi mostrado por análises de animais com inativação gênica (*knockout* = KO) desses receptores, os camundongos β_2 -AR^{-/-}, que não apresentam anormalidades endócrinas ou metabólicas. Esses animais apresentam peso corporal normal, mas apresentam também um fenótipo de AMO a partir dos 6 meses de idade, que ocorre devido a um aumento da formação e diminuição da reabsorção óssea (26). Adicionalmente, esses animais são resistentes à perda de massa óssea induzida por ovariectomia.

Apesar de um crescente corpo de evidências de que a sinalização do β_2 -AR é um elemento chave na regulação do remodelamento ósseo, experimentos farmacológicos e genéticos têm produzido resultados contrastantes e inconclusivos. É digno de nota que a administração de alguns agonistas β -adrenérgicos, como salbutamol^{29,30,33}, clenbuterol^{19,23} e formoterol³⁰ promoveram efeitos positivos na massa óssea de ratos. Além disso, os efeitos positivos dos β bloqueadores não são sempre detectáveis e parecem ser dose-dependentes, com diminuição dos benefícios em altas doses¹⁹. Em humanos, uma série de estudos mostrou que a administração desses β bloqueadores promove efeitos positivos^{19,32}, negativos³³ ou não promove efeitos^{26,27} na densidade mineral óssea (DMO) e/ou em fraturas ósseas. Assim, os efeitos dos β agonistas no metabolismo ósseo permanecem controversos.

Um estudo recente do nosso grupo analisou o fenótipo esquelético de um modelo de camundongo com hiperatividade simpática crônica³⁶. Esse modelo animal é baseado no duplo KO dos genes α_{2A} - e do α_{2C} dos receptores adrenérgicos (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-})³⁷. Os receptores adrenérgicos α_2 (α_2 -ARs) são autorreceptores pré-sinápticos (modulam a liberação de neurotransmissores pelo próprio

neurônio) que regulam negativamente a liberação de catecolaminas. Três subtipos de α_2 -ARs foram identificados: α_{2A} -AR, α_{2B} -AR e α_{2C} -AR^{37,38}. A ativação desses receptores no tronco encefálico leva a uma redução no tônus simpático, o que resulta em diminuição da frequência cardíaca e da pressão sanguínea⁴¹. Esses efeitos são potencializados pela estimulação dos α_2 -ARs em terminações nervosas simpáticas. Hein et al., 1999³⁵, mostraram que o bloqueio simultâneo do α_{2A} -ARs e do α_{2C} -ARs em camundongos leva a uma elevação crônica do tônus simpático. Esses camundongos KOs apresentam alta mortalidade e diminuição da função cardíaca a partir dos 4 meses de idade⁴².

De acordo com o esperado, vimos que os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam níveis plasmáticos elevados de noradrenalina (NE) e hipertrofia cardíaca (determinada pelo aumento da massa seca do músculo cardíaco), o que confirma a hiperatividade do SNS. Considerando-se as evidências de que a ativação do SNS apresenta efeitos negativos na massa óssea³⁵, a nossa expectativa era a de que os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentassem um esqueleto osteopênico. Surpreendentemente, vimos que esses animais apresentam um fenótipo generalizado de AMO^{33,40}.

A análise da massa óssea por *dual energy X-ray absorptiometry* (DXA) por um período de 12 semanas mostrou que o fenótipo de AMO nos animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} se torna mais evidente à medida que os animais envelhecem. Análises histomorfométricas mostraram um aumento de osso trabecular no corpo vertebral da quinta vértebra lombar (L5). Análises por μ CT também mostraram aumento de osso trabecular além de mostrar uma melhor conexão entre as trabéculas e maior quantidade de trabéculas em forma de placas no fêmur e na vértebra dos animais KOs. As melhorias na massa óssea e na microarquitetura trabecular apresentadas por esses animais KOs foram acompanhadas por melhorias nos parâmetros biomecânicos do fêmur e da tíbia. Nesses dois sítios esqueléticos, a carga máxima (uma medida de força óssea) estava significativamente elevada nos animais KOs (8-18%). Além disso, a resiliência, que reflete a habilidade do osso de sofrer deformação elástica, também estava aumentada na tíbia desses animais comparados aos animais selvagens^{33,40}.

O fato de que animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam fenótipo de AMO, mesmo apresentando elevação do tônus simpático e sinalização normal do β_2 -AR, levanta a hipótese de que os receptores α_{2A} -AR e/ou α_{2C} -AR também apresentam um papel na mediação, direta ou indireta, das ações do SNS no esqueleto. Os receptores α_2 -adrenérgicos foram inicialmente caracterizados como receptores pré-sinápticos que regulam a liberação de NE⁴⁴. Depois, foi mostrado que esses receptores não inibem só a liberação de outros neurotransmissores, mas que também podem regular a exocitose de outros neurotransmissores no SNC e periférico⁴⁵. Além disso, foi mostrado que α_2 -ARs não estão restritos a localidades pré-sinápticas, mas também possuem funções pós-sinápticas, que incluem regulação da temperatura corporal, pressão intraocular, lipólise e percepção da dor^{45,46}. Nós mostramos que o α_{2A} -AR e α_{2C} -AR são expressos no tecido ósseo de camundongos selvagens e em células MC3T3-E1, que

são células osteoblasto-*like* derivadas da calvaria de camundongos. Além disso, observamos a expressão protéica, por imunohistoquímica, do α_{2A} -AR e α_{2C} -AR em condrócitos da zona de reserva e pré-hipertrofica da lâmina epifisial da tíbia de camundongos de 35 dias de idade. Detectamos, ainda, a expressão protéica desses receptores em condrócitos da cartilagem articular de ossos longos e em condrócitos hipertroficados de centros de ossificação secundários ⁴⁰.

Coletivamente, os recentes achados do nosso grupo trazem novas evidências de que a regulação da fisiologia e estrutura esqueléticas pelo SNS é extremamente complexa. O fato de que os animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam fenótipo de AMO mesmo apresentando uma elevação no tônus simpático e β_2 -AR sugere que o β_2 -AR não é o único adrenoceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo. Além disso, os nossos achados também levantam a hipótese de que os adrenoceptores α_{2A} e/ou α_{2C} apresentam um papel importante na mediação das ações do SNS na regulação da massa óssea. Por outro lado, a presença dos receptores β_2 -adrenérgicos na LE e em condrócitos hipertroficados de centros de ossificação secundários levantam a hipótese de que o SNS, o α_{2A} -AR e/ou o α_{2C} -AR tenham um papel importante no processo de crescimento longitudinal ósseo e de ossificação do esqueleto.

Essa hipótese vem ganhando força a partir de estudos em andamento no nosso laboratório, onde pudemos observar que camundongos adultos com inativação isolada do α_{2A} -AR e do α_{2C} -AR apresentam um menor comprimento longitudinal ósseo do fêmur e tíbia.

1.3 Evidências de que o Hormônio Tireoideano Interage com o SNS via Receptores α_2 Adrenérgicos para Regular a Estrutura e Fisiologia Ósseas

Uma característica importante do HT, mas ainda pouco entendida, é a sua interação com o SNS. É bem sabido que o sinergismo entre as catecolaminas e o HT é necessário para que ocorra a máxima termogênese, lipólise, glicogenólise e gluconeogênese ². Estudos anteriores mostraram que pacientes com hipertireoidismo apresentam hiperatividade simpática ⁴⁷. Considerando-se 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 (agonista β -adrenérgico) corrige secundariamente a hipercalcemia ⁴⁸. Além disso, pacientes com hipotireoidismo tratados com propranolol apresentam redução da excreção de hidroxiprolina pela urina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea ⁴⁹.

Para investigar essa hipótese, tratamos camundongos fêmeas selvagens e α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} de 40 dias de idade com doses suprafisiológicas de T3 (10 x T3 = 3,5µg/100g PC/dia) por 80 dias. Como esperado, os animais selvagens tratados com T3 apresentaram diminuição na 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 KOs tratados com T3 não apresentaram diminuição da DMO, ou seja, são resistentes à osteopenia induzida pelo T3⁵⁰. Mostramos, ainda, que o T3 inibe a expressão do α_{2C} -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 selvagens, mas não nos animais KOs⁵⁰. Esse estudo sugere fortemente que o HT interage com o SNS para regular a massa óssea.

Como mencionado anteriormente, estudos em andamento no nosso laboratório mostram que camundongos adultos com inativação isolada do α_{2A} -AR ou do α_{2C} -AR apresentam um menor comprimento longitudinal ósseo do fêmur e tíbia. Mais importante ainda, esses estudos mostram que o tratamento, por 30 ou 90 dias, com dose suprafisiológica de T3 prejudica o crescimento longitudinal ósseo do fêmur e tíbia de camundongos selvagens, mas não afeta o crescimento ósseo de camundongos com inativação isolada do α_{2A} -AR ou do α_{2C} -AR.

A observação de que os animais α_{2A} -AR^{-/-} e α_{2C} -AR^{-/-} são resistentes à diminuição do comprimento dos ossos induzida pela tirotoxicose, associada ao fato de que detectamos a expressão desses receptores em condrócitos da zona de reserva e pré-hipertrófica da LE da tíbia de camundongos sugere fortemente uma interação do HT com o SNS, via α_{2A} -AR^{-/-} e/ou α_{2C} -AR^{-/-}, para regular o crescimento longitudinal ósseo.

Uma avaliação detalhada do efeito da deficiência e excesso de T3 na LE de camundongos α_{2A} -AR^{-/-}, α_{2C} -AR^{-/-} e α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} será necessária para confirmar esta hipótese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar se o hormônio tiroideano interage com o SNS, através da via de sinalização do receptor α_{2A} adrenérgico, para regular a maturação e crescimento ósseos.

2.2 Objetivos específicos:

- 1-Avaliar se a inativação isolada do α_{2A} -AR interfere no crescimento longitudinal ósseo, na ossificação endocondral e intramembranosa de camundongos;
- 2-Characterizar o fenótipo da LE de camundongos α_{2A} -AR^{-/-}.
- 3-Investigar se a ação do HT no crescimento longitudinal ósseo depende do α_{2A} -AR, avaliando o efeito do HT na estrutura da LE e no comprimento dos ossos dos animais α_{2A} -AR^{-/-};
- 4-Avaliar se vias conhecidas de ação do HT na LE (via do PTHrP/Ihh, GH/IGF-1 e Wnt/ β -catenina) são afetadas pela inativação isolada do α_{2A} -AR;
- 5-Investigar se a ação do HT na ossificação endocondral depende do α_{2A} -AR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Animais e tratamento

Esse projeto foi dividido em dois estudos, que serão descritos abaixo.

3.1.1 Estudo I:

Foram estudados camundongos fêmeas, com 21 dias de idade, selvagens (Selv) da linhagem C57BL/6J e camundongos fêmeas com inativação gênica (*knockout* = KO) isolada do receptor adrenérgico α_{2A} (α_{2A} -AR^{-/-}). Os camundongos KOs 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 mantidos em condições controladas de luz e temperatura (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas em temperatura de aproximadamente 25 °C), com acesso *ad libitum* à ração e água. Os animais foram agrupados (n=6/grupo), como especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos de Animais.

Grupos (n=6/grupo)	Tratamento com T3	Inibição da Tiróide
Selv-Eut	-	-
Selv-Hipo	-	+
Selv-Hiper	+	-
α_{2A} -AR ^{-/-} -Eut	-	-
α_{2A} -AR ^{-/-} -Hipo	-	+
α_{2A} -AR ^{-/-} -Hiper	+	-

Tratamento com T3 refere-se à administração i.p. de 7,0 µg T3/100 g·PC/dia por 30 dias. O hipotireoidismo foi induzido por inibição da função tiróideana, através da administração de metimazol (0,1%) e perclorato de sódio (1%), adicionados à água de beber, durante todo o período experimental. Eut = eutireoideos (animais não tratados). Hipo = hipotireoidismo e Hiper = hipertireoidismo.

O hipotireoidismo (Hipo). Foi induzido através do tratamento com os seguintes inibidores da glândula tiróide: 0,1% de metimazol (Sigma, St Louis MO, EUA) e 1% de perclorato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Ambos foram adicionados à água de beber, durante todo o período experimental. O hipertireoidismo (Hiper) foi mimetizado pela administração diária e intraperitoneal de T3 (Sigma, St Louis MO, EUA), na dose de 7,0 µg de T3 / 100g de peso/dia. Essa dose equivale a,

aproximadamente, 20 vezes a dose fisiológica de T3 / dia. Ambos os tratamentos foram administrados por 30 dias. Sendo que no final do tratamento os animais teriam 51 dias de idade.

Todos os animais foram pesados a cada dois dias para o acompanhamento da variação do peso corporal ao longo do período experimental e para o ajuste das doses de T3 a serem administradas. Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados por exposição a CO₂. O sangue do tronco foi coletado para medida de níveis séricos de T3, T4, TSH e IGF-I por radioimunoensaio. Foram também dosados os níveis plasmáticos de NE. Os Fêmures, tíbias, rádios, úmeros e vértebras (L4) foram coletados para medir os comprimentos ósseos. O fêmur direito e L4 foram direcionados para a análise histológica da lâmina epifisial. As tíbias e o fêmur esquerdo (após a análise por μ CT) foram armazenados para teste biomecânico. Já os fêmures esquerdos foram direcionados para análise por microtomografia computadorizada.

3.2 Massa do coração

Logo após a eutanásia, os corações dos animais foram coletados, levados com água destilada e pesados em balança de precisão para a aferição da massa úmida. Em seguida, foram colocados em estufa, a 60 °C, por 48 h. Em seguida, aferiu-se a massa seca desses corações na mesma balança de precisão em que aferiu-se a massa úmida. A massa do coração foi expressa de acordo com a fórmula abaixo.

$$\text{Massa relativa do Coração} = \frac{\text{Massa seca do Coração} \times 100}{\text{Massa Corporal}}$$

3.3 Comprimento longitudinal ósseo

Utilizando-se um paquímetro digital (150mm/6 0,01mm Digimess), foram medidos os comprimentos entre as extremidades proximais e distais de ambos os fêmures, tíbias, rádios e úmeros e da vértebra L4.

3.4 Comprimento corporal

Com os animais anestesiados com uma mistura de xilasina (Rompum®, Bayer SA, São Paulo, Brasil) e quetamina (Ketamina®, Sespo, São Paulo, Brasil), nas doses de 10 e 30 mg/kg de peso corporal, respectivamente, administradas intra-peritonealmente. Foi medido o comprimento corporal longitudinal, da ponta do focinho até a base da cauda, através de uma régua. O crescimento longitudinal

foi calculado pela diferença entre medida final e basal (crescimento longitudinal = comprimento Final - comprimento Inicial).

3.5 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Parâmetros em três dimensões (3D) do fêmur direito dos animais de α_{2A} -AR^{-/-} (EUT, HIPO E HIPER) e selvagem (EUT, HIPO e HIPER) de 51 dias de idade foram obtidos através do Microtomógrafo da Skyscan 1172 (Desktop X-ray microtomograph). O programa CT-Analyser (versão 1.5.0.0, SkyScan, Artselaar, Bélgica) foi utilizado para análise das imagens e o programa CT-Vol (versão 1.5.0.0, SkyScan, Artselaar, Bélgica) foi utilizado para obtenção das imagens em 3D. A região de interesse analisada no fêmur foi a metáfise distal. Os parâmetros trabeculares a serem analisados foram o Volume ósseo/Volume trabecular (BV/TV); Espessura trabecular (Tb.Th); Separação entre as trabéculas (Tb.Sp); Número de trabéculas (Tb.N), fator do padrão trabecular ósseo (Tb.Pf), um índice de conectividade trabecular; índice do modelo estrutural (SMI), que indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas);

3.6 Histologia e morfometria da lâmina epifisial

O fêmur direito e L4 de cada animal foram fixados em uma solução de formaldeído a 10%, a temperatura ambiente, por 1 semana. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água corrente e descalcificadas em solução de EDTA 4,2%, pH 7,0 a temperatura ambiente e sob agitação. Após a descalcificação, as amostras foram processadas como se segue. Os ossos foram lavados com água para a retirada do excesso de EDTA. Em seguida, sofreram processo de desidratação sendo submetidos a uma bateria de álcoois ascendentes (álcool 30% a 95% (variação 5%), mergulhados por 10 minutos em casa passagem e 3 baterias de álcool 100%, por 30 min cada). As amostras foram, então, diafanizadas em xilol (3 vezes em 20 minutos) e embebidas 3 vezes em Parfina a 60 °C (3 vezes por 30 minutos cada). Cortes longitudinais de espessura de 5 μ m foram corados com *safrania O* e contracorados com “fast Green” por 10 min. Foram feitas lâminas e realizadas medidas morfométricas da lâmina epifisial, com auxílio do programa *Image-Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os parâmetros medidos são: espessura da lâmina epifisial e das zonas de reserva, proliferativa e hipertrófica; área da lâmina epifisial; número de condrócitos proliferativos por coluna; e número de condrócitos hipertróficos por mm² da lâmina epifisial, como previamente descrito fig. 2^{59,62}.

Figura 2 – Corte Histológico corado H & E (hematoxilina e eosina) e uma representação esquemática de zonas da lâmina epifisial. Zona de Reserva (ZR), Zona Proliferativa (ZP), Zona Hipertrófica (ZH) = Zona Pré- Hipertrófica(ZPH) + Zona Hipertrófica madura- (ZHM) e zona de ossificação e Invasão Vascular- Foto e esquema modificado ⁶².

3.7 Expressão gênica por pcr em tempo real (Real-time PCR)

Com o auxílio de uma lupa, a lâmina epifisial de ambos os fêmures foram dissecados rapidamente sobre uma superfície resfriada (0-4 °C) e, em seguida, agrupados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. Para a extração do RNAm, os *pools* de cartilagens 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 cartilagem, foi adicionado Trizol (Gibco, BRL). A mistura de pó de cartilagem mais Trizol foi homogeneizada com um polytron PT10-35 (Brinkmann Instruments, Inc, NY, USA). O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do TRizol e tratado com DNase I (Fermentas, Hanover, MD, USA), segundo indicação do fabricante. A concentração e pureza do RNA foram determinadas 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 oligo (dT) e transcriptase reversa *ReverAid-H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas, Hanover, MD, USA), conforme o seguinte protocolo: incubação com o oligo (dt) a 25 °C por 10 min, transcrição reversa a 37 °C por 1 hora e inativação por calor (heat inactivation) da transcriptase reversa a 95 °C por 5 min no termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Os *primers* de oligonucleotídeos para amplificação por PCR são apresentados na Tabela 2, como: Wnt 4, IGF-1, Runx2, Col10a1, Col2a1, PTHrP, Ihh, Alkaline Phosphatase.

Os valores relativos à amplificação do RNAm referente a cada gene estudado foram avaliados através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador e detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), comparando todas as amostras e o controle em duplicatas. Após padronização da quantidade de DNAc e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 25 µl, com 450 nM de *primers* e *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). O gene 18srRNA foi utilizado 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 (53).

Tabela 2 – Sequências de Primers para PCR em tempo real

Genes	Pares de Indicadores (Diretos/ Reversos)
18s	GTAACCCGTTGAACCCCAT
18s	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Wnt 4	AACCGGCGCTGGAAGCTG
Wnt 4	GGTCCCTTGTGTCACCACCTT
IGF-1	GCTATGGCTCCAGCATTCG
IGF-1	AGATCACAGCTCCGGAAGCA
IGF-1R	CCTGGCGTGCTGGTTCTC
IGF-1R	GGCGCGTCCCCCAT
Runx2	TTTAGGGCGCATTCCTCATC
Runx2	GAGGGCCGTGGGTGT
Col10a1	GATCATGGAGCTCACGGAAAA
Col10a1	CCGTTCGATTCCGCATTG
Col2a1	CGGTCCTACGGTGTCAGG
Col2a1	TTATACCTCTGCCATTCTGC
PTHrP	GGTTCAGCAGTGGAGTGTCC
PTHrP	CAGACACAGCGCGTTTGA
Ihh	TGCATTGCTCTGTCAAGTCTG
Ihh	GCTCCCCGTTCTCTAGGC
Alkaline Phosphatase	GACCCCTTGACCCCCACAAT
Alkaline Phosphatase	GCTCGTACTGCATGTCCCCT

3.8 Imunoistoquímica de IGF-1 e IGF-1R.

Assim como na Histologia os fêmures direito e L4, de cada animal, foram fixados em uma solução de formaldeído a 10%, a temperatura ambiente, por 1 semana. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água corrente e descalcificadas em solução de EDTA 4,2%, pH 7,0 a temperatura ambiente e sob agitação. Após a descalcificação, as amostras foram processadas como se segue. Os ossos foram lavados com água, para a retirada do excesso de EDTA. Em seguida, os ossos sofreram processo de desidratação sendo submetidos a uma bateria de álcoois ascendentes (álcool 30% a 95% (variação 5%, 10 minutos cada passagem), e álcool 100% (3 passagens de 30 min cada). Em seguida, foram fixados em 3 banhos de parafina (30 min cada). Foram feitos cortes longitudinais de espessura de 5 µm em um micrótomo (*Leica RM 2255*). Posteriormente, foi realizada a re-hidratação dos cortes histológicos em alcoóis (70 % e 50 %) por 2 min em cada álcool. Finalmente, os cortes foram lavados com PBS (Solução Salina Tamponada 0,1M, Ph 7,3). Foi realizada a recuperação antigênica, mergulhando as lâminas em pepsina (04% em HCl 0,01N) por 30 minutos a 37 °C. Depois, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (Peróxido de Hidrogênio a 3%) por 15 minutos. Em seguida, foi feita a interrupção do bloqueio da peroxidases, através de três lavagens de PBS. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feita através de leite desnatado (3%), por 30 min, seguido de lavagem dos cortes com PBS. Posteriormente, as lâminas foram secas e colocadas em câmara úmida onde foram adicionadas anticorpo primário para IGF-1 (H-70) e anticorpo primário específico para IGF-1R, ambos na diluição de 1:50, incubando-se por 12 h, a 20 °C. A reação foi interrompida com 3 lavagens contínuas em PBS. Em seguida, as lâminas foram secadas com papel filtro. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário Vector biotilado (avidina, biotina e PBS) (1:200) por 30 min e, depois, as lâminas foram lavadas em PBS para interromper a reação. Após secagem, as lâminas foram incubadas em DAB por 10 min. A reação foi interrompida lavando-se as lâminas com água destilada. Em seguida, os cortes foram processados em baterias de alcoóis (70°-100 °, 2min cada passagem), xilol (2 x 5 min) e, finalmente, montou-se as lâminas para posteriores análises qualitativas.

3.9 Estudo II

Neste estudo, avaliaremos, especificamente, o efeito do hipotireoidismo em associação com as deleções gênicas na ossificação endocondral.

3.9.1 Animais e tratamento

Foram estudados camundongos recém-nascidos (RN) Selv e α_{2A} -AR^{-/-} em grupos (n=7/grupo) eutiroides (Eut) e hipotireoides (Hipo). Após o nascimento, a cria foi mantida com a progenitora em uma mesma gaiola. O hipotireoidismo foi induzido adicionando-se metimazol (0,1%) e perclorato de sódio (0,1%) à água de beber das mães a partir do primeiro dia de vida dos camundongos, uma vez que ambas as drogas são liberadas no leite materno. O tratamento foi mantido por 14 dias e, ao final desse período, os animais foram sacrificados por exposição a CO₂. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas em temperatura de aproximadamente 25 °C), com acesso *ad libitum* à ração e água. Os animais foram agrupados, como especificado na Tabela 3.

Tabela 3. Grupos de Animais.

Grupos (n=4/grupo)	Inibição da Tiróide
Selv-Eut	-
Selv-Hipo	+
α_{2A} -AR ^{-/-} -Eut	-
α_{2A} -AR ^{-/-} -Hipo	+

A inibição da tiróide será induzida através da administração de metimazol (0,1%) e perclorato de sódio (1%), adicionados à água de beber das progenitoras, durante todo o período experimental. Hipo = hipotireoidismo e Eut = eutiroidismo.

3.9.2 Análise do processo de ossificação – preparação dos esqueletos

Após o sacrifício dos animais de 2 semanas de idade, os esqueletos foram cuidadosamente dissecados pela retirada da pele, músculos e vísceras. Os esqueletos foram fixados em metacam (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% ácido acético), *overnight*, e transferidos para etanol 100%, também *overnight*. As amostras foram coradas com solução de azul de alcian (150 mg azul de alcian em 80 mL etanol e 20 mL ácido acético) por 48 horas. Após este período, os esqueletos foram colocados em etanol 95% por algumas horas, para retirada do excesso do corante, e depois em hidróxido de potássio 1% por mais 24 horas. Os esqueletos foram corados com solução de vermelho de alizarina (50 mg/L vermelho de alizarina em hidróxido de potássio 2%) por algumas horas. As amostras foram, então, colocadas em hidróxido de potássio 1%/glicerol 20% por 48 horas. Os esqueletos corados foram armazenados e fotografados em solução etanol-glicerol v/v. Foram realizadas medidas morfométricas dos centros de ossificação de ossos longos e curtos com auxílio do programa *Image-pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). Os centros de ossificação que foram medidos serão selecionados após uma análise inicial.

4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos para qualquer parâmetro foi testada pela análise de variância (Two-way ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* InStat Instant Biostatistics; para a construção de gráficos e foi utilizado o *software* Prism (ambos provenientes da GraphPad Software, São Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Massa do coração

A Fig. 3 mostra que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentaram aumento da massa seca do coração, o que sugere hipertrofia cardíaca que, por sua vez, ocorre em função do aumento do tônus simpático²⁶. Como esperado, o HIPER promoveu hipertrofia cardíaca³⁵, também evidenciada pelo aumento da massa seca do coração. Nota-se entretanto, que esse efeito foi potencializado nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, que apresentaram um aumento na massa cardíaca de 40% ($p < 0,001$ vs $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ EUT), enquanto que, nos animais SELV HIPER, o aumento na massa do coração foi de 27%. Já o HIPO causou uma redução na massa cardíaca, em relação aos animais EUT (40%, $p < 0,001$), apenas nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

Figura 3 – Efeito do hipertireoidismo e hipotireoidismo na massa cardíaca. Animais selvagens (SELV) versus $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Camundongos de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose supra-fisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. A massa relativa do coração refere-se à massa seca do coração (g) dividida pela massa corporal (g), multiplicada por 100 [(gramas de coração/gramas de massa corporal) x 100]. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). xxxp < 0,001 vs SELV (Student t-test), *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 vs EUT e +p > 0,05, ++p < 0,01 e +++p < 0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).

5.2 Massa corporal

A Fig. 4A mostra que animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentaram massa corporal aproximadamente 20% menor do que os animais SELV, sendo que essa diferença foi significativa a partir dos 28 dias de idade. Nos animais SELV, o HIPO e HIPER causaram redução significativa da massa corporal em relação aos animais EUT, sendo que o efeito deletério do HIPO foi mais importante do que o do HIPER (Fig. 4B). Nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o HIPO também causou redução da massa corporal em relação aos animais EUT, até o final do tratamento (Fig. 4C). No entanto, o grupo $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratado com T3 (HIPER) apresentou aumento da massa corporal já na segunda semana de tratamento (16%, $p<0,01$) quando comparado ao grupo EUT (Fig. 4C).

Figura 4— Massa corporal. (A) Animais Selvagens versus $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. (B) Animais selvagens. (C) $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. A medida da massa corporal foi iniciada quando os animais tinham 21 dias de idade, sendo pesados semanalmente. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EUT (n=8 por grupo). ^{xxx} $p<0,001$, SELV vs. $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ (Student t-test). * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ EUT vs HIPO e ⁺⁺ $p<0,01$ EUT vs HIPER (Student-Newman-Keuls).

5.3 Comprimento corporal

Observa-se, na Fig. 5, que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tendem a apresentar um menor comprimento corporal do que os animais SELV, entretanto, essa diferença não é significativa. Nota-se que o HIPO e HIPER reduziram significativamente o comprimento corporal dos animais SELV em 14% e 11%, respectivamente. Por outro lado, nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, apenas o HIPO causou redução significativa (18%) no comprimento corporal. A Fig. 6 ilustra o efeito do HIPER e HIPO no comprimento corporal dos animais SELV e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Nota-se que o HIPO foi a condição que mais comprometeu o crescimento corporal, seja nos animais SELV e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

Figura 5 – Comprimento corporal dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Animais selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Animais Eutiroides (EUT), sem tratamento. A medida do comprimento corpora foi realizada do focinho até a base da calda quando os animais tinham 51 dias de idade, sendo medidos logo após a Eutanásia. Barras representam a média $\pm$ SE (n = 8). *P<0,1, **p<0,01 e ***p<0,001 vs EUT e ++ p<0,01, +++ p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).

Figura 6– Comprimento corporal dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Animais selvagens (SELV) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 51 dias. A medida do comprimento corpora foi realizada do focinho até a base da cauda quando os animais tinham 51 dias de idade, sendo medidos logo após a Eutanásia. Barras representam a média $\pm$ SE (n = 8).

5.4 Comprimento longitudinal ósseo (CLO)

A Fig. 7 mostra que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam ossos longos menores do que os animais SELV. Essa diferença foi significativa em todos os ossos longos analisados (fêmur, tíbia, rádio e úmero) e, também, na quarta vértebra lombar (L4).

Como esperado o HIPO e HIPER foram deletérios ao crescimento ósseo dos animais SELV. O HIPO reduziu significativamente o comprimento longitudinal do fêmur (16%, $p < 0,001$), tíbia (16,2%, $p < 0,001$), rádio (12%, $p < 0,001$), úmero (14%, $p < 0,01$) e L4 (35%, $p < 0,01$) nos camundongos SELV. O HIPER foi menos deletério do que o HIPO nos animais SELV, mas também resultou em um menor comprimento longitudinal no fêmur (10%, $p < 0,001$), tíbia (5%, $p < 0,001$), rádio (2%, $p < 0,001$), úmero (5,3%, $p < 0,01$) e L4 (16,7%, $p < 0,001$). Surpreendentemente, os ossos longos dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ se mostraram resistentes ao efeito deletério do HIPO no crescimento ósseo. Apenas um efeito ligeiramente negativo do HIPO foi observado no crescimento longitudinal da tíbia (4,6%, $p < 0,001$) e do rádio (4,6% $p < 0,001$), enquanto o HIPER promoveu um ligeiro aumento no comprimento desses dois ossos (11% e 12,5% respectivamente, $p < 0,001$) em comparação aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ HIPO.

Figura 7- Efeito do Hipotireoidismo (HIPO) e Hipertireoidismo (HIPER) no comprimento dos ossos. Animais selvagens (SELV) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertireoidismo (HIPER). O hipotireoidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Animais Eutiroides (EUT), sem tratamento. Barras representam a média $\pm$ SE (n = 8). * P < 0.1, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 vs EUT e ++ p < 0,01, +++ p < 0,001 vs HIPO (Student Newman-Keuls).

5.5 Histologia e morfologia da lâmina epifisial do fêmur

A Fig. 8 mostra que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ EUT apresentam alterações importantes na morfologia da LE. Observa-se condrócitos hipertróficos (CH) na zona de reserva (ZR) e desorganização das colunas de condrócitos proliferativos (CP). Além disso, as espessuras das zonas hipertróficas (ZH) e a da zona proliferativa (ZP) mostraram-se alteradas nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o que se confirmou na análise morfométrica. A Fig. 9 mostra que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ eutiroides apresentaram diminuição zona pré-hipertrófica (ZPH; 52%, $p<0,001$) e aumento nas zonas de condrócitos hipertróficos maduros (ZHM-30%, $p<0,001$) e na ZP de (20%, $p<0,001$) em relação aos animais SELV eutiroides. Houve, ainda, uma diminuição no número de CH (60%) e condrócitos pré-hipertróficos (CPH; 55%) (Fig. 9-I). Como esperado, o HIPO promoveu alterações importantes na morfologia da LE (Fig 8 e 9) dos animais SELV. Nesses animais, houve uma ampla desorganização na zona proliferativa (ZP), além de uma importante redução nas espessuras da LE (40%, $p<0,001$), ZP (50%, $p<0,001$), ZH (63%, $p<0,001$), ZPH (35%, $p<0,001$) e ZHM (70%, $p<0,001$) (Fig. 9 A e C-F). Houve, também, redução no número de condrócitos proliferativos por coluna (CP/coluna; 32%, $p<0,001$), CH (45%, $p<0,001$), CPH (36%, $p<0,001$) e CHM (72%, $p<0,00234$) (Fig. 6H-J). Já nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o HIPO não alterou a espessura da ZH, mas causou aumento da ZPH (45%, $p<0,001$) (Fig 9. D-E) e diminuição na ZHM (20%, $p<0,001$). Diferentemente do que ocorreu nos animais SELV, observa-se que o HIPO reduziu o número de CPH (42%, $p<0,001$) e não alterou o número de CHM nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Nos animais SELV, o HIPER causou redução na espessura da ZPH e ZHM. Além disso, o HIPER causou redução no número de CPH (30%, $p<0,001$) e aumento no número de CHM (25%, $p<0,001$). Nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, a tirotoxicose promoveu diminuições em todas as espessuras analisadas: Espessura da LE (20%, $p<0,001$), ZR (40%, $p<0,001$), ZP (35%, $p<0,001$), ZPH (15%, $p<0,001$). Essas reduções de espessura comprovaram-se com reduções nos números de CP/coluna (37%, $p<0,001$), CP (22, $p<0,001$), e CHM (37%, $p<0,001$).

Figura 8 - Morfologia da lâmina epifisial distal do fêmur. (A, C e E) Camundongos selvagens (SELV). (B, D e F) Camundongos $\alpha_{2A}^{-/-}$. Animais de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). Abreviações: ZR, zona de reserva, ZP, zona proliferativa, ZH, zona hipertrófica. Os cortes foram corados Safranina O e Fast Green. Barra de 400 μ m.

Figura 9 – Morfometria da Lâmina Epifisial (LE) Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e $\alpha 2A^{-/-}$. de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol. Eutiroides (EUT). As zonas da LE foram divididas em: zona de reserva (ZR), zona proliferativa (ZP), zona hipertrófica (ZH), zona pré-hipertrófica (ZPH) e zona de condrócitos hipertróficos maduros (ZHM). Determinou-se o número de condrócitos proliferativos por coluna (CP/coluna), condrócitos hipertróficos (CH), condrócitos pré-hipertróficos (CPH), e condrócitos hipertróficos maduros (CHM). *p<0,05, **,p<0,01 e ***p<0,001 vs EUT e x p>0,05, xx p<0,01 e xxx p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).

5.6 Expressão gênica na lâmina epifisial.

Os animais $\alpha_{2A}AR^{-/-}$ EUT apresentaram aumento na expressão gênica de Col II e X em relação aos animais SELV EUT (Fig. 10 A e B), que são marcadores de condrócitos proliferativos e hipertróficos, respectivamente. Esses aumentos correlacionam-se, respectivamente, com o aumento na espessura da ZP e ZHM (Fig. 9). Como esperado, o HIPO reduziu a expressão tanto do Col II e X nos animais SELV, sendo que efeitos similares foram observados nos animais KO. O HIPER também reduziu a expressão do Col II e X nos animais SELV e $\alpha_{2A}AR^{-/-}$. A ALP, um outro marcador de CH, também teve a sua expressão aumentada nos animais $\alpha_{2A}AR^{-/-}$ EUT, HIPO e HIPER, em relação aos animais SELV com os mesmos status tiroideanos. O HIPO e HIPER reduziram a expressão da ALP nos animais SELV e KO (Fig. 10 C).

A expressão gênica de Wnt-4, uma proteína envolvida na regulação da proliferação e diferenciação de condrócitos ¹⁴, mostrou-se reduzida na LE dos animais KO em relação aos animais SELV, em todas as condições de tratamento: EUT, HIPO e HIPER (Fig. 11 A). Corroborando estudos anteriores, o HIPO reduziu a expressão de Wnt-4 nos animais SELV. Nos animais $\alpha_{2A}AR^{-/-}$, tanto o HIPO quanto o HIPER reduziram a expressão de Wnt-4. Como esperado, a expressão de Runx-2, um fator de transcrição importante para a diferenciação dos CH e regulado pelo Wnt-4, teve a sua expressão reduzida nos animais SELV HIPO. Nos animais KO, tanto o HIPO quanto o HIPER reduziram a expressão de Runx-2 (Fig. 11 B).

A expressão de PTHrP, um fator que mantém os condrócitos em proliferação, também se mostrou reduzida nos animais KO em relação aos SELV, em todas as condições de tratamento (Fig. 12 A). Nos animais SELV, o HIPO reduziu ligeiramente a expressão de PTHrP (20%, $p < 0,001$), enquanto que o HIPER reduziu essa expressão em (55%, $p < 0,001$), o que corrobora estudos anteriores ^{65,66,67}. A expressão gênica de Ihh, um fator presente em CH que estimula a expressão de PTHrP em células pericondriais, mostrou-se bastante reduzida nos animais KO em relação aos animais SELV, em todas as condições de tratamento (Fig. 12 B). O HIPO e HIPER reduziram a expressão de Ihh nos animais SELV, mas não alteraram a sua expressão nos animais KO.

A expressão gênica de IGF-1 (Fig. 13 A) mostrou-se aumentada na LE dos animais $\alpha_{2A}AR^{-/-}$ EUT, HIPO e HIPER em relação aos animais SELV com o mesmo status tiroideano. Também, como esperado, o HIPO reduziu a expressão de IGF-1 na LE dos animais SELV. Esse efeito foi igualmente observado nos animais KO. O HIPER não alterou a expressão de IGF-1 nos animais SELV, mas reduziu nos animais $\alpha_{2A}AR^{-/-}$. A expressão gênica de IGF-1R difere entre os animais SELV e KO EUT (Fig. 13 B). O HIPO aumentou a expressão desse receptor nos animais SELV e KO, mas mais

acentuadamente nos animais SELV. Por outro lado, o HIPER não alterou a expressão de IGF-1R nos animais SELV, mas aumentou nos animais KO

Figura 10 - Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e $\alpha 2A-AR^{-/-}$ de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroideo (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO(Student-Newman-Keuls).

Figura 11- Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e $\alpha 2A-AR^{-/-}$ de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).

Figura 12- Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e $\alpha 2A-AR^{-/-}$ de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).

Figura 13- Expressão Gênica na LE Distal do Fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) foi induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). ^xp<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001 vs EUT e *p>0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).

5.7 Análise qualitativa imunohistoquímica para IGF-1 e IGF-1R.

Na Fig 14, observa-se, por imunohistoquímica, a expressão de proteína de IGF-1 na LE de camundongos Selv e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Nota-se a expressão de IGF-1 nos condrócitos da ZP e ZH dos animais SELV Eut (Fig.14-A), enquanto que, na LE dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ EUT (Fig.10-B), a expressão de IGF-1 encontra-se reduzida em relação aos animais Selv. Como esperado, o HIPO promoveu uma diminuição expressiva na marcação de IGF-1 na ZP e ZH, da LE, dos animais SELV (Fig.14-C). Esse efeito do HIPO também foi visto na LE dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ (Fig.14-D). O HIPER reduziu a expressão de IGF-1 na LE dos animais Selv e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

A Fig. 15(A-F) mostra a expressão protéica de IGF-1R, por imunohistoquímica. Na LE dos animais SELV Eut (Fig.15-A), observa-se condrócitos imunoreativos para IGF-1R na ZP e, principalmente, na ZH. Na LE dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ Eut (Fig.15-B), também observa-se expressão de IGF-1R na ZP e ZH, mas esta mostra-se reduzida em relação à observada nos animais SELV. A falta do T3 promoveu uma diminuição expressiva na marcação de IGF-1R nas zonas ZP e ZH dos animais SELV HIPO (Fig.15-C). Entretanto, na LE dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ HIPO (Fig.15-D), praticamente não houve diminuição na imunomarkação para IGF-1R. Nos animais SELV Hiper (Fig.15-E), houve redução na marcação de IGF-1R nas zonas ZP e ZH em relação aos animais Selv EUT. Em contraste, nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, a tirotoxicose promoveu aumento na expressão do IGF-1R na ZP e ZH em relação aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ EUT.

Figura 14- Imunohistoquímica para *IGF-I* da placa epifisial do fêmur seccionados em cortes longitudinais (A, C e E) camundongos selvagens, (B, D e F) camundongos $\alpha_{2A}^{-/-}$. Eut (Controles), Hiper (Tratados 20x T3). HIPO (Tratados com Metimazol + Perclorato de sódio). Abreviaturas ZR- Zona de Reserva, ZP- Zona Proliferativa, ZH- Zona Hipertrofica. Setas – condrócitos imunoreativos à *IGF-I* e cabeças de setas – condrócitos não imunoreativos à *IGF-I*. Barra de 200m.

Figura 15- Imunohistoquímica para *IGF-1R* da placa epifisial do fêmur seccionados em cortes longitudinais (A, C e E) camundongos selvagens, (B, D e F) camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Eut (Controles), Hiper (Tratados 20x T3). HIPO (Tratados com Metimazol + Perclorato de sódio). Abreviaturas ZR- Zona de Reserva, ZP- Zona Proliferativa, ZH- Zona Hipertrófica. Setas – condrócitos imunoreativos à *IGF-1R* e cabeças de setas – condrócitos não imunoreativos à *IGF-1R*. Barra de 200m.

5.8 Análise do processo de ossificação endocondral.

A comparação entre animais SELV e α_{2A} -AR^{-/-} sem tratamento, EUT (Fig. 16), mostra que não há diferenças quanto à ossificação endocondral (OE). A Fig. 17 mostra o efeito do HIPO na OE da epífise distal do fêmur e epífise proximal da tíbia e das patas anteriores e posteriores dos animais SELV e α_{2A} -AR^{-/-}. Como esperado, o HIPO causou atraso na OE principalmente no carpo, tarso e epífise proximal da tíbia. Nos animais α_{2A} -AR^{-/-}, o efeito do HIPO na OE do carpo foi menos evidente do que aquela observada nos animais SELV. No tarso dos animais α_{2A} -AR^{-/-}, o efeito do HIPO na OE foi similar àquele dos animais SELV. Por outro lado, aparentemente, a deleção do adrenoceptor α_{2A} acelerou a ossificação na epífise distal do fêmur. Esses achados iniciais sugerem uma possível interação do T3 com o SNS, via α_{2A} -AR^{-/-}, na OE pós-natal.

Figura 16 - Análise da Ossificação Endocondral de camundongos selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ eutireoideus de 15 dias de idade. (A, C e E) Camundongos selvagens (SELV). (B, D, F) Camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. R, rádio; U, ulna; Ca, carpo; T, tibia; Fi, Fibula; Ta; tarso. Barra: 1000 μm . Animais foram corados com Vermelho de Alizarina e Azul de Alcian. Em vermelho, osso mineralizado; em azul, cartilagem.

Figura 17- Efeito do Hipotireoidismo na Ossificação Endocondral de camundongos selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ 15 dias de idade. (A-D) Pata anterior. (E-H) Joelho. (J-N) Pata posterior. (A,E,J) Camundongos selvagens (Selv) eutiroides (EUT). (B, F,L) Camundongos Selv HIPO. (C,G,M) Camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ EUT. (D,H,N) Camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ HIPO, R, rádio; U, ulna; Ca, carpo; T, tíbia; Fi, Fíbula; Ta; tarso. Barra: 1000 μm . Animais foram corados com Vermelho de Alizarina e Azul de Alcian. Em vermelho, osso mineralizado; em azul, cartilagem. As setas indicam atraso na ossificação endoncondral.

5.9 Microtomografia computadorizada em 3d: análise do osso trabecular do fêmur.

Através da microtomografia em 3 dimensões, analisamos parâmetros do osso trabecular da metáfise distal do fêmur esquerdo. A Fig. 18 mostra que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam menor Tb.N (Fig 18B) e Tb.Po, e maior Tb.Th (Fig 18B) do que os animais SELV. Além disso, os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentar menor Tb.Pf e SMI do que os animais SELV, o que caracteriza maior conectividade trabecular e maior predominância de trabéculas em forma de placa nos animais KO.

Observamos que, nos animais SELV, o HIPO aumentou o BV/TV (70%, $p<0,001$) reduziu o Tb.N (72%, $p<0,001$) e Tb.Po (22%, $p<0,001$), Tb.PF (30%, $p<0,001$) e SMI (18%, $p<0,001$). Já o HIPER, nos animais SELV, não alterou significativamente nenhum parâmetro trabecular. Esse achado demonstra que o esqueleto de camundongos jovens é mais sensível à deficiência do que ao excesso de HT. O HIPO e HIPER não afetaram a estrutura trabecular os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o que reforça uma interação entre o HT e SNS, via receptor α_{2A} , para regular a estrutura óssea trabecular.

Figura 18 – Efeito do HIPO e HIPER na estrutura trabecular do fêmur. Camundongos selvagens (SELV) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. de 21 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias para induzir o hipertiroidismo (HIPER). O hipotiroidismo (HIPO) induzido pela adição de perclorato de sódio e metimazol à água de beber por 30 dias. Eutiroides (EUT). (A) BV/TV = volume ósseo/volume trabecular. (B) Tb.N= número de trabéculas. (C) Tb.Th= espessura trabecular. (D) Tb.Sp= separação entre as trabéculas. (E) Tb.Po Porosidade trabecular, (F) Tb. Pf= fator de padrão de osso trabecular (G) SMI= índice de módulo estrutural. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-7 por grupo). *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs EUT e +p>0,05, ++p<0,01 e +++p<0,001 vs HIPO (Student-Newman-Keuls).

6 DISCUSSÃO

Sabe-se que o HT é um importante regulador do desenvolvimento e crescimento do esqueleto. A deficiência do HT durante a infância resulta em retardo no crescimento e idade óssea atrasada, o que leva à baixa estatura⁵¹. Em contraste, no hipertireoidismo, há aumento na velocidade de crescimento linear e a maturação óssea é acelerada, levando à ossificação precoce da LE, o que também pode resultar em baixa estatura⁴. Considerando-se que o HT interage com o SNS para regular uma série de processos fisiológicos e que todas as isoformas dos adrenoreceptores α_2 foram identificadas na LE de camundongos⁴⁰, levantamos a hipótese de que o HT interage com o SNS para regular o crescimento longitudinal ósseo.

Está bem descrito na literatura que os receptores α_2 -adrenérgicos desempenham um papel importante no auto regulação da liberação de catecolaminas⁵². No entanto, pouco se sabe das funções individuais de cada um dos subtipos desses adrenoreceptores (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}). Apesar de todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos⁴⁹ poderem ser ativados pela adrenalina e noradrenalina, apenas o subtipo α_2 parecem estar ligados à inibição pré-sináptica de catecolaminas.

Diversos processos fisiológicos sofrem influência de receptores α_2 -adrenérgicos. Dentre esses processos, os receptores adrenérgicos participam do metabolismo lipídico, da função cardiovascular, e tem efeito analgésico, além de outras ações⁵³. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório têm demonstrado que esses receptores participam do controle do remodelamento ósseo^{40,54}. Vimos que animais com dupla inativação gênica dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo generalizado de alta massa óssea⁴⁰ e resistência à osteopenia induzida pela tirotoxicose⁵⁴. Por outro lado, a inativação gênica isolada do α_{2C} -AR resulta em fenótipo de baixa e alta massa óssea no fêmur e vértebra, respectivamente, mas também causa resistência à redução da massa óssea induzida pelo excesso de hormônio tiroideano em ambos os sítios esqueléticos⁵⁵.

A caracterização esquelética de animais com deleções gênicas individuais dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} , camundongos α_{2A} -AR^{-/-} e α_{2C} -AR^{-/-}, mostrou que apresentam um menor comprimento do fêmur em relação aos animais Selv, e resistência ao efeito deletério do hipertireoidismo no crescimento do fêmur^{55,56}. Baseado nesses importantes achados, fundamentou-se os objetivos deste estudo, que são: avaliar se a inativação isolada do α_{2A} -AR interfere no crescimento longitudinal ósseo, caracterizar o fenótipo da lâmina epifisial de camundongos α_{2A} -AR^{-/-} e investigar se a ação do HT no crescimento ósseo depende do α_{2A} -AR. Para tanto, avaliamos o efeito do excesso e deficiência do HT na estrutura da LE e no crescimento longitudinal ósseo dos camundongos α_{2A} -AR^{-/-}.

No presente estudo, os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentaram massa corporal menor quando comparados aos animais Selv. Como esperado, nos animais Selv, o HIPO e HIPER causaram redução na massa corporal, sendo que esse efeito foi mais acentuado no HIPO. Nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o HIPO também causou redução da massa corporal em relação aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}\text{-EUT}$, mas o HIPER, surpreendentemente, causou aumento desse parâmetro. Esse achado mostra que a deleção isolada do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ alterada a reposta da massa corporal à tirotoxicose, o que sugere uma interação do HT com o SNS, via $\alpha_{2A}\text{-AR}$, em processos responsáveis pela regulação da massa corporal.

Corroborando os achados de Martins et al. 2012, observamos que o comprimento dos ossos longos foi menor nos camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. O mesmo foi observado quanto ao comprimento longitudinal de L4 (menor nos animais KO). Nos animais selvagens, o HIPO e HIPER foram deletérios ao crescimento longitudinal ósseo, sendo que o HIPO foi mais prejudicial do que o HIPER. Surpreendentemente, vimos que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ foram resistentes ao efeito deletério do HIPO no comprimento longitudinal ósseo de todos os ossos analisados (fêmur, tíbia, L4, rádio e úmero). Além disso, vimos que o HIPER promoveu um ligeiro aumento no comprimento da tíbia e rádio. Considerando-se a presença de $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ na LE⁴⁰, os achados do presente estudo reforçam a hipótese de que o HT interage com o SNS para regular o crescimento longitudinal ósseo e que essa interação envolve receptores α_2 adrenérgicos.

Considerando esses achados, no presente estudo, analisamos a morfologia da LE distal do fêmur dos camundongos Selv e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Vimos que a LE dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ eutiroideos apresentam desorganização nas colunas de condrócitos da ZP e uma importante redução no número de CH, o que explica o menor comprimento dos ossos longos desses animais.

Como esperado, o HIPO promoveu alterações clássicas na LE dos animais Selv, que incluem: desorganização das colunas de condrócitos, redução na espessura da LE e das zonas proliferativa (ZP), hipertrófica (ZH), pré-hipertrófica (ZPH) e hipertrófica madura (ZHM); e redução no número de CP/coluna, CH, condrócitos pré-hipertróficos (CPH) e condrócitos hipertróficos maduros (CHM). Essas alterações não foram observadas nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, hipotiroideos, com exceção de uma redução no número de CP/coluna e na espessura da ZHM. Em contraste, o HIPO induziu aumento na ZPH e no número de CPH nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

Nos animais Selv, a tirotoxicose causou redução na espessura da ZPH e ZHM e diminuição no número de CPH. Já nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o HIPER promoveu redução na espessura de todas as zonas analisadas, e redução no número de CP/coluna, CH e CHM. Esses achados demonstram que a LE dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ é responsiva ao HIPO e HIPER, mas que a resposta é diferente daquela observada

nos animais Selv, o que sugere fortemente que há interação do SNS com o HT, envolvendo a via de sinalização do α_{2A} -AR^{-/-}, na regulação da morfofisiologia da LE e, portanto, no crescimento longitudinal ósseo.

É digno de nota que, em outro estudo desenvolvido em nosso laboratório, vimos que animais com deleção isolada do α_{2C} AR (α_{2C} -AR^{-/-}) também apresentam alterações importantes na LE e respostas diferentes ao HIPO e HIPER em relação aos animais Selv. Mais importante, ainda, foi observar que as alterações e as respostas da LE ao status tiroideano são diferentes daquelas observadas nos animais α_{2A} -AR^{-/-} ⁵⁴. Mais especificamente, vimos que os animais α_{2C} -AR^{-/-} apresentam um maior número de CH, CPH e CHM em relação aos Selv. Nos animais α_{2C} -AR^{-/-}, o Hipo resultou em uma melhor organização das colunas de CP, e não houve uma diferença significativa no número de CHM (em relação aos animais α_{2A} -AR^{-/-} sem tratamento), ou seja, causou um efeito contrário àquele observado em animais Selv e α_{2A} -AR^{-/-} ⁵⁴.

Em um terceiro estudo do nosso grupo, estudamos o crescimento longitudinal ósseo e a morfometria da LE de animais com duplo KO dos adrenoreceptores α_{2A} e α_{2C} ($\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-}). Vimos que a espessura da LE e das suas zonas, e que o número de condrócitos proliferativos e hipertróficos são maiores nos animais $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} do que nos animais Selv, α_{2A} -AR^{-/-} e α_{2C} -AR^{-/-}. Além disso, vimos que a espessura da LE e das suas zonas e que o número de CH não foram reduzidos pelo HIPO, como normalmente ocorre nos animais Selv. Apesar das alterações na LE, vimos que os animais $\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-} respondem ao HIPO e HIPER de maneira similar aos animais Selv quanto ao crescimento longitudinal ósseo ⁵⁸.

De qualquer forma, a observação de que as alterações na LE e as respostas da LE ao status tiroideano diferem, dependendo do tipo de inativação gênica, dupla ($\alpha_{2A/2C}$ -AR^{-/-}) ou isolada (α_{2A} -AR^{-/-} ou α_{2C} -AR^{-/-}), sugere ações específicas desses receptores na LE, bem como ações específicas na mediação da interação do HT com o SNS para regular a morfologia da LE.

Em um segundo momento, vimos que a expressão gênica de Col II, um marcador de CP ⁶⁰, é maior nos animais α_{2A} -AR^{-/-}; o que se correlaciona com uma maior espessura da ZP e com um maior número de CP nesses animais. Os animais α_{2A} -AR^{-/-} também apresentaram uma maior expressão de Coll X e ALP, que são marcadores de CH ⁶¹, o que também se correlaciona com uma maior espessura da ZHM. Apesar disso, os animais KO não apresentaram um maior número de CHM do que os animais Selv, o que sugere que estes condrócitos possam ser mais ativos nos animais KO. Por outro lado, todos esses genes (Col I, Col X e ALP) responderam ao HIPO e HIPER de maneira similar nos animais Selv e α_{2A} -AR^{-/-}.

Posteriormente, avaliamos a expressão gênica de Wnt-4, uma proteína envolvida na regulação da proliferação e diferenciação de condrócitos⁶². Membros da família Wnt têm sido cada vez mais reconhecidos como principais reguladores da proliferação de condrócitos e diferenciação durante o desenvolvimento dos membros. A Inativação de β -catenina em condrócitos de embriões de rato, produz um fenótipo de nanismo com a diminuição da proliferação de condrócitos, um atraso na diferenciação de condrócitos hipertróficos prejudicando a formação de osso endocondral⁶³. A sinalização de Wnt ocorre, quer através da via canonica β -catenina-dependente ou não-canônica (via Wnt independente da β -catenina). A via canônica da Wnt foi recentemente identificada como uma importante reguladora do crescimento e diferenciação celular⁶⁴. Na via canônica, as proteínas Wnt ligam-se a receptores Frizzled, o que resulta na inativação da GSK-3 (*glycogen synthase kinase-3*). Esta enzima é responsável pela fosforilação da β -catenina, o que permite a sua degradação. Assim sendo, a inibição da GSK-3 resulta em acúmulo de β -catenina no citoplasma. Este nível elevado de β -catenina compete com sítios ligantes para TCF / LEF no núcleo, ativando a transcrição de genes responsivos ao Wnt¹⁴.

Estudos¹⁷ sugerem que o HT regula a diferenciação terminal dos condrócitos da LE, pelo menos em parte, através da modulação da via Wnt-4/ β -catenina. Esses autores mostraram que o HT estimula a expressão de Wnt-4 e a sinalização Wnt/ β -catenina na lâmina epifisial de ratos. Viram que antagonistas do Wnt (Frzb/sFRP3 e o Dkk1) inibem os efeitos do T3 na maturação dos condrócitos da LE¹⁴. No presente estudo, vimos que a expressão gênica de Wnt-4 se mostrou reduzida nos animais KO, apesar do maior número de CHM nos animais α_{2A} -AR^{-/-} EUT em relação aos Selv EUT. Como esperado, nos animais Selv, o HIPO reduziu a expressão desse gene e do Runx-2, um fator de transcrição importante para a diferenciação dos CH e regulado pelo Wnt-4. Esses efeitos também foram observados nos animais α_{2A} -AR^{-/-}, apesar de não apresentarem a intensa diminuição no número de CH em função do HIPO, observada nos animais Selv. Esses achados mostram que a via Wnt-4 não explica as diferentes respostas da LE dos animais KO ao status tiroideano. Assim sendo, uma outra via de ação do HT deve estar envolvida na interação desse hormônio com o SNS para regular a morfologia e função da LE.

Em seguida, avaliamos a expressão gênica do PTHrP e Ihh, que compõem uma importante via de regulação da proliferação e diferenciação dos condrócitos da LE⁶⁵. O PTHrP é expresso por células pericondriais e condrócitos no início da proliferação, em seguida, difunde-se para longe do seu local de produção para atuar no receptor de PTH/PTHrP, expresso em condrócitos em proliferação⁶⁶. O PTHrP mantém condrócitos num estado proliferativo e impede a sua hipertrofia⁶⁷. Ao limitar a transição de proliferação para hipertrofia, o PTHrP limita o número de células capazes de expressar indian hedgehog (Ihh), os condrócitos pré-hipertróficos. Estas células i secretam o Ihh que, por sua vez,

estimula a proliferação de condrócitos e a expressão PTHrP, o que resulta na inibição da hipertrofia de condrócitos^{68,69,70,71}. Deste modo, o PTHrP e Ihh participam de um ciclo de feedback que regula a sua própria expressão e a taxa de diferenciação de condrócitos. A extensão da zona de condrócitos proliferativas será sempre limitada pela distância das suas células do local de produção PTHrP; assim, as células mais distantes serão capazes de escapar do controle do PTHrP, iniciando a hipertrofia e a expressão de Ihh, o qual irá alimentar estimular a expressão PTHrP⁶⁷.

Vimos uma maior expressão gênica do PTHrP e menor de Ihh nos animais α_{2A} -AR^{-/-}, o que está de acordo com a maior espessura da ZHM e menor da ZPH, respectivamente. Vimos, ainda, que o HIPO e HIPER reduziram a expressão tanto do PTHrP quanto do Ihh nos animais Selv, mas não nos animais α_{2A} -AR^{-/-}, o que sugere que esta represente uma via de convergência do SNS e HT. Vale ser dito que um estudo de Stevens et al., 2000⁷² sugere que o HT regula o ritmo de diferenciação dos condrócitos da LE através da via PTHrP/Ihh. Nesse estudo, porém, viram, por hibridização in situ da LE, que o HIPO aumenta a expressão gênica do PTHrP, enquanto que o HIPER diminui a expressão do receptor de PTHrP, o PTHrP-R.

Sabe-se que o HT modula a proliferação e diferenciação dos condrócitos da LE, pelo menos em parte, através da via IGF-1/IGF-1R⁷³. O IGF-1, cuja expressão gênica e protéica é induzida pelo TH, estimula principalmente a proliferação dos condrócitos, mas, também, a hipertrofia dessas células, promovendo, assim, o crescimento longitudinal ósseo^{74,75,76}. Vimos que os animais α_{2A} -AR^{-/-} apresentam uma maior expressão gênica, mas menor expressão proteica de IGF-1 do que os animais Selv. Como esperado, o HIPO reduziu a expressão gênica e proteica desse fator na LE dos camundongos Selv, o que também foi observado nos animais α_{2A} -AR^{-/-}. Por outro lado, o HIPER não alterou a expressão gênica de IGF-1 na LE dos animais Selv, mas reduziu a expressão proteica. Na LE dos animais KO, o HIPER reduziu tanto a expressão gênica quanto protéica de IGF-1. A LE dos animais α_{2A} -AR^{-/-} apresentou uma menor expressão proteica de IGF-1R do que a dos animais Selv. Houve aumento da expressão gênica do IGF-1R em resposta ao HIPO, sendo que este foi similar entre os animais Selv e α_{2A} -AR^{-/-}. Por outro lado, a resposta do IGF-1R ao HIPER diferiu entre os animais Selv e KO. Nestes últimos, o HIPER aumentou a expressão gênica e proteica de IGF-1R, enquanto que não alterou a expressão gênica e reduziu a expressão protéica nos animais Selv. Em conjunto, esses resultados mostram que a expressão do IGF-1 e IGF-1R é alterada nos animais α_{2A} -AR^{-/-} e que o status tiroideano afeta expressão gênica e proteica de IGF-1R de forma alterada nos animais α_{2A} -AR^{-/-} em relação aos animais Selv. Esses achados sugerem que a via IGF-1/IGF-1R também possa representar uma via de convergência do SNS e HT, assim como o PTHrP/Ihh.

A avaliação da ossificação endocondral (OE) através da marcação do esqueleto com vermelho de alizarina e azul de alcian detectou diferenças apenas sutis entre os animais Selv e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ eutiroídeos. Como esperado, o HIPO causou atraso na OE principalmente no carpo, tarso, epífise distal do fêmur e epífise proximal da tíbia. Nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o efeito do HIPO na OE do carpo foi menos evidente do que aquela observada nos animais Selv. No tarso dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o efeito do HIPO na OE foi similar àquele dos animais Selv. Por outro lado, aparentemente, a deleção do adrenoceptor α_{2A} acelerou a ossificação na epífise distal do fêmur. Esses achados preliminares sugerem uma possível interação do T3 com o SNS, via $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, na ossificação endocondral pós-natal. Entretanto, uma análise mais detalhada será necessária para confirmar esses achados.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, afim de compreendermos o fenótipo ósseo desses animais $\alpha_{2A}\text{AR}^{-/-}$, $\alpha_{2C}\text{AR}^{-/-}$ e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$, avaliamos a estrutura óssea trabecular da metáfise distal do fêmur por microtomografia computadorizada. Foi verificado que não houve diferenças nos parâmetros ósseos analisados entre os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ aos 60 e 120 dias de idade. Por outro lado, camundongos $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ de 120 dias de idade apresentaram um menor BV/TV⁵⁵, diferentemente do que foi encontrado nos animais duplo KOs ($\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{AR}^{-/-}$), os quais apresentaram fenótipo generalizado de alta massa óssea⁴⁰. Já os animais $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam um menor volume de osso trabecular. No presente estudo, vimos que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam menor Tb.N e Tb.Po, e maior Tb.Th do que os animais Selv. Além disso, os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentaram menor Tb.Pf e SMI do que os animais Selv, o que caracteriza maior conectividade trabecular e maior predominância de trabéculas em forma de placa.. Esses achados sugerem que a deleção isolada do receptor adrenérgico $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e do $\alpha_{2C}\text{-AR}$, causa efeitos bastante diferentes, muitas vezes contrários aos da falta simultânea do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e do $\alpha_{2C}\text{-AR}$.

Observamos, ainda, que, diferentemente do observado nos animais Selv, o HIPO e HIPER não afetaram a estrutura trabecular dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Isso está de acordo com os estudos de Fonseca et al. 2014⁵⁴ e Grecco Teixeira et al. 2016⁵⁵, que mostraram que os ossos dos camundongos $\alpha_{2A/2C}\text{-AR}^{-/-}$ e $\alpha_{2C}\text{AR}^{-/-}$ são resistentes à osteopenia induzida pela tirotoxicose. Esses achados, em conjunto, reforçam a hipótese de interação entre o HT e SNS, via receptores α_2 adrenérgicos, para regular a estrutura óssea trabecular.

7 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo sugerem que:

1. O SNS regula a morfofisiologia da LE e o crescimento longitudinal ósseo via receptor α_{2A} ;
2. O HT interage com o SNS para regular a morfofisiologia da LE e o crescimento longitudinal ósseo;
3. A interação do HT com o SNS para regular a morfofisiologia da LE e o crescimento longitudinal ósseo envolve a via do α_{2A} -AR;
4. As vias PTHrP/Ihh e IGF-1/IGF-1R representam vias de convergência do SNS e HT na regulação da morfofisiologia da LE, envolvendo o α_{2A} -AR.
5. Há uma pequena interação do T3 com o SNS, via α_{2A} -AR^{-/-}, para regular a ossificação endocondral pós-natal.

REFERÊNCIAS*

- (1) 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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Dec;86(12); 2001,5848-53.
- (2) Rude RK, Oldham SB, Singer FR, Nicoloff JT. Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol. *The New England journal of medicine*. Feb 19;294(8); 1976,431-3.
- (3) Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*. 21; 1997.137-42.
- (4) Williams GR, Bland R, Sheppard MC. Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling. *Endocrinology*; 1994; 135:2375-85.
- (5) Allain TJ, McGregor IS. Thyroid hormones and bone. *J Endocrinol*. 1993;139:9-18.
- (6) Freitas, FRS. Efeito da reposição de hormônio do crescimento (gh) no desenvolvimento ósseo em ratas hipotireoideas tratadas com o agonista seletivo do receptor β de hormônio tireoideano, [Tese (doutorado em Ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.
- (7) O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY, Williams GR. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 17ed ;2003.1410-24.
- (8) Gevers EF, van der Eerden BC, Karperien M, Raap AK, Robinson IC, Wit JM. Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate. *J Bone Miner Res*. 17;2002.1408-19.
- (9) Barnard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology*. 128; 1991.1459-64.
- (10) Nanto-Salonen K, Muller HL, Hoffman AR, Vu TH, Rosenfeld RG. Mechanisms of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: all thyroid hormone effects are not growth hormone mediated. *Endocrinology*. 132d; 1993.781-8.
- (11) Lewinson D, Harel Z, Shenzer P, Silbermann M, Hochberg Z. Effect of thyroid hormone and growth hormone on recovery from hypothyroidism of epiphyseal growth plate cartilage and its adjacent bone. *Endocrinology*. 124.;1989. 937-45.
- (12) Lakatos P, Caplice MD, Khanna V, Stern PH. Thyroid hormones increase insulin-like growth factor I content in the medium of rat bone tissue. *J Bone Miner Res*. 8; 1993.1475-81.
- (13) Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Bentham J, Lindahl A. Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *J Endocrinol*. 135; 1992.115-23.

*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) Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid hormone interacts with Wnt/bcatenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res.*; 2007.22:1988–95.
- (15) Krishnan V, Bryant HU MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.*; 2006.116(5):1202–09.
- (16) De Wongakiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.*; 2004. 18:1072–87.
- (17) Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM, O’Keefe RJ, Drissi H Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol.*; 2006. 208:77–86.
- (18). Dong Y, Drissi H, Chen M, Chen D, Zuscik MJ, Schwarz EM, O’Keefe RJ Wnt-mediated regulation of chondrocyte maturation: Modulation by TGF-beta. *J Cell Biochem.*; 2005. 95:1057–68.
- (19) Wang L, Shao YY, Ballock RT. Leptin synergizes with thyroid hormone signaling in promoting growth plate chondrocyte proliferation in vitro: *Bone*; 2011. 48: 1022-27.
- (20) Gong, Y., et al.. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.*; 2001.107:513-23.
- (21)- Kato, M., et al. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA , Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.*; 2002. 157:303-14.
- (22) Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.*; 2000. 100(2):197-07.
- (23) Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc Res Tech.* ; 2002.58(2):77-84
- (24) Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* ; 2002.111(3):305-17.
- (25) Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, Togari A Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochem Pharmacol.*; 200.161(5):579-86.
- (26) Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.*; 2005. 434(7032):514-20.
- (27) Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Richard O, Vico L, Collomp K, Courteix D. Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone*; 2005.37(5):622-33.

- (28) Pataki A, Muller, K., Bilbe, G., Green, J.R., Glatt, M. Anabolic effects of beta2-agonists, formoterol and salbutamol on cancellous bone ovariectomized (OVX) rat. . Bone; 1996. 9(a):A116.
- (29) Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. J Musculoskelet Neuronal Interact.; 2008. 8(2):94-04.
- (30) Fitzpatrick B, Woods M, Lynch G, Manton D. The effects of denervation and formoterol administration on facial growth. Aust Orthod.; 2014 Nov;30(2):161-8.
- Cavalié H, Lac G, Lebecque P, Chanteranne B, Davicco MJ, Barlet JP. Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. J Appl Physiol.; 2002. 93(6):2034-7.
- (31) Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. Jama; 2004. 292(11):1326-32.
- (32) Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen BR, Kolthoff N, Brixen K, Mosekilde L. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. Calcif Tissue Int.; 2004. 75(5):365-72.
- (33) Martineau L, Horan MA, Rothwell NJ, Little RA. Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men. Clin Sci (Lond) ; 1992.83(5):615-21.
- (34) Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS, Bauer DC beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. J Bone Miner Res.; 2005.20(4):613-8.
- (35) Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. Nature. 1999.402(6758):181-4.
- (36) Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS, Ribeiro MO, Bianco AC, Gouveia CH. Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. J Endocrinol; 2007. 193(1):21-9.
- (37) Shreve PE¹, Toews ML, Bylund DB. Alpha 2A- and alpha 2C-adrenoceptor subtypes are differentially down-regulated by norepinephrine. Eur J Pharmacol.; 1991. Jul 12;207(3):275-6.
- (38) Ruffolo RR, Jr., Nichols AJ, Hieble JP 1991 Metabolic regulation by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. Life Sci 49(3):171-83.
- (39) Fonseca, TL. Interação do Sistema Nervoso Simpático com o hormônio tireoideano na regulação da massa e metabolismo ósseos. [Tese (Mestrado em Ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009
- (40) Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Moulatlet ACB, Teixeira MBCG, Beber EH, Freitas FRS, Wang CC, Nonaka KO, Casarini D, Brum PC, Gouveia CHA 2009 Double disruption of alfa2A e alfa2c-adrenoreceptors results in sympathetic hyperactivity and high bone mass phenotype, submetido a Journal Of Bone and Mineral Research, 2011.
- (41) Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol.; 2002.283(5):H1838-45.

- (42) Maltin CA, Delday MI, Watson JS, Heys SD, Nevison IM, Ritchie IK, Gibson PH. Clenbuterol, a beta-adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients. *Clin Sci (Lond)*;1993. 84(6):651-4.
- (43) Harvey CB, O'Shea PJ, Scott AJ, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Samarut J, Chassande O, Williams GR. Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function. *Mol Genet Metab.*; 2002. 75:17-30,.
- (44) Katsumata K, Nishizawa K, Unno A, Fujita Y, Tokita A. Association of gene polymorphisms and bone density in Japanese girls. *JBone Miner Metab.*; 2002, 20(3):164-9.
- (45) Bouxsein ML, Devlin MJ, Glatt V, Dhillon H, Pierroz DD, and Ferrari. Mice Lacking β -Adrenergic Receptors have increased bone mass but are not protected from deleterious skeletal effects of ovariectomy. *Endocrinology*; 2009.150(1):144-52
- (46) Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. *Acta Med Scand.*; 1978. 204(1-2):97-102.
- (47) 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) *La Nouvelle presse medicale.*; 1982.20;11(13):989-91.
- (48) Beber EH, Capelo LP, Fonseca TL, Costa CC, Lotfi CF, Scanlan TS, Gouveia CH. 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*; 2009.84(4):324-33.
- (49) Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Ver.*; 1994. 46(2):121-36.
- (50) Piróg KA¹, Briggs MD. Skeletal dysplasias associated with mild myopathy-a clinical and molecular review. *J Biomed Biotechnol.*;2010.57-68.
- (51) Weiner D. Pathogenesis of slipped capital femoral epiphysis: current concepts. *J Pediatr Orthop B.*; 1996. 5:67-73.
- (52) Miller KE, Carpenter JF, Brooks RR. Inhibition of isoproterenol-induced tachycardia by azimilide in the isolated perfused guinea pig heart. *Cardiovasc Drugs Ther.*; 1998.12(1):83-91.
- (53) Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS, Kobilka BK. Targeted inactivation of the gene encoding the mouse α 2c-adrenoceptor homolog. *Mol Pharmacol.*; 1995.48(1):48-55.
- (54) Fonseca TL, Teixeira MB, Miranda-Rodrigues M, Silva MV, Martins GM, Costa CC, Arita DY, Perez JD, Casarini DE, Brum PC, Gouveia CH. Thyroid hormone interacts with the sympathetic nervous system to modulate bone mass and structure in young adult mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*; 2014. 15;307(4):E408-18.
- (55) Teixeira, M.B.; Martins, G.M.; Miranda-Rodrigues, M. ; De Araujo, Ferreira I.; Oliveira, R. ; Brum, P.C. Gouveia, C.H.M. . Lack of α 2C-Adrenoceptor Results in Contrasting Phenotypes of Long

Bones and Vertebra and Prevents the Thyrotoxicosis-Induced Osteopenia. *Plos One*^{JCR};2016.v. 11, p. e0146795.

(56) Martins, GM Avaliação do Efeito do Hormônio Tireoideano na Estrutura e Fisiologia Óssea de Camundongos com Inativação do Gene do Adrenoceptor $\alpha 2A$. [Tese (Mestrado em Ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012

(57) Rodrigues-Miranda M. Avaliação da Interação do Hormônio Tireoideano com o Sistema Nervoso Simpático, na Regulação do Crescimento Ósseo via Receptor Alfa 2C adrenérgico,. [Tese (Mestrado em Ciências)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

(58) Ferreira. Avaliação da Interação do Hormônio Tireoideano com o Sistema Nervoso Simpático, na Regulação do Crescimento Ósseo via Receptor Alfa 2A/C adrenérgico, [Dissertação (Graduação em ciências Biológicas)] São Paulo,Uninove; 2015.

(59) Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.*; 2004. 1;18(9):1072-87.

(60) Mugniery E¹, Dacquin R, Marty C, Benoist-Lasselin C, de Vernejoul MC, Jurdic P, Munnich A, Geoffroy V, Legeai-Mallet L. An activating Fgfr3 mutation affects trabecular bone formation via a paracrine mechanism during growth. *Hum Mol Genet.*; Jun 1;21(11):2503-13. Epub 2012. Feb 24, 2012, .

(61) Randau TM¹, Schildberg FA, Alini M, Wimmer MD, Haddouti el-M, Gravius S, Ito K, Stoddart MJ. The effect of dexamethasone and triiodothyronine on terminal differentiation of primary bovine chondrocytes and chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells.*PLoS One.*; 2013.16;8(8):e72973.

(62) Wang L¹, Shao YY, Ballock RT.J Bone Miner Res. Carboxypeptidase Z (CPZ) links thyroid hormone and Wnt signaling pathways in growth plate chondrocytes.; 2009.24(2):265-73.

(63) Stevens DA, Hasserjian RP, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res.*; 2000. 15(12):2431-42,

(64) Logan CY, Nusse R The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.*; 2004.20:781–810.

(65) Mackie AS, Liu W, Savu A, Marelli AJ, Kaul P. Infective Endocarditis Hospitalizations Before and After the 2007 American Heart Association Prophylaxis Guidelines. *Can J Cardiol.*; 2016.S0828-282X(15)01487-7.

(66) Kronenberg HM, PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci.*; 2006.1068:1-13.

(67) Lee K, Lanske B, Karaplis AC, Deeds JD, Kohno H, Nissenson RA, Kronenberg HM, Segre GV.Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. *Endocrinology*; 1996.137(11):5109-18.

- (68) Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol.*; 1995.172(1):126-38.
- (69) Koyama E, Leatherman JL, Noji S, Pacifici M. Early chick limb cartilaginous elements possess polarizing activity and express hedgehog-related morphogenetic factors. *Dev Dyn.*; 1996. Nov;207(3):344-54.
- (70) St-Jacques B¹, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.*; 1999. 15;13(16):2072-86.
- (71) Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science.*; 1996. 2;273(5275):613-22.
- (72) Stevens DA¹, Hasserjian RP, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res.*; 2000.15(12):2431-42.
- (73) Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid Hormone-Mediated Growth and Differentiation of Growth Plate Chondrocytes Involves IGF-1 Modulation of b-Catenin Signaling. *J Bone Miner Res.*; 2010.25(5):1138-46.
- (74) Hunziker EB, Wagner J, Zapf J. Differential effects of insulin-like growth factor I and growth hormone on developmental stages of rat growth plate chondrocytes in vivo. *J Clin Invest.*; 1994.93(3):1078-86.
- (75) Mushtaq T, Bijman P, Ahmed SF, Farquharson C. Insulin-like growth factor-I augments chondrocyte hypertrophy and reverses glucocorticoid-mediated growth retardation in fetal mice metatarsal cultures. *Endocrinology*; 2004.145(5):2478-86.
- (76) Abbaspour A, Takata S, Sairyo K, Katoh S, Yukata K, Yasui N. Continuous local infusion of fibroblast growth factor-2 enhances consolidation of the bone segment lengthened by distraction osteogenesis in rabbit experiment. *Bone.*; 2008 Jan;42(1):98-106.