GISELE MIYAMURA MARTINS

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

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

São Paulo
2012

GISELE MIYAMURA MARTINS

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

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

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

Versão original

São Paulo
2012

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

Martins, Gisele Miyamura.

Avaliação do efeito do hormônio tireoideano na estrutura e fisiologia óssea de camundongos com inativação do gene do adrenoceptor α_{2A} / Gisele Miyamura Martins. -- São Paulo, 2012.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Metabolismo Ósseo.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the effect of thyroid hormone on bone structure and physiology of mice with gene inactivation of the alpha α_{2A} adrenoceptor.

1. Receptor adrenérgico α_{2A} 2. Hormônio tireoideano 3. Osso
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/SBIB0206/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gisele Miyamura Martins.

Título da Dissertação: Avaliação do efeito do hormônio tireoideano na estrutura e fisiologia óssea de camundongos com inativação do gene do adrenoceptor α_{2A} .

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

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

CERTIFICADO

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

São Paulo, 13 de abril de 2010.

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

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

Dedico este trabalho com todo amor ao meu pai, Adão José Carlos Martins, e a minha mãe, Elza Miyamura Martins por me possibilitarem a realização de mais um sonho.

AGRADECIMENTOS

Obrigada ao meu pai, Adão José Carlos Martins, que tem sido um grande e maravilhoso pai, dedicando-se inteiramente à sua família, acreditando e possibilitando a realização de todos os meus sonhos e por ser a pessoa na qual me espelho para tentar ser cada dia melhor.

A minha mãe, Elza Yoshie Miyamura Martins, obrigada por todo carinho, amor e cuidado sempre a mim dedicados, pela sua grande amizade e companheirismo.

Obrigada à minha orientadora, Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira, por me receber em seu laboratório, pela amizade, confiança e ensinamentos a mim dedicados, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

Ao meu namorado, Eduardo Henrique Beber, obrigada por todo amor e carinho, por tanta ajuda e por todos os ensinamentos de Anatomia. Obrigada também pela paciência nos momentos em que precisei. Te amo.

Ao meu irmão, Leandro Miyamura Martins, pela coragem e companheirismo dedicados aos nossos pais no período em que passei a morar em São Paulo.

Aos meu queridos amigos de laboratório, Bruno José Silva de Melo e Manuela Miranda Rodrigues, obrigada pela ajuda que me proporcionaram em algum momento, pela amizade e situações engraçadas por nós vividas. À Marília Bianca Teixeira por ter sido extremamente importante para que este trabalho pudesse ser realizado. À minha querida amiga Cristiane Cabral Costa, pelos bons conselhos, amizade e ajuda pessoal nos momentos em que precisei. Agradeço especialmente ao Marcos Vinicius da Silva por tanta colaboração e pelo grande amigo com quem sempre pude contar.

À todos os meus colegas do departamento em especial à Aline Rosa Marosti Bobna, à Kelly Palombit, Ricardo Bandeira e Tabata Leal Nascimento os quais se tornaram meus grandes amigos.

Agradeço aos professores Miriam Ribeiro, Marcelo Muscará e Newton Sabino Canteras por fazerem parte da minha banca de qualificação e pela importante contribuição na execução deste trabalho.

Agradeço às professoras Patricia Brum e Maria Luiza Barreto Chaves pela colaboração e disponibilização de seu laboratório para a realização dos experimentos.

Obrigada ao professor Rodrigo Cardoso de Oliveira, pela primeira oportunidade em seu laboratório e pelos ensinamentos transmitidos na minha iniciação científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

RESUMO

MARTINS, G. M. **Avaliação do efeito do hormônio tireoideano na estrutura e fisiologia óssea de camundongos com inativação do Gene do adrenoceptor α_{2A}** . 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Um dos mais importantes achados dos últimos anos foi o de que o remodelamento ósseo está sujeito ao controle do sistema nervoso central (SNC), com o sistema nervoso simpático (SNS) agindo como efetor periférico. Uma série de estudos sugere que o SNS regula negativamente a massa óssea, agindo exclusivamente via receptor β 2-adrenérgico (β 2-AR), que é expresso no tecido ósseo. Entretanto, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que camundongos com dupla inativação dos genes dos receptores adrenérgicos α_{2A} e o α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo de alta massa óssea (AMO), apesar de apresentarem hiperatividade simpática crônica e β 2-AR intacto. Além disso, foi demonstrado que esses camundongos *knockouts* (KO = com inativação gênica) são resistentes à osteopenia induzida pelo excesso de hormônio tireoideano (HT). Esses achados sugerem fortemente que: o β 2-AR não é o único adrenoceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo; que o SNS interage com o HT para regular a massa óssea; que o α_{2A} -AR e/ou α_{2C} -AR também possam apresentar um papel importante na mediação das ações do SNS no esqueleto e que esses receptores estão envolvidos na interação do HT com o SNS para regular a massa e metabolismo ósseos. Neste projeto, tivemos os seguintes objetivos: (i) avaliar se a inativação isolada do α_{2A} -AR interfere na estrutura e fisiologia ósseas, caracterizando o fenótipo ósseo de camundongos α_{2A} -AR^{-/-}; e (ii) avaliar se a ação do HT no tecido ósseo depende do α_{2A} -AR, avaliando o efeito do HT na estrutura e fisiologia ósseas dos camundongos α_{2A} -AR^{-/-} tratados com 20 vezes a dose fisiológica de T3 (7 μ g/100 g PC/dia). Pudemos observar que o comprimento longitudinal do fêmur e tíbia dos animais α_{2A} -AR^{-/-} são significativamente menores do que aqueles dos animais selvagens, em todos os períodos estudados. A análise por microtomografia computadorizada do fêmur mostrou que não há diferença entre os animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} com relação à estrutura de osso trabecular, já com relação ao osso cortical, foi observada uma diminuição da porosidade da cortical (67%, $p < 0,05$). Com relação ao tratamento com hormônio tireoideano, observamos que os animais α_{2A} -AR^{-/-} tratados com T3 foram resistentes à diminuição do comprimento dos ossos causado pelo excesso de hormônio tireoideano. Vimos, ainda, que o osso trabecular dos animais α_{2A} -AR^{-/-} foi mais sensível aos efeitos deletério da tirotoxicose do que o dos animais selvagens. Por outro lado, o osso cortical e parâmetros biomecânicos ósseos dos animais KOs foram menos sensíveis aos efeitos deletérios da tirotoxicose. Em conclusão, os achados do presente estudo sugerem que (i) o α_{2A} -AR está envolvido no processo de crescimento longitudinal ósseo e que esse receptor possa mediar, pelo menos parcialmente, ações negativas do T3 nesse processo; e que (ii) o α_{2A} -AR está envolvido em ações predominantemente negativas do T3 no osso cortical.

Palavras-chave: Receptor adrenérgico α_{2A} . Hormônio tireoideano. Osso.

ABSTRACT

MARTINS, G. M. **Evaluation of the effect of thyroid hormone on bone structure and physiology of mice with inactivation of Gene α_2A -adrenoceptor.** 2012. 90 p. Masters thesis (Morphofunctional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

One of the most important finds of the recent years is that bone remodeling is subject to the control of the central nervous system (CNS), with the sympathetic nervous system (SNS) acting as the peripheral effector. A number of studies suggest that the SNS negatively regulates bone mass, acting exclusively via β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR), which is expressed in osteoblasts. However, a recent study of our group showed that mice with double gene inactivation of the adrenergic receptor α_{2A} and α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) have a high bone mass phenotype (HBM), even though they present a chronic SNS hyperactivity and intact β_2 -AR. Furthermore, we have demonstrated that these knockout (KO) mice are resistant to the thyroid hormone-induced osteopenia. These findings strongly suggest that: (i) β_2 -AR is not the only adrenoceptor involved in the control of bone metabolism; (ii) the CNS interacts with thyroid hormone (TH) to regulate bone mass; (iii) α_{2A} and/or α_{2C} adrenoceptors may also have an important role in mediating the actions of the CNS in the skeleton; and that (iv) these receptors are involved in the interaction of TH with the SNS to regulate bone mass and metabolism. In this project, we had the following objectives: (i) to evaluate whether the isolated inactivation of α_{2A} -AR interferes with the bone structure and physiology, characterizing the bone phenotype of α_{2A} -AR^{-/-} mice and (ii) to evaluate whether the action of HT on bone tissue depends on α_{2A} -AR, assessing the effect of HT on bone structure and physiology of α_{2A} -AR^{-/-} mice treated with 20 times the physiological dose of T3 (7g/100g BW/day). We have observed that the longitudinal length of the femur and tibia of α_{2A} -AR^{-/-} animals are significantly lower than those of wild type animals in all periods. The analysis of the femur by computed microtomography showed no difference between wild animals and α_{2A} -AR^{-/-} regarding to the trabecular bone structure, but it was observed a lower cortical porosity (67%, $p < 0.05$) in KO mice. With regard to treatment with thyroid hormone, we observed that α_{2A} -AR^{-/-} animals were resistant to the bone length decrease caused by thyroid hormone excess. We also noticed that the trabecular bone of α_{2A} -AR^{-/-} animals was more sensitive to the deleterious effects of thyrotoxicosis than wild type mice. Moreover, the cortical bone and bone biomechanical parameters KO animals were less sensitive to the deleterious effects of thyrotoxicosis. In conclusion, the findings of this study suggest that (i) α_{2A} -AR is involved in the process of longitudinal bone growth and that this receptor may be involved in the negative actions of T3 on the longitudinal bone growth, and that (ii) α_{2A} -AR is involved in predominantly negative actions of T3 in the cortical bone.

Keywords: α_{2A} adrenergic receptor. Thyroid hormone. Bone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de seleção das áreas de interesse do fêmur e vértebra.....	38
Figura 2 - Foto do osso no equipamento para a realização do teste de flexão de três pontos.....	39
Figura 3 - Massa corporal dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	41
Figura 4 - Parâmetros cardíacos dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	42
Figura 5 - Composição corporal dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Conteúdo de gordura axilar e retroperitoneal.....	43
Figura 6 - Comprimento corporal dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	44
Figura 7 - Comprimento do fêmur dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	45
Figura 8 - Comprimento da tíbia dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	45
Figura 9 - Análise por μCT da Metáfise Distal do Fêmur de Camundongos Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	46
Figura 10 - Análise por μCT do osso cortical femoral por microtomografia computadorizada em animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	47
Figura 11 - Análise do osso trabecular da vértebra L5 por microtomografia computadorizada em animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	48
Figura 12 - Análise do osso cortical da vértebra L5 por microtomografia computadorizada em animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	49
Figura 13 - Parâmetros biomecânicos determinados no fêmur de animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	50
Figura 14 - Parâmetros biomecânicos determinados na tíbia de animais Selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	51
Figura 15 - Expressão gênica dos receptores adrenérgicos no fêmur dos animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	52
Figura 16 - Expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur de animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	53
Figura 17 - Expressão gênica dos receptores de hormônio tireoideano no fêmur de animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	53
Figura 18 - Efeito do T3 na Massa corporal dos animais Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	55

Figura 19 - Efeito do T3 nos parâmetros cardíacos.....	56
Figura 20 - Efeito do T3 no conteúdo de gordura axilar (GA) e retroperitoneal (GR).....	57
Figura 21 - Efeito do T3 no Comprimento corporal.....	60
Figura 22 - Efeito do T3 no comprimento do fêmur e tíbia.....	61
Figura 23 - Análise por uCT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso trabecular femoral.....	62
Figura 24 - Análise por μ CT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso cortical da diáfise do fêmur de animais Selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-}	63
Figura 25 - Análise por μ CT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso trabecular do corpo vertebral de animais Selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-}	65
Figura 26 - Análise por μ CT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso cortical do corpo vertebral de animais Selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-}	66
Figura 27 - Efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 em parâmetros biomecânicos do fêmur de animais Selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-}	67
Figura 28 - Efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 em parâmetros biomecânicos da tíbia de animais Selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-}	68
Figura 29 - Expressão gênica dos receptores beta adrenérgicos no fêmur de animais selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-} tratados com T3.....	69
Figura 30 - Expressão gênica dos receptores alfa adrenérgicos no fêmur de animais selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-} tratados com T3.....	70
Figura 31 - Expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur de animais selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-} tratados com T3.....	71
Figura 32 - Expressão gênica do TR α e TR β no fêmur de animais selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-} tratados com T3.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais dos animais selvagens e geneticamente modificados.....	35
Tabela 2 - Massa Muscular do Extensor Longo dos Dedos, Gastrocnêmio e Reto Femoral de Animais selvagens e α_{2A} -AR ^{-/-}	44
Tabela 3 - Concentrações séricas de T3 e T4 nos animais selvagens (Selv) e α_{2A} -AR ^{-/-} tratados ou não com dose suprafisiológica de T3.....	54
Tabela 4 - Efeito de 30 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos.....	59
Tabela 5 - Efeito de 90 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	- Duas dimensões
3D	- Três dimensões
α2-AR	- Receptor Adrenérgico α 2
β1-AR	- Receptor Adrenérgico β 1
β2-AR	- Receptor Adrenérgico β 2
β3-AR	- Receptor Adrenérgico β 3
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
CO₂	- Dióxido de carbono
Ct.Th	- Espessura cortical
DA	- Grau de anisotropia
DNAc	- DNA complementar
DXA	- <i>Dual energy X-ray Absorptiometry</i>
ELD	- Músculo Extensor Longo dos Dedos
EFTP	- Ensaio de Flexão de Três Pontos
EPM	- Erro Padrão da Média
Fig.	- Figura
FGF23	- <i>Fibroblast growth factor 23</i>
GA	- Gordura Axilar
GASTRO	- Músculo Gastrocnêmio

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 O tecido ósseo.....	17
1.2 O sistema nervoso autônomo e o sistema nervoso simpático.....	19
1. 2.1 <i>O sistema nervoso autônomo.....</i>	19
1. 2.2 <i>O sistema nervoso simpático.....</i>	21
1.3 O sistema nervoso simpático e o tecido ósseo	22
1.4 Evidências de que os receptores adrenérgicos α_2 também participam da regulação da massa e metabolismo ósseos.....	24
1.5 O hormônio tireoideano (HT).....	28
1.6 Evidências de que o HT interage com o SNS via receptores adrenérgicos para regular a massa e metabolismo ósseos.....	31
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivos gerais.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Animais e tratamento.....	34
3.1.1 <i>Animais modificados geneticamente.....</i>	34
3.1.2 <i>Animais selvagens e α_{2A}-AR^{-/-} tratados com HT.....</i>	34
3.2 Sacrifício dos animais e coleta de amostras.....	35
3.3 Dosagens séricas de T3 e T4.....	36
3.4 Comprimento corporal e comprimento do fêmur e tíbia.....	36
3.5 Medida da composição corporal.....	36
3.6 Microtomografia computadorizada (μCT) em duas e três dimensões (2D e 3D).....	37
3.7 Teste biomecânico do fêmur e tíbia.....	38
3.8 Preparação para PCR em tempo real (real-time PCR).....	39
3.9 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Avaliação da inativação isolada do α_{2A}-AR na estrutura e fisiologia ósseas, caracterizando o fenótipo ósseo de camundongos	41
4.1.1 <i>Massa corporal.....</i>	41
4.1.2 <i>Parâmetros cardíacos.....</i>	41
4.1.3 <i>Massa das gorduras axilar e retroperitoneal.....</i>	42
4.1.4 <i>Massa seca, massa úmida e conteúdo de água dos músculos esqueléticos.....</i>	43
4.1.5 <i>Comprimento corporal.....</i>	44
4.1.6 <i>Comprimento do fêmur e da tíbia.....</i>	45
4.1.7 <i>Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur.....</i>	46
4.1.8 <i>Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur.....</i>	47

4.1.9 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da quinta vértebra lombar.....	48
4.1.10 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da quinta vértebra lombar.....	49
4.1.11 Teste biomecânico do fêmur e tíbia.....	50
4.1.12 Expressão gênica dos receptores adrenérgicos no fêmur.....	51
4.1.13 Expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur.....	52
4.1.14 Expressão gênica dos receptores de hormônio tireoideano no fêmur.....	53
4.2 Avaliação do efeito do HT na estrutura e fisiologia ósseas dos camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	54
4.2.1 Dosagens séricas de T3 e T4.....	54
4.2.2 Massa corporal.....	55
4.2.3 Parâmetros cardíacos.....	56
4.2.4 Massa das gorduras axilar e retroperitoneal.....	57
4.2.5 Massa seca, massa úmida e conteúdo de água dos músculos esqueléticos....	58
4.2.6 Comprimento corporal.....	60
4.2.7 Comprimento do fêmur e da tíbia.....	60
4.2.8 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur.....	62
4.2.9 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur.....	62
4.2.10 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da quinta vértebra lombar.....	64
4.2.11 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da quinta vértebra lombar.....	65
4.2.12 Teste biomecânico do fêmur e tíbia.....	67
4.2.13 Expressão gênica dos receptores adrenérgicos no fêmur dos animais tratados com hormônio tireoideano.....	69
4.2.14 Expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur dos animais tratados com hormônio tireoideano.....	70
4.2.15 Expressão gênica dos receptores de hormônio tireoideano do fêmur dos animais tratados.....	72
5 DISCUSSÃO	73
5.1 Caracterização do fenótipo ósseo de camundongos com inativação do receptor adrenérgico α_{2A}	73
5.2 Efeito do HT no esqueleto de animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	76
6 CONCLUSÕES	81
6.1 A comparação dos animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ não tratados sugere que.....	81
6.2 A comparação do efeito do tratamento com dose suprafisiológica de T3 entre animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ sugere que.....	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 O tecido ósseo

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos tecidos do corpo humano que tem como funções a proteção e sustentação de órgãos, locomoção, armazenamento de cálcio, fósforo e outros íons (BARON, 2003; GRAAF, 2003). Recentemente, descobriu-se que o tecido ósseo participa ativamente da regulação do metabolismo mineral e da glicose, através da liberação do fator de crescimento fibroblástico 23 (*fibroblast growth factor 23* – FGF-23) e da osteocalcina, respectivamente. O FGF23 é produzido por osteócitos, circula como um hormônio e age no rim estimulando a excreção urinária de fósforo (FUKUMOTO; MARTIN, 2009). A osteocalcina, sintetizada pelos osteoblastos, aumenta a síntese, secreção e sensibilidade à insulina e aumenta utilização da glicose e o gasto energético (LEE et al., 2007). Assim sendo, uma série de evidências sugerem que o tecido ósseo atua, também, como um órgão endócrino (FUKUMOTO; MARTIN, 2009).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado como cortical (ou compacto) e trabecular (ou esponjoso). O osso cortical, que representa 80% da massa esquelética, predomina nos ossos longos e tem, principalmente, função mecânica e de proteção de órgãos. Sua espessura e arquitetura variam dependendo do sítio esquelético, o que reflete o desempenho funcional do osso. O osso trabecular ou esponjoso, que corresponde a aproximadamente 20% da massa esquelética, é encontrado predominantemente no esqueleto axial e no interior dos ossos longos, dentro de suas extremidades expandidas (metáfises e epífises). O osso esponjoso dá resistência adicional aos ossos, além de acomodar a medula óssea por entre suas traves ósseas. Tanto o osso trabecular quanto o cortical formam um reservatório de cálcio e fosfato que podem ser prontamente removidos ou acrescentados por ação celular, sob controle hormonal (BARON, 2003).

Microscopicamente, como todo tecido conjuntivo, o tecido ósseo consiste de uma porção celular e de uma matriz extracelular (MEC). A MEC possui um componente orgânico (35%) e inorgânico (65%). O seu componente orgânico é formado por colágeno, proteínas não colágenas (osteonectina, osteocalcina, entre outras), mucopolissacarídeos e lipídeos. A fase inorgânica é, predominantemente, constituída por cálcio e fósforo, que são depositados como sais amorfos sobre a

MEC e, durante o processo de mineralização óssea, formam estruturas cristalinas similares aos cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. As moléculas de colágeno formam uma estrutura tridimensional, criando espaços para acomodar esses cristais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

As células ósseas representam apenas 1 a 2% do tecido ósseo. Entretanto, são responsáveis pelas funções metabólicas do osso (como, por exemplo, o remodelamento ósseo e a manutenção dos níveis circulantes de cálcio e fósforo). Basicamente, há duas linhagens de células no tecido ósseo, as células da linhagem osteoblástica e osteoclástica. As células ósseas da linhagem osteoblástica são: (a) as células osteoprogenitoras, que dão origem aos osteoblastos; (b) os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea; (c) os osteócitos, encontrados embebidos na MEC; e (d) as células de revestimento ou de superfície, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas. A outra linhagem é de células osteoclásticas, responsáveis pela reabsorção óssea (BARON, 2003).

O tecido ósseo está em constante processo de remodelamento, através da atividade finamente regulada e acoplada dos osteoclastos e osteoblastos, esse acoplamento é determinado por uma constante troca de sinais entre essas células. O remodelamento ósseo ocorre em pequenas unidades de células chamadas de unidades de remodelamento ósseo (BRUs, *bone remodeling units*), que são observadas em vários sítios das superfícies ósseas. A sequência de eventos em um sítio de remodelamento, ou seja, em uma BRU, é a ativação-reabsorção-formação. As superfícies ósseas quiescentes são recobertas por células de superfície ou de revestimento (*flat bone-lining cells*). Em resposta a um estímulo de reabsorção, as células de superfície se retraem e expõem a superfície celular; ao mesmo tempo, ocorre a diferenciação, ativação e migração dos osteoclastos aos sítios de reabsorção (superfície exposta). Os osteoclastos reabsorvem o osso velho e formam uma lacuna, chamada de lacuna de Howship. Finalmente, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam a matriz extracelular (osteóide) que, após um período de amadurecimento (aproximadamente 10 dias), será mineralizada. Ao final de cada ciclo de remodelamento, a quiescência é restaurada. O produto final do remodelamento ósseo é a manutenção da integridade óssea (GOUVEIA, 2004; MUNDY; OYAJOB, 2003). Em adultos, a reabsorção e formação óssea geralmente ocorrem de um modo balanceado, a fim de manter a massa óssea praticamente constante (BARON, 2003; MUNDY; OYAJOB, 2003). O remodelamento ósseo é

importante para o reparo dos micro- e macro-danos e para permitir a renovação contínua da matriz óssea, o que, por sua vez, garante a sua integridade (MUNDY; OYAJOB, 2003).

Uma série de fatores sistêmicos e locais são responsáveis pela regulação do processo de remodelamento. Sabe-se, atualmente, que a interação entre proteínas localizadas nas superfícies dos osteoblastos e osteoclastos é extremamente importante para a regulação local e sistêmica do remodelamento ósseo.

O ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANK-L) é um membro da superfamília dos ligantes aos fatores de necrose tumoral (TNF). O RANK-L está presente na superfície das células osteoblásticas e se liga a seu receptor o RANK (*Receptor activator of nuclear factor – kappa B*), que está presente na superfície das células precursoras dos osteoclastos e nos osteoclastos maduros. O RANK é uma proteína de membrana do tipo I, que foi originalmente clonada a partir de células dendríticas (ANDERSON et al., 1997). A ligação do RANK-L ao seu receptor específico, o RANK, promove a indução da osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos. O RANK-L também é um fator essencial para a sobrevivência e maturação dos osteoclastos (SCHNEEWEIS; WILLARD; MILLA, 2005; WADA et al., 2006).

Segundo Liu et al. (1991), a osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína solúvel, sintetizada pelos osteoblastos, que se liga ao RANK-L e, desta forma, bloqueia a ligação RANK/RANK-L. Assim sendo, a interação OPG/RANK-L limita a sobrevivência, diferenciação e atividade dos osteoclastos (SCHNEEWEIS; WILLARD; MILLA, 2005; WADA et al., 2006).

A descoberta desta interação celular entre osteoblastos e osteoclastos – via sistema RANK/RANKL/OPG - permitiu um maior entendimento dos mecanismos de regulação do remodelamento ósseo, tanto em condições fisiológicas como também em condições patológicas.

1.2 O Sistema nervoso autônomo e o sistema nervoso simpático

1.2.1 O sistema nervoso autônomo

Com base em critérios funcionais, o Sistema Nervoso pode ser dividido em *Sistema Nervoso Somático* e *Sistema Nervoso Visceral*. Como os próprios nomes

sugerem, o Somático é responsável pela vida de relação, enquanto que o Visceral controla a vida vegetativa. Ambos possuem componentes aferentes e eferentes, no entanto, diferentemente do Somático, a eferência Visceral não atinge o nível de consciência, ocorrendo de forma autônoma. Desta maneira, convencionou-se chamar essa divisão do Sistema Nervoso Visceral de *Sistema Nervoso Autônomo (SNA)* (MACHADO, 2006).

Característica marcante do SNA é a existência de dois neurônios para conectar o Sistema Nervoso Central (SNC) ao órgão efetuator. Um deles apresenta seu corpo dentro do SNC (tronco encefálico ou medula espinal), enquanto o outro tem o corpo localizado no Sistema Nervoso Periférico (SNP), em agrupamentos de corpos neuronais chamados de *gânglios*. Sendo assim, o neurônio cujo corpo está no SNC é denominado *pré-ganglionar*, e o neurônio cujo corpo está em gânglios é denominado *pós-ganglionar*. Os impulsos nervosos que seguem pelo SNA terminam em músculo estriado cardíaco, músculo liso ou glândula. Assim, o SN autônomo é involuntário (DANGELO; FATTINI, 2007)

Além das diferenças com a divisão eferente do Sistema Nervoso Somático, o próprio SNA apresenta diferenças internas, baseadas em fatores anatômicos, farmacológicos e fisiológicos de seus neurônios. Desta forma, o SNA é subdividido em partes *Simpática* e *Parassimpática* (MACHADO, 2006).

Entende-se por fatores anatômicos a localização dos corpos dos neurônios pré e pós-ganglionares, bem como o tamanho de suas fibras. A posição dos neurônios pré-ganglionares no Sistema Nervoso Simpático (SNS) é na medula torácica e lombar (entre T1 e L2), diz-se, pois, que o SNS é toraco-lombar. No Sistema Nervoso Parassimpático (SNP), elas se localizam no tronco encefálico (portanto, dentro do crânio) e na medula sacral (S2, S3 e S4). Diz-se que o SNP parassimpático é crânio-sacral. Com relação aos neurônios pós-ganglionares, no SNS, se localizam longe das vísceras e próximo da coluna vertebral, formando os gânglios paravertebrais e pré-vertebrais, já no SNP, os neurônios pós-ganglionares se localizam próximo ou dentro das vísceras (DANGELO; FATTINI, 2007; KOEPPEN; STANTON, 2009)

Os aspectos fisiológicos levam em conta as ações geradas por cada parte dessa divisão. Já os aspectos farmacológicos, dizem respeito aos tipos de neurotransmissores que são principalmente usados pelas fibras pós-ganglionares (acetilcolina ou noradrenalina). Sabemos, hoje, que a ação da fibra nervosa sobre o

efetuador (músculo ou glândula) se faz por liberação de um neurotransmissor, dos quais os mais importantes são a noradrenalina e acetilcolina. As fibras nervosas que liberam a acetilcolina são chamadas colinérgicas e as que liberam noradrenalina, adrenérgicas. Entretanto as fibras que secretam noradrenalina ativam receptores adrenérgicos e as que secretam acetilcolina ativam receptores colinérgicos (MACHADO, 2006).

Os sistemas simpático e parassimpático diferem no que se refere à disposição das fibras adrenérgicas e colinérgicas. Geralmente, as fibras pré-ganglionares, tanto simpáticas como parassimpáticas, e as fibras pós-ganglionares parassimpáticas são colinérgicas. Contudo, a grande maioria das fibras pós-ganglionares do SNS é adrenérgica. Fazem exceção as fibras que inervam as glândulas sudoríparas e os vasos dos músculos estriados esqueléticos, que apesar de serem simpáticas, são colinérgicas (DANGELO; FATTINI, 2007).

1.2.2 O sistema nervoso simpático (SNS)

Como mencionado acima, o SNS é uma subdivisão do SNA, o qual é um componente eferente do SN Visceral. A grande maioria das fibras pós-ganglionares do SNS tem a noradrenalina como neurotransmissor, e por isso, dizemos que são fibras adrenérgicas (MACHADO, 2006).

O sistema adrenérgico é um regulador essencial de funções neuronais, endócrinas, cardiovasculares, vegetativas e metabólicas. As catecolaminas endógenas, noradrenalina (produzida pelos neurônios adrenérgicos) e adrenalina (produzida pela medula das glândulas supra-renais), transmitem seus sinais biológicos via receptores acoplados à proteína G para regular uma variedade de funções celulares (HOFFMANN; LEFKOWITZ, 1996). Esses receptores são denominados receptores adrenérgicos, e é através deles que o SNS efetua suas ações sob os órgãos alvo. A maioria desses receptores está localizada na membrana plasmática de neurônios e em células alvo neuronais e não neuronais.

Os receptores adrenérgicos foram inicialmente classificados como α e β . Atualmente, sabe-se que há pelo menos nove subtipos de receptores adrenérgicos: três isoformas α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}), três isoformas α_2 (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) e três isoformas β (β_1 , β_2 e β_3) (BYLUND et al., 1994; CIVANTOS; ALEIXANDRE, 2001).

Todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos são ativados pela adrenalina e noradrenalina, entretanto, apenas os receptores α_2 atuam como autoreceptores inibitórios pré-sinápticos. Assim sendo, esses receptores modulam (inibem) a liberação de noradrenalina pelas terminações simpáticas e por neurônios adrenérgicos no SNC (BUCHELER; HADAMEK; HEIN, 2002).

Ainda não foi completamente elucidada a função fisiológica e o potencial terapêutico de cada subtipo de receptor adrenérgico, portanto mais estudos sobre a especificidade das isoformas dos receptores adrenérgicos são necessários para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na criação de drogas subtipo seletivas.

1.3 O sistema nervoso simpático e o tecido ósseo

Um dos mais importantes achados dos últimos anos foi o de que o remodelamento ósseo também está sujeito ao controle do SNC, com o SNS agindo como efector periférico (DUCY et al., 2000; TOGARI, 2002).

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-/-), enzima responsável pela síntese de catecolaminas (THOMAS; MATSUMOTO; PALMITER, 1995; THOMAS; PALMITER, 1998). Esses modelos animais, entretanto, apresentam disfunções endócrinas, incluindo hipercorticismismo, hiperinsulinemia e hipogonadismo, que podem interferir nos efeitos do SNS no osso.

Uma quantidade substancial de evidências demonstrou que o SNS regula negativamente a formação óssea e positivamente a reabsorção óssea (ELEFTERIOU et al., 2005; TAKEDA et al., 2002; TAKEUCHI et al., 2001). Assim, espera-se que a diminuição e o aumento do tônus simpático resultem, respectivamente, em alto e baixo fenótipo de massa óssea.

Uma série de estudos recentes mostra que o SNS regula o remodelamento ósseo via receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR). A presença de fibras nervosas simpáticas foi identificada no tecido ósseo e na medula óssea; além disso, β_2 -ARs foram encontrados em células osteoblásticas e osteoclásticas (BJURHOLM et al., 1988; TAKEDA et al., 2002). Foi mostrado que a administração de propranolol, um β

bloqueador específico e não seletivo, aumentou a massa óssea em roedores (TAKEDA et al., 2002), além de atenuar ou mesmo prevenir a perda de massa óssea induzida pela deficiência de estrógeno (BONNET et al., 2007; BONNET; PIERROZ; FERRARI, 2008). Inversamente, o isoproterenol, um agonista do β 2-AR, prejudicou a aquisição do pico de massa óssea e diminuiu a massa e a resistência ósseas em animais adultos (BONNET et al., 2007; BONNET et al., 2005).

Um papel mais preciso do β 2-AR na massa óssea foi substanciado 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 têm peso corporal normal, mas apresentam um fenótipo de AMO a partir dos 6 meses de idade, que ocorre devido a um aumento da formação e diminuição da reabsorção ósseas (ELEFTERIOU et al., 2005). 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 (BONNET et al., 2007; BONNET et al., 2007; PATAKI et al., 1996), clenbuterol (BONNET et al., 2005; CAVALIE et al., 2002) e formoterol (PATAKI et al., 2006) 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 dosagens (BONNET et al., 2007).

Em humanos, uma série de estudos mostrou que a administração desses β bloqueadores promove efeitos positivos (BONNET et al., 2007; SCHLIENGER et al., 2004), negativos (REJNMARK et al., 2004) ou não promovem efeitos (LEVASSEUR et al., 2005; REID et al., 2005) na densidade mineral óssea (*bone mineral density*-BMD) e/ou em fraturas ósseas. Assim, os efeitos dos β agonistas no metabolismo ósseo permanecem controversos.

1.4 Evidências de que os receptores adrenérgicos α_2 também participam da regulação da massa e metabolismo ósseos

Visando investigar o papel do SNS na massa óssea e no remodelamento, um estudo recente do nosso grupo analisou o fenótipo esquelético de um modelo de camundongo com hiperatividade simpática crônica (FONSECA et al., 2011). Esse modelo animal é baseado no duplo KO dos genes α_{2A} e α_{2C} dos receptores adrenérgicos (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) (HEIN; ALTMAN; KOBILKA, 1999).

Três subtipos de α_2 -ARs foram identificados: α_{2A} -AR, α_{2B} -AR e α_{2C} -AR (KNAUS et al., 2007; PHILIPP; HEIN, 2004). Os receptores adrenérgicos α_2 (α_2 -ARs) foram inicialmente classificados como autorreceptores inibitórios pré-sinápticos (modulam a liberação de neurotransmissores liberados pelo próprio neurônio) que regulam negativamente a liberação de catecolaminas. Estudos farmacológicos indicam que o receptor adrenérgico α_{2A} pode ser considerado o principal receptor α_2 que atua na liberação de noradrenalina (PHILIPP; HEIN, 2004). A ativação dos receptores α_2 no tronco encefálico leva a uma redução do tônus simpático, o que resulta em diminuição da frequência cardíaca e da pressão sanguínea (RUFFOLO et al., 1991; RUFFOLO; NICHOL; HIEBLE, 1991). Esses efeitos são potencializados pela estimulação dos α_2 -ARs em terminações nervosas simpáticas. Hein, Altman e Kobilka (1999) mostraram que o bloqueio simultâneo do α_{2A} - 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 idade (BRUM et al., 2002). De acordo com o esperado, observamos que os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam níveis plasmáticos elevados de noradrenalina (NE) e hipertrofia cardíaca, o que confirma a hiperatividade do SNS (FONSECA et al., 2011).

Considerando-se as evidências de que a ativação do SNS apresenta efeitos negativos na massa óssea (DUCY et al., 2000), a nossa expectativa era a de que os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentariam um esqueleto osteopênico. Surpreendentemente, vimos que esses animais apresentam um fenótipo generalizado de AMO (FONSECA et al., 2011). 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 em que os animais envelhecem. Análises histomorfométricas mostraram um aumento de

osso trabecular no corpo vertebral da quinta vértebra lombar (L5). Além disso, análises por microtomografia computadorizada (μ CT) mostraram aumento de osso trabecular, 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 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) foi significativamente elevada nos animais KOs (8-18%). Além disso, a resiliência, que reflete a habilidade do osso de sofrer deformação elástica, também apresentou-se aumentada na tíbia desses animais com relação aos animais selvagens (BRUM et al., 2002; FONSECA et al., 2011).

É possível que as melhorias na massa e função ósseas (biomecânica óssea), apresentadas pelos camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}, possam ser parcialmente explicadas pelo aumento da carga mecânica, uma vez que esses animais apresentam maior peso corporal do que os selvagens. Entretanto, alguns pontos indicam que uma maior carga mecânica não pode ser a única, ou a principal explicação do fenótipo de AMO dos KOs. Primeiro, o fenótipo de AMO foi mais evidente na coluna lombar e menos evidente na tíbia, ossos que são, respectivamente, menos e mais sujeitos ao stress mecânico dependente do peso corporal. Segundo, as diferenças de peso corporal entre os KOs e os selvagens não mudaram durante as 12 semanas de avaliação, enquanto que as diferenças da BMD aumentaram (FONSECA et al., 2011).

A respeito do maior peso corporal, é importante ser dito que os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} não são obesos. A massa gorda, determinada por DXA e pela medida dos coxins adiposos mostrou ser menor nos animais KOs. É importante considerar que a massa magra identificada por DXA é determinada pelo conteúdo de proteína, água, glicogênio e minerais que não são oriundos dos ossos (VILLICEV et al., 2007). De fato, foi detectado um aumento na massa seca de dois dos cinco músculos esqueléticos avaliados (14% no plantar e 7% no gastrocnêmio), mas foi observada diminuição da massa seca no músculo sóleo (58%) dos KOs vs. selvagens. É importante citar que o aumento da massa muscular era esperada, uma vez que estudos mostraram que agonistas dos receptores β_2 - adrenérgicos aumentam a massa muscular em humanos (MARTINEAU et al., 1992; MALTIN et al., 1993) e em roedores (BONNET et al., 2005).

É digno de nota, entretanto, que esse efeito positivo dos β agonistas não foi capaz de contrabalancear os seus efeitos negativos na massa óssea em humanos (DE VRIES et al., 2007) e em ratos (BONNET et al., 2007; BONNET et al., 2005). Assim, é improvável que o aumento na massa muscular seja o principal determinante do fenótipo de AMO dos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$, baseado na teoria da interação músculo-osso que determina que uma maior massa muscular está associada a uma maior massa óssea (FROST., 2000).

Para investigar a base do aumento na massa óssea nos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$, nosso grupo realizou histomorfometria óssea e foi avaliada a expressão de genes relacionados com a reabsorção óssea. Vimos que a taxa de formação óssea é maior e que a reabsorção óssea é menor nos $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ em comparação com os selvagens. Além disso, vimos que a redução na reabsorção óssea foi acompanhada por uma diminuição no número de osteoclastos e por uma diminuição na expressão do RNA mensageiro (RNAm) da fosfatase ácida tartrato-resistente (TRAP), que é um marcador de atividade osteoclástica (ANGEL et al., 2000). Foi detectado, ainda, que os animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam diminuição da expressão do RNAm do RANK. É bem sabido que o RANK-L, o ligante do RANK, é o principal indutor da osteoclastogênese e um importante indutor da atividade osteoclástica (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; SCHNEEWEIS; WILLARD; MILLA, 2005), uma vez que ele se liga com o RANK, o qual é expresso em precursores de osteoclastos e em osteoclastos maduros (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; WADA et al., 2006). Assim, esses dados sugerem que a elevação do tônus simpático em animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ reduz a reabsorção óssea via RANK/RANK-L. Esses achados são consistentes com o fenótipo de AMO dos $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$, mas contrasta estudos anteriores que mostram que a ativação do SNS diminui a formação óssea e aumenta a reabsorção (DUCY et al., 2000; ELEFTERIOU et al., 2005; TAKEDA et al., 2002; TAKEDA, 2005; TAKEDA; KARSENTY, 2001).

Nosso grupo também investigou se possíveis alterações na leptina sérica e/ou na expressão do RNAm do transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) no cérebro poderiam explicar o fenótipo de AMO dos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$. Essa suposição foi levantada já que há fortes evidências de que a leptina controla a reabsorção óssea indiretamente, através de, no mínimo, dois mecanismos distintos e antagônicos (ELEFTERIOU et al., 2005). Por um lado, a leptina aumenta a reabsorção óssea e inibe a formação através da ativação hipotalâmica do SNS

(DUCY et al., 2000.; ELEFTERIOU et al., 2005; SHI et al., 2008). Por outro, a leptina inibe a reabsorção óssea, induzindo a expressão cerebral de CART, um neuropeptídeo que inibe a reabsorção óssea modulando negativamente a expressão de RANK-L (ELEFTERIOU et al., 2005). É digno de nota, entretanto, que o nível sérico de leptina e a expressão cerebral de RNAm do CART foram normais nos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$. Além disso, foi medido os níveis séricos de IGF-I (*insulin growth factor-I*), já que há evidências de que eixo GH/IGF-I medeia a sinalização adrenérgica no osso (BONNET; PIERROZ; FERRARI, 2008; PIERROZ et al., 2004). Mais uma vez, não foram encontradas diferenças entre os animais KOs e os selvagens.

Considerando o inesperado fenótipo de AMO dos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ e as evidências de que os $\beta_2\text{-ARs}$ medeiam as ações osteopênicas do SNS (ELEFTERIOU et al., 2005; TAKEDA et al., 2002), foi suspeitado que a expressão do RNAm desse receptor pudesse estar regulada negativamente no osso dos animais KOs. Entretanto, vimos que o $\beta_2\text{-AR}$ é igualmente expresso em tíbias de KOs e selvagens. É importante salientar que um estudo prévio não encontrou evidência funcional de *downregulation* dos $\beta_2\text{-AR}$ nos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$, como um resultado da elevação do tônus simpático (BRUM et al., 2002).

Vale à pena mencionar que o fenótipo de AMO é ainda mais notável em animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ do que em animais com inativação do receptor β_2 adrenérgico. Enquanto o fenótipo de AMO é observado apenas quando os animais $\beta_2\text{-AR}^{-/-}$ apresentam 6 meses de idade (ELEFTERIOU et al., 2005), esse fenótipo já é notado quando animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam um mês e dez dias de idade. Além disso, o volume trabecular por volume ósseo na vértebra lombar é 80% maior em $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ vs. selvagens com quatro meses de idade, enquanto que em animais $\beta_2\text{-AR}^{-/-}$, essa diferença é de 50% vs. selvagens com seis meses de idade.

O fato de que animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam fenótipo de AMO, mesmo apresentando elevação do tônus simpático e sinalização normal do $\beta_2\text{-AR}$, levanta a hipótese de que os receptores α_{2A} - e/ou $\alpha_{2C}\text{-AR}$ também apresentam um papel na mediação, direta ou indireta, das ações do SNS no esqueleto. De fato, nosso grupo mostrou que os dois receptores são expressos no osso dos animais selvagens e nas células osteoblasto-like MC3T3-E1 (derivadas da calvária de camundongos), sendo que o RNAm do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ se mostrou mais expresso do que do $\alpha_{2C}\text{-AR}$.

Os receptores α_2 -adrenérgicos foram inicialmente caracterizados como receptores pré-sinápticos que regulam a liberação de NE (STARKE; ENDO; TAUBE, 1975). Depois, foi mostrado que esses receptores não inibem só a liberação de catecolaminas, mas que também podem regular a exocitose de um número de outros neurotransmissores no SNC e periférico (PHILIPP; BREDE; HEIN, 2002). 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 (HEIN, 2006; PHILIPP; BREDE; HEIN, 2002). Estudos adicionais serão necessários para a caracterização do papel dos subtipos de α_2 -ARs no metabolismo ósseo.

Coletivamente, os recentes achados do nosso grupo trazem novas evidências de que a regulação do metabolismo ósseo 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 intacto, sugere que o β_2 -AR não é o único adrenoreceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo. Além disso, achados do nosso grupo também levantam a hipótese de que os adrenoreceptores α_{2A} - e/ou α_{2C} também apresentam um papel importante na mediação das ações do SNS no esqueleto.

As investigações das funções específicas dos subtipos dos α_2 -ARs e suas interações no metabolismo ósseo, incluindo interações com o β_2 -AR, são importantes para a elucidação do papel do SNS no esqueleto, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da osteoporose.

1.5 O hormônio tireoideano (HT)

A glândula tireoide, localizada imediatamente abaixo da laringe e ocupando as regiões laterais e anterior da traqueia, é uma das maiores glândulas endócrinas e secreta dois hormônios principais, a *tiroxina* e a *triiodotironina*, habitualmente chamados de T4 e T3, respectivamente. Menos de 1% da produção tireoideana é representado por outras iodotironinas, o T3 reverso (rT3) e a diiodotironina (T2) (GUYTON; HALL, 2006; KRONENBERG, 2008).

As células da tireoide são típicas células glandulares secretoras de proteínas. O retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi sintetizam e secretam para os folículos uma grande glicoproteína chamada de *tireoglobulina*, sendo que cada molécula de tireoglobulina contém cerca de 70 aminoácidos tirosina, que são os principais substratos que se combinam com o iodo para formar os hormônios tireoidenos (GUYTON; HALL, 2006).

O primeiro estágio na formação dos hormônios tireoideanos é o transporte de iodeto do sangue para as células e folículos glandulares da tireoide. Primeiramente, é necessário que ocorra a conversão dos íons iodeto para uma *forma oxidada de iodo* que se liga diretamente ao aminoácido tirosina. O principal produto hormonal da reação de acoplamento é a molécula tiroxina, que permanece como parte da molécula de tireoglobulina e outra possibilidade é o acoplamento de uma molécula de moniodotirosina com uma de diiodotirosina, formando a triiodotironina. (GUYTON; HALL, 2006).

Nos mamíferos, 60-90% da produção tireoideana corresponde a tetraiodotironina (T4) e 10-40% corresponde a triiodotironina (T3). Embora a tireoide produza preferencialmente T4, há um consenso de que a maioria dos efeitos dos hormônios tireoideanos seja fruto da ligação do T3 com os seus receptores nucleares (TRs) (KRONENBERG, 2008; YEN, 2001).

A síntese e secreção dos hormônios tireoideanos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. Resumidamente, o hipotálamo produz e secreta o hormônio liberador da tireotrofina (*thyrotropin releasing hormone*-TRH) que atinge a região anterior da hipófise e estimula a produção do hormônio tireotrófico (*thyroid stimulating hormone*-TSH). O TSH age nas células foliculares tireoideanas para estimular a síntese e secreção de T4 e T3. O hormônio tireoideano age via receptor TR β no hipotálamo e na hipófise para inibir a produção e secreção de TRH e TSH, esse feedback negativo mantém a circulação de hormônios tireoideanos e TSH regulados (ABEL et al., 2001; FORREST et al., 1996; WAUNG; BASSET; WILLIAMS, 2012; WILLIAMS, 2009). Quando um indivíduo apresenta níveis aumentados de TSH e níveis diminuídos de T3 e T4, têm-se uma situação patológica denominada hipotireoidismo. Contrariamente, o hipertireoidismo se caracteriza sorologicamente por níveis aumentados de T3 e T4 e reduzidos de TSH (KRONENBERG, 2008).

A afinidade dos TRs é aproximadamente 10 vezes maior pelo T3 em relação ao T4. Por conta disso, considerando-se os efeitos genômicos dos hormônios tireoideanos, o T4 atua como um pró-hormônio, e o T3 como hormônio ativo, ligando-se aos receptores nucleares (BIANCO et al., 2002; BRENT; MOORE; LARSEN, 1991). O T4, produto secretado em maior abundância pela glândula tireóide, é convertido a T3 por ação de enzimas conhecidas como selenodesiodases das iodotironinas. A conversão do T4 a T3 ocorre na própria tireoide ou nas células de outros tecidos.

Ao contrário do que se pensava anteriormente, há evidência de que o TSH também atua diretamente em tecidos não tireoideanos, dentre esses, o tecido ósseo. O receptor de TSH (TSHR) é primariamente expresso nas células foliculares da glândula tireoide, mas também foi identificado no cérebro, rins, testículos, coração, osso, tecido adiposo, fibroblastos e em células do sistema imune, hematopoiéticas e ósseas (BELL et al., 2002; PRUMMEL et al., 2000)

O HT tem efeito no osso adulto, sendo importante para a manutenção do metabolismo ósseo, uma vez que estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea, regulando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Uma série de estudos mostram que, em condições de excesso do HT, a atividade dessas duas populações celulares está aumentada com predomínio da atividade osteoclástica. Como resultado, o metabolismo ósseo é acelerado favorecendo a reabsorção óssea, balanço negativo do cálcio e perda de massa óssea (MELSEN; MOSEKILDE, 1977).

É importante dizer que os efeitos osteopênicos do excesso de HT foram primeiramente descritas há mais de um século atrás (VON RECKLINGHAUSEN, 1891) e que, a tireotoxicose evidente é considerada uma das causas da osteoporose secundária (FALLON et al., 1983; FRASER et al., 1971). Assim sendo, o entendimento dos mecanismos através dos quais os HTs levam à perda de massa óssea devem contribuir para o entendimento da fisiopatologia da osteoporose.

Embora a importância dos HTs no desenvolvimento e metabolismo ósseos seja clara, pouco se sabe a respeito dos mecanismos que medeiam os seus efeitos no tecido ósseo, sendo necessários estudos para um melhor entendimento destes processos.

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

O hormônio tireoideano é essencial para o desenvolvimento, crescimento e metabolismo ósseos. O T3 estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea através da regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos (Kragstrup; Melsen; Mosekilde, 1981; Mosekilde; Melsen, 1978). 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.

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 (Oppenheimer et al., 1991). Estudos anteriores mostraram que pacientes com hipertireoidismo apresentam tônus simpático elevado (Pijl et al., 2001). Considerando que o excesso de HT causa perda de massa óssea e que a ativação do SNS também apresenta efeito negativo na massa óssea, nosso grupo levantou a hipótese de que o HT também interage com o SNS para regular o metabolismo ósseo e, conseqüentemente, a massa óssea.

Uma evidência dessa possível interação é o fato de que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol (um antagonista β -adrenérgico) corrige secundariamente a hipercalcemia (Rude et al., 1976). Além disso, pacientes com hipotireoidismo tratados com propranolol apresentam redução da excreção de hidroxiprolina pela urina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea (Beylot et al., 1982).

Para investigar essa hipótese, camundongos fêmeas selvagens e α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} de 40 dias de idade foram tratados com aproximadamente 10 vezes a dose fisiológica de T3 ($10 \times T3 = 3,5 \mu\text{g}/100 \text{ g PC}/\text{dia}$) durante 80 dias ou permaneceram sem tratamento (WT e KO controles) (Fonseca, 2009). Como esperado, os animais selvagens tratados com T3 apresentaram diminuição na BMD 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 BMD, ou seja, são resistentes à osteopenia induzida pelo T3.

Foi observado, ainda, que os adrenocetores α_{2A} e α_{2C} (α_{2A} -AR e α_{2C} -AR) são expressos na tíbia de camundongos selvagens e em células MC3T3-E1. Mais importante ainda foi o fato observar que o T3 inibe a expressão do α_{2C} -AR no osso de camundongos. Também observamos que o T3 reduziu significativamente a expressão da OPG, uma proteína que limita a atividade osteoclástica, nos animais selvagens, mas não nos animais KOs.

Assim sendo, os nossos estudos sugerem que os receptores adrenérgicos α_{2A} e ou α_{2C} apresentam um papel importante na fisiologia óssea e que o SNS interage com o HT através desses receptores para regular a massa óssea. Entretanto, para confirmar essas hipóteses, se faz necessário caracterizar o fenótipo ósseo e estudar o efeito do HT em camundongos com inativação individual do α_{2A} -AR e α_{2C} -AR.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- 1- Avaliar se a inativação isolada do α_{2A} -AR interfere na estrutura e fisiologia ósseas;
- 2- Avaliar se o α_{2A} -AR medeia ações do hormônio tireoideano na estrutura e fisiologia ósseas.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Caracterizar o fenótipo ósseo de camundongos α_{2A} -AR^{-/-}, avaliando:
 - a estrutura do osso trabecular e cortical, por microtomografia computadorizada;
 - parâmetros biomecânicos, pelo teste de flexão de três pontos;
 - o metabolismo ósseo, através da análise da expressão de genes relacionados à fisiologia óssea.
- 2- Analisar o efeito do tratamento com dose suprafisiológica de hormônio tireoideano no esqueleto de camundongos selvagens (C57BL/6J) e com inativação isolada do α_{2A} -AR (α_{2A} -AR^{-/-}), nos seguintes parâmetros:
 - na estrutura do osso trabecular e cortical, por microtomografia computadorizada;
 - em parâmetros biomecânicos, pelo teste de flexão de três pontos;
 - no metabolismo ósseo, através da análise da expressão de genes relacionados à fisiologia óssea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento

Todos os protocolos aplicados ao uso e manuseio de animais estão de acordo com os termos estabelecidos pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (autorização nº 35, fls. 85, livro 02).

3.1.1 Animais modificados geneticamente

Foram estudados camundongos fêmeas selvagens (C57BL/6J) e animais α_{2A} -AR^{-/-}, com 30 dias de idade. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas sob o ciclo/escuro de 12h/12h, com acesso à água e a ração *ad libitum*.

Os animais α_{2A} -AR^{-/-}, com *background* C57BL/6J, foram produzidos por Hein, Altman e Kobilka. (1999) e trazidos ao Brasil pela Prof^a Dr^a Patrícia C. Brum, da Escola de Educação Física e Esporte da USP, com quem estabelecemos colaboração para a realização deste estudo.

3.1.2 Animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} tratados com HT

Os animais receberam dose suprafisiológica de T3 (Sigma-Aldrich, Germany), equivalente a 20 vezes a dose fisiológica ($20 \times T3 = 7 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ peso corporal/dia). O T3 foi administrada uma vez ao dia, intraperitonealmente, a partir dos 30 dias de idade, por 30 ou 90 dias. Todos os animais foram pesados uma vez por semana para acompanhamento da variação da massa corporal ao longo do período experimental e para o ajuste das doses de T3 a serem administradas. Os animais foram divididos em 4 grupos, os quais estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Grupos experimentais dos animais selvagens e geneticamente modificados.

Idade ao sacrifício (dias)	30	60	120
Grupos			
Selv	n=6	n=6	n=6
Selv+T3		n=6 tt=30 dias	n=6 tt=90 dias
$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	n=6	n=6	n=6
$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3		n=6 tt=30 dias	n=6 tt=90 dias

Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 20 x 0,7 ug/100 g PC/dia). Selv=selvagem. n refere-se ao número de animais a ser sacrificado e tt, ao tempo de tratamento com T3 no momento do sacrifício.

3.2 Sacrifício dos animais e coleta de amostras

Os camundongos foram sacrificados por exposição a dióxido de carbono (CO₂) e, em seguida, o sangue foi coletado por punção cardíaca com seringa e agulha heparinizadas com 10 µl de heparina (liquemine 25.000 µl/5ml). Parte do volume do sangue coletado foi imediatamente centrifugada a 3000 rpm à 4 °C, por 10 minutos, para obtenção do plasma, que, em seguida, foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C, para posterior dosagem de noradrenalina (NE). Para obtenção de soro, a outra parte do volume do sangue coletado foi incubada a 37 °C, por 10 minutos, e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente (TA). O soro foi isolado e imediatamente congelado para posterior análise de T3 e T4.

Os fêmures foram coletados e dissecados rapidamente sobre uma superfície resfriada (0-4 °C). Em seguida foram congelados em nitrogênio líquido, e armazenados em freezer -80 °C. O coração, as gorduras axilar (GA), retroperitoneal (GR), os músculos extensor longo dos dedos (ELD), gastrocnêmio (GASTRO) e o reto femoral (RF) foram coletados e congelados para posterior análise. A quarta vértebra lombar (L4) e a tíbia esquerda foram coletadas, dissecadas, armazenadas em álcool 70%, e posteriormente armazenadas em temperatura entre 0-4 °C. O

fêmur direito, tíbia direita e a quinta vértebra lombar (L5) foram coletados, dissecados e armazenados em solução salina 0,9% , e em seguida, congelados.

As carcaças foram congeladas para posterior análise.

3.3 Dosagens séricas de T3 e T4

As dosagens séricas de T3 e T4 foram realizadas por radioimunoensaio no laboratório RDO Diagnósticos Médicos. Os resultados foram expressos em microgramas de T3 e T4 por decilitro de soro (mcg/Dl).

3.4 Comprimento corporal e comprimento do fêmur e tíbia

Após o sacrifício, o comprimento corporal foi aferido em centímetros (cm), pela medida da distância entre a ponta do focinho até a base da cauda. Mediu-se, também, o comprimento do fêmur e tíbia direitos com um paquímetro eletrônico digital (Vonder).

3.5 Medida da composição corporal

A medida da composição corporal foi realizada através da aferição da massa úmida dos conteúdos de GR e GA e da aferição da massa úmida e seca dos seguintes músculos esqueléticos: RF, GASTRO e ELD. Foi, também, realizada a medida da massa úmida e seca do coração, para avaliação de hipertrofia cardíaca. Para tanto, após o sacrifício dos animais, a GR, GA, os músculos esqueléticos e o coração foram retirados dos animais e, logo em seguida, pesados em balança analítica de precisão (Denver Instrument M-220D), para aferição de massa úmida. As amostras foram, em seguida, colocadas em estufa a 60 °C, por 48 horas. Após esse período, os músculos foram pesados novamente para a aferição de massa seca. O conteúdo de água foi calculado a partir da diferença entre a massa úmida e a massa seca. As massas do RF foram divididas pelo comprimento, em centímetros, do fêmur (CF) e as massas do GASTRO e ELD foram divididas pelo comprimento da tíbia (CT) e, portanto, expressas como $\text{g/mm} \cdot \text{CF} \times 100$ e $\text{g/mm} \cdot \text{CT} \times 100$, respectivamente. As massas das gorduras axilar e retroperitoneal e do coração

foram divididas pela massa em gramas do animal, sendo expressas como $\text{g/g} \cdot \text{PC} \times 100$.

3.6 Microtomografia computadorizada (μCT) em duas e três dimensões (2D e 3D)

O fêmur direito e a L5 foram dissecados e mantidos em salina -20°C até o momento das análises. Parâmetros em 2D e 3D dos ossos foram obtidos através de um Microtomógrafo Skyscan 1172 (Desktop X-ray microtomograph), e analisados com o auxílio do programa CT-Analyser (versão 1.10, Skyscan, Artselaar, Bélgica). A região de interesse (*region of interest*-ROI) dos fêmures foi padronizada com base no comprimento do osso. Para a análise de osso trabecular, inicialmente, o comprimento total de cada fêmur foi dividido em quatro partes iguais. Em seguida, o comprimento do quarto distal foi dividido por 1.5, onde a parte proximal desta divisão foi selecionada para análise (ROI). Este procedimento foi adotado a fim de excluir a lâmina epifisial das análises (Fig. 1A)

Os parâmetros trabeculares analisados foram: volume trabecular (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (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), o grau de anisotropia (DA) e a densidade mineral óssea (BMD).

O Tb.Pf reflete a conectividade trabecular, sendo que baixos índices, indicam melhor conectividade da estrutura trabecular (HAHN et al., 1992).

O SMI indica a prevalência de trabéculas ósseas em forma de “rods” (cilíndricas) e “plates” (achatadas, em forma de placas). Este parâmetro é de suma importância na análise da estrutura trabecular, uma vez que a deterioração do osso trabecular, em função do envelhecimento ou doença, é caracterizada pela conversão de trabéculas achatadas para cilíndricas. Assim sendo, o predomínio de trabéculas cilíndricas resulta em um maior valor de SMI e em trabéculas menos resistentes ao *stress* mecânico (HILDEBRAND; RUEGSEGG, 1997).

O DA é a medida da simetria em 3 dimensões e reflete a orientação das trabéculas ósseas. No caso do osso, que é um material não contínuo, repleto de estruturas (trabéculas) orientadas em diferentes direções, a mensuração do DA

reflete a capacidade de reagir diferentemente a cargas vindas de sentidos diferentes. Quanto menos simétrico o objeto, maior o DA. Com relação ao osso, quanto maior o DA, maior será o número de trabéculas orientadas em diferentes direções e, portanto, melhor será a sua resposta a diferentes vetores de forças mecânicas.

Para a análise do osso cortical, parâmetros em 2D do fêmur foram obtidos e analisados conforme descrito anteriormente. Primeiramente o osso foi dividido em metades proximal e distal, em seguida, a metade distal foi subdividida em quatro partes iguais. Por fim, o segundo quarto proximal foi selecionado para análise (ROI) (Fig 1B).

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

Figura 1 - Esquema de seleção das áreas de interesse do fêmur (quadrado) e vértebra.

A. Osso trabecular. **B.** Osso cortical. **C.** Osso trabecular e cortical.

3.7 Teste biomecânico do fêmur e tíbia

Os fêmures e as tíbias direitos foram dissecados e mantidos em salina a 20°C até o momento das análises. Parâmetros biomecânicos do fêmur e da tíbia dos animais controles e tratados com T3 foram obtidos pelo Ensaio de Flexão de Três Pontos (EFTP), realizado em um sistema para teste de materiais Instron, modelo 3344 (Instron Corporation, MA, USA). Durante o ensaio, as extremidades dos

fêmures e tíbias eram apoiadas em dois roletes, posicionados sobre um suporte, sendo a distância entre os apoios variadas, conforme o tamanho dos ossos (consequência das diferentes idades). Uma força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso no ponto médio entre os dois apoios, no sentido ântero-posterior no fêmur e no sentido látero-medial na tíbia, por uma haste cilíndrica a uma velocidade constante de 05 cm/min até o momento de ruptura do osso (Fig. 2).

Figura 2 – Foto do osso no equipamento para a realização do teste de flexão de três pontos.

A força aplicada e o deslocamento da haste cilíndrica foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento (Bluehill lite, versão 2.25). Foram avaliados os seguintes parâmetros biomecânicos: Carga máxima (em N), que corresponde à maior força aplicada durante o ensaio (força máxima à qual o osso é capaz de resistir); módulo elástico (N/mm), que corresponde à rigidez óssea e a tenacidade (J), que é a capacidade do osso de resistir a uma fratura.

3.8 Preparação para PCR em tempo real (Real-Time PCR)

O fêmur esquerdo dos animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ controles e tratados com T3 foram dissecados rapidamente sobre uma superfície resfriada (0-4 °C), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. Os ossos foram pulverizados, na presença de nitrogênio líquido, em um mortário e pistilo de aço (Fisher Scientific International, Inc, Hampton, NH, USA) previamente resfriado em gelo seco. Ao “pó” de osso, foi adicionado Trizol. A mistura de pó de osso mais

Trizol foi homogeneizada com um polytron PT10-35 (Brinkmann Instruments, Inc, NY, USA).

O RNA total do fêmur 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 (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 da transcriptase reversa a 95 °C por 5 min no termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). 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 20 µl, com 450 nM de primers e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A beta actina foi selecionada 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 $\Delta\Delta C_t$ como previamente descrito por Livak (1997).

3.9 Análise estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos grupos para qualquer parâmetro foi testada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós teste de Tukey ou Bonferroni. 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 e para a construção de gráficos foi utilizado o *software* Prism (ambos provenientes da GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da inativação isolada do α_{2A} -ar na estrutura e fisiologia ósseas, caracterizando o fenótipo ósseo de camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$

4.1.1 Massa corporal

A Fig. 3 mostra que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam massa corporal significativamente menor (entre 9% a 14%) do que os animais selvagens, a partir dos 65 até os 121 dias de idade.

Figura 3 - Massa corporal dos animais Selvagens (Selv.) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$

A medida da massa corporal foi iniciada quando os animais tinham 30 dias de idade, sendo pesados semanalmente. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-7$ por grupo). $p>0,05$, $^{xx}p<0,01$ e $^{xxx}p<0,001$.

4.1.2 Parâmetros cardíacos

Não houve diferença significativa na massa úmida e seca e no conteúdo de água do coração, entre os animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 60 e 120 dias de idade. Entretanto, aos 30 dias de idade a massa úmida foi 19% ($p<0,05$) maior nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ (Fig. 4).

Figura 4 - Parâmetros cardíacos dos animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

(A) Massa úmida, (B) massa seca e (C) conteúdo de água do coração em animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-} de 30, 60 e 120 dias de idade. Os parâmetros são expressos em g de coração/g de peso corporal x 100. O conteúdo de água é expresso em ul/g de peso corporal. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-7 por grupo). $p>0,05$ e $^x p<0,05$.

4.1.3 Massa das gorduras axilar e retroperitoneal

Observamos que a gordura retroperitoneal nos animais α_{2A} -AR^{-/-} se mostrou reduzida em 25% ($p<0,05$) quando comparadas aos animais selvagens apenas aos 60 dias de idade (Fig. 5).

Figura 5 - Composição corporal dos animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}. Conteúdo de gordura axilar e retroperitoneal.

Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-7 por grupo). Os pesos da gordura retroperitoneal e axilar referem-se ao peso úmido e são expressos em g de gordura/g de peso corporal x 100. $p > 0,05$ e $^x p < 0,05$.

4.1.4 Massa seca, massa úmida e conteúdo de água dos músculos esqueléticos.

Para melhor avaliarmos a composição corporal dos animais α_{2A} -AR^{-/-}, verificamos a massa úmida e massa seca e o conteúdo de água da musculatura esquelética dos animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-}.

Na Tabela 2, podemos observar que não houve diferença significativa entre os animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} quanto à massa muscular, seca e úmida e o conteúdo de água do ELD (extensor longo dos dedos) e gastrocnêmio aos 30, 60 e 120 dias de idade. No reto femoral, a massa úmida e massa seca e conteúdo de água foram 13% ($p < 0,05$), 12% ($p < 0,01$) e 18% ($p < 0,01$) menores, respectivamente, nos animais α_{2A} -AR^{-/-} em relação aos animais selvagens, mas apenas aos 60 dias de idade.

Tabela 2 - Massa Muscular do Extensor Longo dos Dedos, Gastrocnêmio e Reto. Femoral de Animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-}.

Idade		30 dias		60 Dias		120 Dias	
		Selv	α_{2A} -AR ^{-/-}	Selv	α_{2A} -AR ^{-/-}	Selv	α_{2A} -AR ^{-/-}
ELD	MS	0,01±0,0008	0,01±0,001	0,01±0,0008	0,01±0,0003	0,01±0,001	0,01±0,0008
	MU	0,02±0,04	0,01±0,001	0,029±0,002	0,028±0,002	0,03±0,003	0,02±0,001
	cH₂O	0,009±0,001	0,009±0,001	0,02±0,001	0,01±0,003	0,01±0,001	0,009±0,001
Gastro	MS	0,11±0,01	0,08±0,009	0,16±0,003	0,16±0,01	0,16±0,003	0,15±0,004
	MU	0,34±0,008	0,29±0,03	0,56±0,02	0,54±0,03	0,56±0,02	0,53±0,02
	cH₂O	0,24±0,01	0,24±0,02	0,34±0,01	0,34±0,01	0,3±0,007	0,3±0,012
Reto	MS	0,07±0,008	0,07±0,01	0,09±0,002	0,08±0,002*	0,10±0,003	0,10±0,002
	UM	0,24±0,02	0,25±0,03	0,33±0,008	0,29±0,01**	0,38±0,02	0,36±0,005
	cH₂O	0,11±0,007	0,14±0,01	0,17±0,003	0,15±0,004**	0,18±0,013	0,17±0,003

ELD = extensor longo dos dedos, Gastro = gastrocnêmio, Reto = reto femoral, MS = massa seca, MU= massa úmida. A MS e MU do Gastro e ELD foi expressa em g/comprimento da tíbia em mm x 100. A MS e MU do Reto foi expressa em g/comprimento do fêmur em mm x 100, cH₂O = conteúdo de água (ul/g.PC). p>0,05, *p<0,05 e **p<0,01.

4.1.5 Comprimento corporal

A Fig. 4 mostra que não há diferença significativa entre o comprimento corporal dos animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} em todas as idades estudadas.

Figura 6 - Comprimento corporal dos animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

O comprimento corporal refere-se à medida linear desde o focinho até a base da cauda do animal. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=5- 7 por grupo). p>0,05.

4.1.6 Comprimento do fêmur e da tíbia

A Fig. 7 mostra que o comprimento do fêmur dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ é menor do que o dos animais selvagens durante todo o período estudado. Aos 30, 60 e 120 dias de idade, o comprimento do fêmur dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ se mostrou 14% ($p<0,01$), 7% ($p<0,001$) e 9% ($p<0,001$) menor, respectivamente, do que o dos animais selvagens.

Figura 7 – Comprimento do fêmur dos animais Selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

O Comprimento foi medido através de um paquímetro. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4- 7 por grupo). $p>0,05$, $^{xx}p<0,01$ e $^{xxx}p<0,001$.

O comprimento da tíbia dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ também se mostrou menor do que o dos animais selvagens aos 60 e 120 dias de idade (Fig 8), 4 ($p<0,05$) e 5% ($p<0,001$), respectivamente, em relação aos animais selvagens.

Figura 8 – Comprimento da tíbia dos animais Selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

O comprimento foi medido através de um paquímetro. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-7 por grupo). $p>0,05$, $^{xx}p<0,01$ e $^{xxx}p<0,001$.

4.1.7 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur

Através da microtomografia computadorizada em 3 dimensões da metáfise distal do fêmur, observamos que não houve diferença significativa entre os animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, em todas as idades avaliadas (30, 60 e 120 dias), em nenhum dos parâmetros ósseos analisados.

Figura 9 – Análise por μCT da Metáfise Distal do Fêmur de Camundongos Selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

A análise foi feita da metáfise distal do fêmur de camundongos fêmeas de 30, 60 e 120 dias de idade. (A) BV/TV = volume ósseo/volume trabecular. (B) Tb.Th= espessura trabecular. (C) Tb.Sp= separação entre as trabéculas. (D) Tb.N= número de trabéculas (E) TB/PF= Fator de padrão do osso trabecular. (F) SMI= Índice de modelo estrutural. (G) DA= Grau de Anisotropia. (H) Porosidade. (I) BMD= Densidade Mineral Óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-7 por grupo). As comparações estatísticas foram feitas entre animais Selvagens (Selv) vs. $\alpha_{2A}\text{-AR}$ controles. $p > 0,05$.

4.1.8 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur

Através da microtomografia em 2 dimensões da diáfise do fêmur, observamos diferenças significativas apenas aos 30 dias de idade, sendo a área medular, o perímetro do endóstio e a porosidade da cortical nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ foram 43% ($p<0,001$), 49% ($p<0,05$) e 67% ($p<0,05$) menores, respectivamente, em relação aos animais selvagens (Fig. 10).

Figura 10 – Análise por μCT do osso cortical femoral em animais Selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

A análise foi feita na diáfise do fêmur de camundongos fêmeas de 30, 60 e 120 dias de idade. (A) Área Perióstica. (B) Perímetro do Perióstio. (C) Área da Cortical. (D) Área medular. (E) Perímetro do endóstio. (F) Espessura da Cortical. (G) Porosidade da Cortical. (H) Densidade Mineral Óssea. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=4-7$ por grupo). $p>0,05$, * $p<0,05$ e *** $p<0,001$.

4.1.9 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da quinta vértebra lombar

Através da microtomografia em 3 dimensões, observamos maior número de trabéculas (41%, $p < 0,01$) aos 30 dias de idade, como também maior BMD (148%, $p < 0,001$) aos 60 dias de idade e uma menor (14%, $p < 0,05$) separação trabecular aos 60 dias de idade nos animais KOs quando comparados aos animais selvagens. Não foram observadas diferenças significativas em outros parâmetros trabeculares analisados tanto aos 30, como 60 e 120 dias de idade (Fig. 11).

Figura 11 - Análise do osso trabecular da vértebra L5 por microtomografia computadorizada em animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

A análise foi feita no corpo vertebral de L5 de camundongos fêmeas de 30, 60 e 120 dias de idade. (A) BV/TV = volume ósseo/volume trabecular. (B) Tb.Th= espessura trabecular. (C) Tb.Sp= separação entre as trabéculas. (D) Tb.N= número de trabéculas (E) TB/PF= Fator de padrão do osso trabecular. (F) SMI= Índice de modelo estrutural. (G) DA= Grau de Anisotropia. (H) Porosidade. (I) BMD= Densidade Mineral Óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-7 por grupo). As comparações estatísticas foram feitas entre animais Selvagens (Selv) vs. α_{2A} -AR^{-/-} controles. $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.1.10 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da quinta vértebra lombar

Através da microtomografia computadorizada em 2D do osso cortical da quinta vértebra lombar, observamos que não houve diferença significativa entre os animais KOs e selvagens em nenhuma das idades estudadas (Fig. 12)

Figura 12 – Análise do osso cortical da vértebra L5 por microtomografia computadorizada em animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

A análise foi feita no corpo vertebral de L5 de camundongos fêmeas de 30, 60 e 120 dias de idade. (A) Área Perióstica. (B) Perímetro do Perióstio. (C) Área da Cortical. (D) Área Medular. (E) Perímetro do Perióstio. (F) Espessura da Cortical. (G) Porosidade da Cortical. (H) Densidade Mineral Óssea. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=4-7 por grupo). p>0,05

4.1.11 Teste biomecânico do fêmur e tíbia

Não observamos diferenças significativas nos parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais KOs quando comparados aos animais selvagens em nenhuma das idades avaliadas (Fig. 13).

Figura 13 – Parâmetros biomecânicos determinados no fêmur de animais Selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-}.

Parâmetros obtidos através do teste de flexão de três pontos. A análise foi feita em camundongos fêmeas de 30, 60 e 120 dias de idade **(A)** Carga máxima. **(B)** Modo elástico. **(C)** Tenacidade óssea. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-7 por grupo). $p>0,05$.

A avaliação dos mesmos parâmetros biomecânicos na tíbia evidenciou diferenças significativas entre os animais KOs e selvagens controles, sendo observada uma menor carga máxima (19%, $p<0,05$), como também modo elástico (17%, $p<0,01$), nos animais KOs aos 120 dias de idade (Fig. 14).

Figura 14 – Parâmetros biomecânicos determinados na tíbia de animais Selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-}.

Parâmetros obtidos através do teste de flexão de três pontos. A análise foi feita em camundongos fêmeas de 30, 60 e 120 dias de idade **(A)** Carga máxima. **(B)** Modo elástico. **(C)** Tenacidade óssea. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=4-7 por grupo). p>0,05, *p<0,05 e **p<0,01.

4.1.12 Expressão gênica dos receptores adrenérgicos no fêmur

Não foram encontradas diferenças significativas na expressão do RNAm dos receptores adrenérgicos β_1 , β_2 , β_3 , α_2B e α_2C entre os animais α_{2A} -AR^{-/-} quando comparados aos animais selvagens aos 120 dias de idade (Fig. 15).

Figura 15 – Expressão gênica dos receptores adrenérgicos no fêmur dos animais selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-} (KO).

O fêmur total de animais de 120 dias de idade foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. (A) Expressão gênica dos receptores β_1 -AR. (B). Expressão gênica dos receptores β_2 -AR. (C) Expressão gênica dos receptores β_3 -AR. (D) Expressão gênica dos receptores α_{2B} -AR e (E) Expressão gênica dos receptores α_{2C} -AR. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4 por grupo).

4.1.13 Expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur

Com relação à expressão dos genes relacionados ao metabolismo ósseo, RANK, RANKL, OPG e TRAP, no fêmur, não foram observadas diferenças significativas entre os animais α_{2A} -AR^{-/-} e os animais selvagens de 120 dias de idade (Fig. 16).

Figura 16 – Expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur de animais selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-} (KO).

O fêmur total de animais de 120 dias de idade foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. (A) Expressão gênica do RANK. (B) Expressão gênica do RANK-L. (C) Expressão gênica do OPG. (D) Expressão gênica do TRAP. Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4 por grupo).

4.1.14 Expressão gênica dos receptores de hormônio tireoideano no fêmur

Também não foram observadas diferenças significativas entre os animais α_{2A} -AR^{-/-} e os animais selvagens de 120 dias de idade (Fig. 17), com relação à expressão dos genes dos receptores de hormônio tireoideano TR α e TR β no fêmur.

Figura 17 – Expressão gênica dos receptores de hormônio tireoideano no fêmur de animais selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-} (KO).

Expressão de genes dos receptores de hormônio tireoideano no fêmur de animais selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-} (KO). O fêmur total de animais de 120 dias de idade foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. (A) Expressão gênica do receptor TR α . (B) Expressão gênica do receptor TR β . Os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4 por grupo).

4.2 Avaliação do efeito do HT na estrutura e fisiologia ósseas dos camundongos $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$

4.2.1 Dosagens séricas de T3 e T4

A Tabela 2 mostra que, como esperado, a concentração sérica de T3 foi significativamente maior (7 a 10 vezes) nos animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 por 30 e 90 dias, quando comparados aos seus respectivos controles (animais não tratados). Por outro lado, as concentrações de T4 foram significativamente menores (54 a 63%) nos animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 em relação aos seus controles, o que reflete a inibição da síntese e secreção de TSH promovida pelo excesso de T3 (WILLIAN., 1989). Não observamos diferenças significativas entre os animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 por 30 dias de tratamento, porém, aos 90 dias de tratamento, foi observada uma diminuição de T3 nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados quando comparados aos animais selvagens tratados com T3 (10%, $p < 0,001$). Já com relação ao T4 não houve diferença significativa entre esses grupos.

Tabela 3 - Concentrações séricas de T3 e T4 nos animais selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados ou não com dose suprafisiológica de T3.

60 dias de idade ao sacrifício/30 dias de tratamento				
	Selv	Selv+T3	$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3
T3	410±24	3632±337 ^(***)	534±72	4500±817 ^(XXX)
T4	7,3±0,5	3,8±0,2	9,7±1,1	4,4±0,9 ^(XX)
120 dias de idade ao sacrifício/90 dias de tratamento				
T3	384±25	3992±607 ^(***)	510±78	3630±701 ^(XXX) (+++)
T4	6,1±0,6	5,1±0,9	9,4±1,0	3,4±0,03 ^(XXX)

Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 20 x 0,7 ug/100 g PC/dia) por 30 ou 90 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=4-5 por grupo). Os resultados foram expressos em Microgramas de T3 e T4 por Decilitro de soro (mcg/Dl). As comparações estatísticas foram feitas por ANOVA seguido do pós teste Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ Selv vs. Selv+T3; ^x $p < 0,05$, ^{xx} $p < 0,01$ e ^{xxx} $p < 0,001$ $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ vs $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3; ⁺ $p < 0,05$, ⁺⁺ $p < 0,01$ e ⁺⁺⁺ $p < 0,001$ Selv+T3 vs. $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3.

4.2.2 Massa corporal

A Fig. 18 mostra que os animais selvagens tratados com T3 apresentaram massa corporal significativamente menor do que os animais selvagens controles, a partir da quinta semana de tratamento, até o final do experimento. Por outro lado, os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 apresentaram aumento de massa corporal na décima primeira semana de tratamento (9%, $p<0,01$) quando comparados aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ controles.

Figura 18 – Efeito do T3 na Massa corporal dos animais Selvagens (Selv) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$

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

4.2.3 Parâmetros cardíacos

A Fig. 19 mostra que o tratamento com dose suprafisiológica de T3 promoveu hipertrofia cardíaca, evidenciada pelo aumento da massa seca do coração, tanto nos animais Selv e KOs. A massa úmida e seca e conteúdo de água do coração dos animais Selv+T3 de 60 dias de idade (30 dias de tratamento) foram 27%, 29 % e 30% ($p<0,001$) maiores em relação aos animais Selv não tratados (Fig 19 A, C e E). Após 90 dias de tratamento, a massa úmida e seca e o conteúdo de água do coração dos animais Selv+T3 foram 20%, 27% e 17% ($p<0,001$) maiores em relação aos animais Selv não tratados (Fig 19 A, C e E). Nos animais α_{2A} -AR^{-/-}+T3, tratados por 30 dias, observou-se aumento de 16% na massa seca, úmida e no conteúdo de água do coração em relação aos animais não tratados com T3. Nos animais α_{2A} -AR^{-/-}+T3 tratados por 90 dias, observou-se aumento de 27% ($p<0,001$) na massa seca do coração em relação aos animais não tratados com T3.

Figura 19 - Efeito do T3 nos parâmetros cardíacos.

(A, C e E) Animais selvagens e (B, D e F) α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 30 ou 90 dias. Os parâmetros são expressos em g de coração/g de peso corporal x 100. O conteúdo de água é expresso em ul/g de peso corporal. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5- 9 por grupo). $p>0,05$, $\Delta\Delta\Delta$ $p<0,001$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$.

4.2.4 Massa das gorduras axilar e retroperitoneal

Não houve diferença significativa no conteúdo de gordura axilar entre os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}+\text{T3}$ tratados por 30 e 90 dias, como também não houve diferença significativa entre os animais Selv e Selv+T3 tratados por 30 dias (Fig.20 A e B). Entretanto, o T3 causou diminuição de 33% no conteúdo de gordura axilar nos animais Selv tratados por 90 dias (Fig. 20 A).

O tratamento com T3 causou diminuição importante de gordura retroperitoneal nos animais Selv, mas não nos animais KOs (Fig. 20D). A gordura retroperitoneal dos animais Selv+T3 foi significativamente menor após 30 dias (66%, $p<0,001$) e 90 dias (62%, $p<0,001$) de tratamento (Fig. 20 C). Já nos animais KOs não foi observada diferença significativa. (Fig. 20 D).

Figura 20 – Efeito do T3 no conteúdo de gordura axilar (GA) e retroperitoneal (GR).

(A e C) Animais selvagens e (B e D) $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}+\text{T3}$) por 30 ou 90 dias. Os pesos de (A e B) GA e (C e D) GR referem-se ao peso úmido e são expressos em g de gordura/g de peso corporal x 100. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5- 9 por grupo). $p>0,05$, $\Delta\Delta$ $p<0,01$, $\Delta\Delta\Delta$ e $p<0,001$.

4.2.5 Massa seca, massa úmida e conteúdo de água dos músculos esqueléticos

Na tabela 4 e 5, podemos observar que o tratamento com dose suprafisiológica de T3 por 30 e 90 dias não afetou a massa do ELD tanto nos animais Selv como KOs. Nota-se, apenas, uma redução de 30% ($p<0.05$) no conteúdo de água do ELD dos animais Selv+T3 aos 30 dias de tratamento e um aumento de 50% ($p<0.05$) aos 90 dias de tratamento. Observa-se, nas tabelas 4 e 5, que não houve alteração na massa muscular e conteúdo de água no músculo reto femoral dos animais Selv como nos KOs. O gastrocnêmio, entretanto, se mostrou sensível ao tratamento de 30 e 90 dias com T3 nos animais Selv. Nos animais Selv+T3, observou-se, aos 30 dias de tratamento, uma diminuição na massa úmida (16%, $p<0,001$), massa seca (18%, $p<0,001$) e no conteúdo de água (16%, $p<0,01$) (Tabela 3), em relação aos animais selvagens não tratados. Já os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3 apresentaram diminuição de 18% ($p<0,05$) no conteúdo de água do gastrocnêmio, não sendo observada nenhuma diferença significativa na massa úmida e massa seca desse músculo aos 30 dias de tratamento (Tabela 4). Aos 90 dias de tratamento, observou-se que o Gastrocnêmio foi sensível ao tratamento com T3 apenas nos animais Selv, que apresentaram uma diminuição de 14% ($p<0,01$) na massa úmida e 18% ($p<0,001$) na massa seca, em relação aos animais selvagens não tratados. Nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, não observamos diferenças na massa muscular desse músculo.

Tabela 4 - Efeito de 30 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos.

		Selv.	Selv (T3)	$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ (T3)
ELD	MS	0,011±0,0008	0,010±0,001	0,011±0,0003	0,009±0,005
	MU	0,029±0,002	0,024±0,008	0,028±0,002	0,26±0,004
	cH₂O	0,02±0,001	0,01±0,001***	0,01±0,002	0,01±0,002
Gastro	MS	0,16±0,003	0,13±0,003***	0,16±0,01	0,13±0,004
	MU	0,56±0,01	0,47±0,01**	0,54±0,03	0,49±0,04
	cH₂O	0,34±0,01	0,28±0,007**	0,34±0,01	0,28±0,01 ^x
Reto	MS	0,09±0,02	0,10±0,005	0,08±0,002	0,08±0,04
	MU	0,33±0,008	0,35±0,02	0,29±0,01	0,31±0,01
	cH₂O	0,17±0,003	0,17±0,009	0,15±0,004	0,15±0,01

Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 20 x 0,7 ug/100 g PC/dia) por 30 ou 90 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. Efeito do tratamento com T3 nos músculos esqueléticos. ELD = extensor longo dos dedos, Gastro = gastrocnêmio, Reto = reto femoral, MS = massa seca, MU= massa úmida. A MS e MU do Gastro e ELD foi expressa em g/comprimento da tíbia em mm x 100. A MS e MU do Reto foi expressa em g/comprimento do fêmur em mm x 100, cH₂O = conteúdo de água (ul/g.PC). Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=5-9 por grupo). As comparações estatísticas foram feitas entre animais Selv vs. Selv+T3 (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001) e entre animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ vs. $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3 (^xP<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001).

Tabela 5 - Efeito de 90 dias de tratamento com T3 em músculos esqueléticos.

		Selv.	Selv (T3)	$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$	$\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ (T3)
ELD	MS	0,01±0,001	0,01±0,001	0,01±0,0008	0,01±0,0004
	MU	0,03±0,003	0,03±0,002	0,02±0,001	0,02±0,001
	cH₂O	0,012±0,001	0,018±0,001*	0,009±0,001	0,01±0,0008
Gastro	MS	0,16±0,003	0,13±0,003***	0,15±0,004	0,14±0,004
	MU	0,56±0,01	0,48±0,1**	0,53±0,02	0,50±0,01
	cH₂O	0,3±0,007	0,28±0,0008	0,3±0,01	0,28±0,01
Reto	MS	0,10±0,003	0,1±0,03	0,10±0,002	0,07±0,08
	MU	0,38±0,01	0,35±0,07	0,36±0,005	0,25±0,02
	cH₂O	0,18±0,01	0,17±0,009	0,17±0,003	0,11±0,02

Os animais foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (~20 x a dose fisiológica de T3 = 20 x 0,7 ug/100 g PC/dia) por 30 ou 90 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. Efeito do tratamento com T3 nos músculos esqueléticos. ELD = extensor longo dos dedos, Gastro = gastrocnêmio, Reto = reto femoral, MS = massa seca, MU= massa úmida. A MS e MU do Gastro e ELD foi expressa em g/comprimento da tíbia em mm x 100. A MS e MU do Reto foi expressa em g/comprimento do fêmur em mm x 100, cH₂O = conteúdo de água (ul/g.PC). Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=5-9 por grupo). As comparações estatísticas foram feitas entre animais Selv vs. Selv+T3 (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001) e entre animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ vs. $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3 (^xP<0,05, ^{xx}p<0,01 e ^{xxx}p<0,001).

4.2.6 Comprimento corporal

A Fig. 21 mostra que o tratamento com dose suprafisiológica de T3 praticamente não alterou o comprimento corporal dos animais selvagens e KOs. Entretanto, nota-se que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 por 30 dias, apresentaram um aumento significativo de 4% ($p < 0,01$) do comprimento corporal com relação aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ não tratados.

Figura 21 – Efeito do T3 no Comprimento corporal.

Animais selvagens e (B) $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3) por 30 ou 90 dias. O comprimento corporal refere-se à medida linear desde o focinho até a base da cauda do animal. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-9$ por grupo). $p > 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.2.7 Comprimento do fêmur e da tíbia

A Fig. 22 mostra que o tratamento com dose suprafisiológica de T3 prejudicou o crescimento longitudinal do fêmur nos animais Selv, mas não nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. O comprimento do fêmur dos animais Selv tratados com T3 por 30 e 90 dias foi 3% ($p < 0,05$) e 6% ($p < 0,001$) menor, respectivamente, em relação aos animais Selv não tratados (Fig. 22A). Não observamos diferenças significativas no crescimento da tíbia tanto nos animais selvagens como nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3.

Figura 22 – Efeito do T3 no comprimento do fêmur e tíbia.

(A e C) Animais selvagens e (B e D) α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 30 ou 90 dias. (A e B) O comprimento do fêmur e (C e D) tíbia foram medidos com um paquímetro digital. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5- 9 por grupo). $p>0,05$, Δ $p<0,05$ e $\Delta\Delta\Delta$ $p<0,001$.

4.2.8 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da metáfise distal do fêmur

Através da microtomografia em 3 dimensões, observamos que o tratamento com dose suprafisiológica de T3 por 30 dias não afetou o osso trabecular da metáfise distal do fêmur nos animais selvagens. Por outro lado, os animais α_{2A} -AR^{-/-} foram sensíveis ao tratamento. Os animais α_{2A} -AR^{-/-}+T3 apresentaram maior Tb.Sp (54%, $p<0,05$) e menor BMD (75%, $p<0,05$) e Tb.N (55%, $p<0,05$) em relação aos animais α_{2A} -AR^{-/-} não tratados (Fig. 23).

Noventa dias de tratamento com dose suprafisiológica de T3 afetou de forma importante o osso trabecular da metáfise distal do fêmur, tanto nos animais Selv como α_{2A} -AR^{-/-}. Observamos, nos animais Selv+T3, uma diminuição de 78% ($p<0,001$) no BV/TV e de 76% ($p<0,001$) no Tb.N e um aumento de 55% ($p<0,01$) no Tb.Sp, de 116% ($p<0,01$) no Tb.Pf (Fig. 23) e de 8% ($p<0,001$) na Po[tot] (Fig. 23) em relação aos animais Selv não tratados. Nos animais α_{2A} -AR^{-/-}+T3, observamos uma diminuição de 72% ($p<0,001$) no BV/TV, de 73% ($p<0,01$) no Tb.N e de 73% ($p<0,01$) no BMD e um aumento de 59% ($p<0,05$) no Tb.Sp, de 105% ($p<0,001$) no Tb.Pf, de 26%

($p < 0,001$) no SMI, e de 6% ($p < 0,001$) na Po[tot], em relação aos animais KOs não tratados (Fig. 23).

Figura 23 – Análise por uCT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso trabecular femoral.

Animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-} + \text{T3}$) por 30 ou 90 dias. (A e B) BV/TV = volume ósseo/volume trabecular; (C e D) Tb.Th= espessura trabecular; (E e F) Tb.Sp= separação entre as trabéculas; (G e H) Tb.N= número de trabéculas; (I e J) Tb.Pf= fator de padrão de osso trabecular; (K e L) SMI= índice de modulo estrutural; (M e N) DA= grau de anisotropia; (O e P) Po (tot)= porosidade total; (Q e R) BMD= densidade mineral óssea. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-9$ por grupo). As comparações estatísticas foram feitas entre animais Selv vs. Selv+T3 e entre animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ vs. $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-} + \text{T3}$. $p > 0,05$, $\Delta\Delta$ $p < 0,01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0,001$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2.9 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da diáfise do fêmur

Através da microtomografia computadorizada em 2D da diáfise do fêmur, observamos que o osso cortical praticamente não foi afetado pelo tratamento de 30

dias com dose suprafisiológica de T3, tanto nos animais selvagens como KOs (Fig. 24). Observamos, apenas, uma diminuição de 70% ($p<0,01$) na porosidade da cortical aos 30 dias de tratamento nos animais KOs+T3 em relação ao seu respectivo controle (Fig. 24). Por outro lado, o osso cortical dos animais Selv foi afetado por 90 dias de tratamento com T3. Os animais Selv+T3 apresentaram maior perímetro do perioste = T.Pm (6%, $p<0,01$) e menor espessura da cortical = Ct.th (15%, $p<0,001$), em relação aos animais Selv não tratados. Nos animais α_{2A} -AR^{-/-} tratados com T3 por 90 dias, foi observada uma diminuição da BMD (10%, $p<0,05$), T.Ar e B.Ar quando comparados aos animais α_{2A} -AR^{-/-} não tratados. (Fig. 24).

Figura 24 – Análise por μ CT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso cortical da diáfise do fêmur de animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

Animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 30 ou 90 dias. (A e B) T.Ar (área periosteal), (C e D) T.Pm (perímetro do periosteum), (E e F) B.Ar (área da cortical), (G e H) T.Ar-B.Ar (área medular), (I e J) B.Pm-T.Pm (perímetro do endosteum), (K e L) Ct.Th (espessura da cortical), (M e N) Po (porosidade total) e (O e P), BMD (densidade mineral óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-9$ por grupo). $p>0,05$, Δ $p<0,01$, $\Delta\Delta$ $p>0,05$, $\Delta\Delta\Delta$ $p<0,001$ e * $p<0,05$.

4.2.10 Microtomografia computadorizada em 3D: análise do osso trabecular da quinta vértebra lombar

Através da microtomografia em 3D, observamos que, aos 30 dias de tratamento com dose suprafisiológica de T3, alguns parâmetros do osso trabecular da quinta vértebra lombar (L5) dos animais selvagens foram afetados. Observamos uma diminuição da espessura trabecular (8%, $p<0,05$) e do índice de modelo estrutural (13%, $p<0,05$) dos animais selvagens tratados com T3 quando comparados aos animais selvagens não tratados. Observamos que, aos 30 dias de tratamento, os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ foram mais sensíveis ao tratamento com hormônio tireoideano do que os animais selvagens. Os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 apresentaram uma diminuição do volume trabecular (7%, $p<0,05$) e do número de trabéculas (23%, $p<0,01$), e um aumento da separação trabecular (22%, $p<0,01$) e porosidade total do osso trabecular (3%, $p<0,05$), em relação aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ não tratados (Fig. 25).

Noventa dias de tratamento com dose suprafisiológica de T3 afetou de forma importante o osso trabecular da vértebra dos animais selvagens, sendo observada uma diminuição do volume trabecular (36%, $p<0,001$), do número trabecular (34%, $p<0,001$) como também da densidade mineral óssea (90%, $p<0,001$) e foi observado um aumento da porosidade total (3%, $p<0,001$) nos animais selvagens tratados com T3 quando comparados aos animais selvagens não tratados (Fig. 25). Nos animais KOs, 90 dias de tratamento com T3 resultaram em aumento do Tb.Sp (17%, $p>0,01$) e diminuição do BMD (60%, $p<0,01$) e Tb.N (23%, $p>0,05$).

Figura 25 – Análise por μ CT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso trabecular do corpo vertebral de animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

Animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 30 ou 90 dias. (A e B) BV/TV = volume ósseo/volume trabecular, (C e D) Tb.Th= espessura trabecular, (E e F) Tb.Sp= separação entre as trabéculas; (G e H) Tb.N= número de trabéculas (I e J) Tb.Pf= fator de padrão de osso trabecular; (K e L) SMI= índice de modulo estrutural; (M e N) DA= grau de anisotropia (O e P) Po (tot)= porosidade total; (Q e R) BMD= densidade mineral óssea. Animais de 30 dias de idade foram tratados com dose suprafisiológica de T3 (7 μ g/100 g PC/dia) por 30 e 90 dias, através de injeções intraperitoneais diárias. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=6-9 por grupo). As comparações estatísticas foram feitas entre animais Selv vs. Selv+T3 e entre animais α_{2A} -AR^{-/-} vs. α_{2A} -AR^{-/-}+T3. $p>0,05$, Δ $p<0,05$, $\Delta\Delta\Delta$ $p<0,001$. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

4.2.11 Microtomografia computadorizada em 2D: análise do osso cortical da quinta vértebra lombar

Através da microtomografia computadorizada em 2D da cortical da quinta vértebra lombar, observamos que o osso cortical dos animais selvagens foi afetado pelo tratamento de 30 dias com dose suprafisiológica de T3, sendo observada uma diminuição de 41% ($p<0,001$) na área medular como também no perímetro do

endósteo (46%, $p < 0,001$) dos animais tratados com T3 em relação aos animais não tratados. T3. Noventa dias de tratamento com T3 também afetaram o osso cortical de L5 dos animais selvagens, sendo observada uma diminuição de 7% ($p < 0,05$) no perímetro do periosteio, no perímetro da cortical (8%, $p < 0,01$), na área medular (49%, $p < 0,001$) e no perímetro do endósteo (44%, $p < 0,001$). O osso cortical dos animais KOs não foi afetado por 30 dias de tratamento com T3, mais foi afetado por 90 dias de tratamento, quando observamos uma diminuição de 15% ($p < 0,001$) na BMD dos animais KOs tratados com T3 quando comparados aos animais KOs não tratados (Fig. 26).

Figura 26 – Análise por μ CT do efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 no osso cortical do corpo vertebral de animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

Animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 30 ou 90 dias. (A e B) T.Ar (área periosteal), (C e D) T.Pm (perímetro do periosteio), (E e F) B.Ar (área da cortical), (G e H) T.Ar-B.Ar (área medular), (I e J) B.Pm-T.Pm (perímetro do endósteo), (K e L) Ct.Th (espessura da cortical), (M e N) Po (porosidade total), (O e P) BMD (densidade mineral óssea). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=5-9 por grupo). $p > 0,05$, Δ $p < 0,05$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2.12 Teste biomecânico do fêmur e tibia

Através da análise dos parâmetros biomecânicos do fêmur, pudemos observar que os animais Selv foram mais sensíveis aos efeitos deletérios do T3 do que os animais KOs (Fig. 27 A, C e E). Não houve diferença significativa entre os animais tratados por trinta dias tanto Selv como os KOs. Noventa dias de tratamento com dose suprafisiológica de T3 causaram redução de 11% ($p<0,01$), 25% ($p<0,01$) e 55% ($p<0,05$) na carga máxima, modulo elástico e tenacidade, respectivamente, do fêmur de camundongos Selv, enquanto o fêmur de camundongos KOs foi afetado somente no parâmetro de modo elástico, onde observamos uma diminuição de 22% ($p<0,05$) nos animais KOs tratados com T3 quando comparados aos animais não tratados (Fig. 27 B, D e F).

Figura 27 – Efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 em parâmetros biomecânicos do fêmur de animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

(A,C,E) Animais selvagens e (B,D,F) α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 30 ou 90 dias. (A e B) Carga máxima, (C e D) Módulo elástico, (E e F) Tenacidade, (G e H). Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=5-9 por grupo). $p>0,05$, Δ $p<0,05$, $\Delta\Delta$ $p<0,01$ e * $p<0,05$.

Com relação aos parâmetros biomecânicos, a tíbia dos animais Selv também se mostrou mais sensível aos efeitos deletérios do excesso de hormônio tireoideano do que a tíbia dos animais KOs (Fig. 28). Além disso, a tíbia se mostrou mais sensível do que o fêmur a esses efeitos negativos. Trinta dias de tratamento com T3 causaram uma redução de 22% ($p<0,01$) e 16% ($p<0,01$) na carga máxima e módulo elástico, respectivamente, dos animais Selv, enquanto causaram apenas redução na tenacidade (46%, $p<0,05$) dos animais KOs. Noventa dias de tratamento causaram redução no módulo elástico (14%, $p<0,01$) e tenacidade (45%, $p<0,05$) nos animais Selv, enquanto que nos animais KOs não houve diferença significativa (Fig. 28).

Figura 28 – Efeito de 30 e 90 dias de tratamento com T3 em parâmetros biomecânicos da tíbia de animais Selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-}.

(A,C,E) Animais selvagens e (B,D,F) α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 30 ou 90 dias. (A e B) Carga máxima, (C e D) Módulo elástico, (E e F) Tenacidade, (G e H). Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM ($n=5-9$ por grupo). $p>0,05$, Δ $p<0,05$, $\Delta\Delta$ $p<0,01$ e * $p<0,05$.

4.2.13 Expressão gênica dos receptores adrenérgicos no fêmur dos animais tratados com hormônio tireoideano

O tratamento com T3 não alterou a expressão gênica dos receptores adrenérgicos $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$, tanto nos animais selvagens quanto KOs (Fig. 29 e 30).

Figura 29 – Expressão gênica dos receptores β adrenérgicos no fêmur de animais selvagens (Selv.) e $\alpha 2A$ -AR^{-/-} (KO) tratados com T3.

(A, C e E) Animais selvagens e (B, D e F) $\alpha 2A$ -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv.+T3 e $\alpha 2A$ -AR^{-/-}+T3) por 90 dias. O fêmur total de animais de 120 dias de idade foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4 por grupo).

Figura 30 – Expressão gênica dos receptores α adrenérgicos no fêmur de animais selvagens (Selv.) e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ (KO) tratados com T3.

(A, C e E) Animais selvagens e (B, D e F) $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-} + \text{T3}$) por 90 dias. O fêmur total de animais de 120 dias de idade foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4 por grupo).

4.2.14 Expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur dos animais tratados com hormônio tireoideano

O tratamento com T3 praticamente não alterou a expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo, o RANKL, OPG e TRAP, tanto nos animais selvagens quanto nos KOs. Foi observado, somente, um aumento significativo de 182% ($p < 0,05$) na expressão gênica do RANK nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 quando comparados aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ não tratados (Fig. 31 B).

Figura 31 - Expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur de animais selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-} (KO) tratados com T3.

(A, C, E e G) Animais selvagens e (B, D, F e H) α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 90 dias. O fêmur total de animais de 120 dias de idade foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média ± EPM (n=3-4 por grupo). *p<0,05.

4.2.15 Expressão gênica dos receptores de hormônio tireoideano do fêmur dos animais tratados

O tratamento com T3 não alterou a expressão gênica do TR α e TR β no fêmur dos animais selvagens e α_{2A} -AR^{-/-} (Fig. 32).

Figura 32 - Expressão gênica do TR α e TR β no fêmur de animais selvagens (Selv.) e α_{2A} -AR^{-/-} (KO) tratados com T3.

(A e C) Animais selvagens e (B e D) α_{2A} -AR^{-/-} de 30 dias de idade foram tratados diariamente com dose suprafisiológica de T3 (Selv+T3 e α_{2A} -AR^{-/-}+T3) por 90 dias. O fêmur total de animais de 120 dias de idade foi coletado imediatamente após o sacrifício dos camundongos, o RNA foi extraído e a expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos como média $\pm$ EPM (n=3-4 por grupo).

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do fenótipo ósseo de camundongos com inativação do receptor adrenérgico α_{2A}

Os receptores α_2 -adrenérgicos são conhecidos por possuírem um importante papel na autoregulação da liberação de neurotransmissores em nervos simpáticos e neurônios adrenérgicos no SNC (MILLER, 1998). Porém, as funções individuais de cada um dos subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) nesse processo ainda não foram totalmente elucidadas. Apesar de todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos poderem ser ativados pela adrenalina e noradrenalina, apenas os subtipo α_2 parecem estar ligados à inibição pré-sináptica de catecolaminas (BYLUND et al., 1994). Além deste papel modulador dos adrenoceptores α_2 na liberação de catecolaminas nas membranas pré-sinápticas, há evidências de ações destes receptores também nas membranas pós-sinápticas, onde atuam em uma série de outros processos fisiológicos, como a função cardiovascular, metabolismo lipídico, analgesia, modulação da liberação de noradrenalina entre outros (LINK et al., 1995).

Somando-se a isso, estudos do nosso laboratório têm sugerido um papel desses receptores α_2 adrenérgicos no controle do remodelamento ósseo. Um trabalho recente do nosso grupo (FONSECA et al., 2011) mostrou que animais com duplo KO dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo generalizado de alta massa óssea, o que sugere que as isoformas α_2 AR também possam mediar a sinalização do SNS no esqueleto e que os receptores β_2 -adrenérgicos não são os únicos adrenoceptores envolvidos no controle do remodelamento ósseo.

Nesse sentido, o presente estudo analisou animais com deleção individual do receptor adrenérgico α_{2A} , com o intuito de investigar o papel desse receptor na regulação da estrutura e metabolismo ósseos. Para tanto, foi feita a caracterização esquelética de camundongos fêmeas selvagens (Selv) e α_{2A} -AR^{-/-} entre 30 e 120 dias de idade. Considerando-se que a composição corporal pode afetar a massa e estrutura ósseas (CRABTREE et al., 2004), inicialmente, caracterizamos parâmetros antropométricos dos animais KO, como massa corporal, massa de

músculos esqueléticos e de coxins adiposos e o comprimento corporal e do fêmur e tíbia.

Os animais $\alpha_{2A} \text{AR}^{-/-}$ apresentaram massa corporal significativamente menor do que os animais Selv. Por outro lado, os animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam massa corporal maior do que os animais Selv (FONSECA et al., 2011). Essa discrepância entre os animais $\alpha_{2A} \text{AR}^{-/-}$ e $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ sugere uma interação entre os adrenorreceptores α_{2A} e α_{2C} para regular a massa corporal.

Assim como os animais duplo KOs ($\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$), os camundongos $\alpha_{2A}\text{AR}^{-/-}$ não apresentaram diferenças no comprimento corporal. Inesperadamente, observamos que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam menor comprimento da tíbia e do fêmur em relação aos Selv, o que provavelmente contribuiu para a menor massa corporal desses animais. Por outro lado, os animais duplo KOs ($\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$) apresentam maior comprimento femoral (FONSECA et al., 2011). Esses achados sugerem uma complexa interação desses receptores também na regulação do crescimento ósseo longitudinal. Vale ser dito que foi detectado, por imunohistoquímica, a presença de $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e $\alpha_{2C}\text{-AR}$ nos condrócitos das lâminas epifisiais de camundongos, mais especificamente na zona de reserva e pré-hipertrófica (FONSECA et al., 2011), o que sugere uma participação desses receptores nos processos epifisários que determinam o crescimento longitudinal ósseo.

Com relação à composição corporal, observamos valores levemente menores de massa muscular e adiposa branca nos animais KOs em relação aos selvagens, o que, provavelmente, contribui, juntamente com o menor comprimento do fêmur e tíbia, para a reduzida massa corporal dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ em relação aos selvagens. Vale ser dito que o menor conteúdo de tecido adiposo branco observado nos animais KOs corrobora estudos que mostram a ação anti-lipolítica dos receptores alfa adrenérgicos (GESTA et al., 2001; LAFONTAN; BERLAN, 1995). Assim, é provável que os animais KOs tenham a sua função anti-lipolítica reduzida, facilitando, portanto, a ação dos $\beta\text{-AR}$ em desencadear a lipólise.

Diferentemente do que foi encontrado em animais duplo KOs ($\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$), os camundongos com inativação isolada do α_{2A} praticamente não apresentaram hipertrofia cardíaca. Esses achados corroboram os estudos de Hein, Altman e Kobilka (1999), que também não encontraram alteração na massa do coração de animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ e $\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$. É importante ser dito que a hipertrofia cardíaca

observada nos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ é uma consequência do aumento do tônus simpático, que, por sua vez, não é observado nos animais com deleção de apenas um dos autorreceptores inibitórios pré-sinápticos alfa adrenérgicos, o α_{2A} - ou $\alpha_{2C}\text{-AR}$ (HEIN; ALTMAN; KOBILKA, 1999)

Após essas análises para determinação da composição corporal, realizamos o ensaio por microtomografia computadorizada, para verificação da estrutura óssea trabecular da metáfise distal do fêmur e do corpo vertebral de L5 de animais Selv e KOs. Não encontramos diferenças em nenhum dos parâmetros trabeculares ósseos analisados entre os animais Selv e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ aos 30 60 e 120 dias de idade no fêmur dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Por outro lado, observamos, em um outro estudo do nosso laboratório, do qual sou colaboradora, que camundongos com inativação isolada do receptor adrenérgico α_{2C} apresentam menor volume de osso trabecular (BV/TV) no fêmur, diferentemente do que foi encontrado nos animais duplo KOs, que mostraram um fenótipo generalizado de alta massa óssea (FONSECA et al., 2011). Esses achados mostram que as deleções isoladas dos receptores adrenérgicos $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e do $\alpha_{2C}\text{-AR}$, causam efeitos bastante diferentes, muitas vezes contrários aos da falta simultânea do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e do $\alpha_{2C}\text{-AR}$.

Foi interessante observar alguns efeitos positivos da deleção do receptor adrenérgico α_{2A} no osso trabecular, mas não no osso cortical, do corpo da quinta vértebra lombar (L5). Vimos que os animais $\alpha_{2A}\text{AR}^{-/-}$ apresentam um maior Tb.N aos 30 dias de idade, uma diminuição da Tb.Sp como também um aumento da BMD aos 60 dias de idade. Esses resultados corroboram o trabalho de Fonseca et al. (2011), onde animais duplo KOs apresentaram aumento da BMD e de Tb.N no corpo vertebral de L5. Esse efeito positivo da deleção isolada do $\alpha_{2A}\text{AR}^{-/-}$ na massa óssea trabecular vertebral não foi observada no osso trabecular femoral, entretanto, observou-se uma menor Po do osso cortical do fêmur (67%, $p<0,05$) nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o que vai de encontro ao fenótipo de alta massa óssea observada nos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ (FONSECA et al., 2011). Esses achados sugerem que os receptores adrenérgicos α_{2A} participam, pelo menos parcialmente, da determinação da massa óssea trabecular vertebral e cortical femoral e que o SNS atua de forma diferenciada nos diferentes sítios do esqueleto.

Vale ser dito que a diminuição da área medular (43%, $p<0,01$) e do perímetro do endóstio (49%, $p<0,01$), observadas no fêmur dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ em relação

aos animais selvagens, provavelmente se explicada pelo menor tamanho do fêmur dos animais KOs.

Os testes biomecânicos possibilitam a investigação funcional de um segmento ósseo, uma vez que permitem medidas diretas da capacidade de um determinado osso de resistir ao stress mecânico. Com relação aos parâmetros biomecânicos dos ossos dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros analisados do fêmur em nenhuma das idades estudadas, já com relação a tibia, foram observadas diminuição da carga máxima e da rigidez óssea aos 120 dias de idade, ao contrário do que foi observado nas tíbias dos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ (FONSECA et al., 2011).

A análise da expressão gênica no fêmur por PCR em tempo real demonstrou não haver diferenças significativas entre os animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, quanto à expressão dos receptores adrenérgicos β_1 , β_2 , β_3 , α_2B e α_2C e quanto à expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo, tais como o RANK, RANKL, OPG e TRAP.

Podemos concluir, de uma forma geral, que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam uma massa corporal significativamente menor quando comparados aos animais selvagens, que pode ser parcialmente explicada pela menor massa muscular e adiposa branca, como também pelo menor comprimento dos ossos longos. Os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ praticamente não apresentaram hipertrofia cardíaca como também não apresentaram alterações no osso trabecular femoral, no entanto, foi interessante observar alguns efeitos positivos da deleção do receptor adrenérgico α_{2A} no osso cortical femoral como, por exemplo, a diminuição da Po , como também efeitos positivos no osso trabecular mas não no osso cortical, do corpo da quinta vértebra lombar (L5) dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Foram observadas alterações negativas nos parâmetros biomecânicos nas tíbias dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ quando comparadas aos animais selvagens. Além disso, a análise da expressão gênica no fêmur por PCR em tempo real demonstrou não haver diferenças significativas entre os animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$.

5.2 Efeito do HT no esqueleto de animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$

O hormônio tireoideano é essencial para o desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos normais. Tanto a deficiência quanto o excesso desse hormônio

resultam em efeitos importantes no esqueleto. Uma das características proeminentes do hormônio tireoideano, mas ainda pouco entendida, é sua interação com o Sistema Nervoso Simpático. Algumas evidências dessa interação são o aumento do tônus simpático em pacientes com hipertireoidismo (PIJL et al., 2001) e a constatação de que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol reduz a excreção urinária de hidroxiprolina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea (BEYLOT et al., 1982). Em um estudo recente do nosso laboratório, vimos que os camundongos $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ são resistentes à osteopenia induzida pelo excesso de hormônio tireoideano. Além disso, detectamos a expressão gênica e protéica dos adrenoreceptores α_{2A} e α_{2C} ($\alpha_{2A}\text{-AR}$ e $\alpha_{2C}\text{-AR}$) no tecido ósseo de camundongos selvagens e em células osteoblásticas MC3T3-E1 (FONSECA et al., 2011).

No presente estudo, um importante objetivo foi o de avaliar se o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ medeia ações do hormônio tireoideano no esqueleto. Para tanto, tratamos camundongos selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ de 30 dias de idade, com dose suprafisiológica de T3 por 30 ou 90 dias, e avaliamos o impacto desse tratamento na composição corporal e em parâmetros estruturais e funcionais dos ossos.

Como esperado, os animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com 20 vezes a dose fisiológica de T3 apresentaram níveis séricos elevados desse hormônio e uma conseqüente queda dos níveis séricos de T4 (Tabela 2), o que reflete a inibição da síntese e secreção de TSH promovida pelo excesso de T3 (WILLIAM, 1989).

O tratamento com T3 também promoveu outros efeitos característicos do excesso de hormônio tireoideano. Um desses efeitos é a hipertrofia cardíaca (LIBERTI; BARRETO-CHAVES, 2005; SANFORD; GRIFFIN; WILDENTHAL, 1978), que foi observada tanto nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ quanto nos selvagens. Na musculatura esquelética, podemos observar que os efeitos da tireotoxicose foram compatíveis com aqueles descritos na literatura (WHITE et al., 2001). O hormônio tireoideano reduziu a massa do músculo gastrocnêmio nos animais selvagens tanto após 30 dias como após 90 dias de tratamento, já nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ não foram observadas diferenças na massa muscular. Com relação ao tecido adiposo branco, os efeitos do tratamento com dose suprafisiológica de T3 nos animais selvagens também estão de acordo com dados da literatura (LEE et al., 2009). O T3 reduziu o conteúdo de gordura retroperitoneal nos animais selvagens, tanto após 30 como 90 dias de tratamento e reduziu o conteúdo de gordura axilar após 90 dias de

tratamento, entretanto, nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o T3 não causou alterações significativas tanto na gordura retroperitoneal como na axilar. Todos esses dados confirmam que a administração de T3 foi eficaz no sentido de promover tireotoxicose nos grupos estudados. Por outro lado, a menor sensibilidade dos animais KOs quanto aos efeitos do excesso de T3 no músculo esquelético e tecido adiposo branco, sugerem que o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ possa participar das suas ações catabólicas naqueles tecidos.

Um outro efeito característico do excesso de hormônio tireoideano, a perda de massa corporal (ABID; BILLINGTON; NUTTALL, 1999; MORETTO et al., 2012), foi observado apenas nos animais selvagens, o que pode ser explicado pela diminuição no conteúdo de gordura retroperitoneal e axilar e de massa muscular. Surpreendentemente, nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, o tratamento com dose suprafisiológica de T3 promoveu ganho de massa corporal. Esse dado, mais uma vez, chama a atenção para o envolvimento do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ com o HT para regular a composição corporal. Estudos adicionais se fazem necessários para elucidar a interação do HT com o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ na regulação desse processo.

O tratamento com T3 praticamente não causou diferença significativa no comprimento corporal dos animais, havendo apenas um pequeno aumento no comprimento corporal dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$, após 30 dias de tratamento, em relação aos selvagens. Entretanto, acreditamos ser somente uma característica dos animais que compuseram esse grupo específico (animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ +T3 tratados por 30 dias), uma vez que esses camundongos apresentaram massa corporal ligeiramente elevada em relação aos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ controles antes do tratamento com T3.

A análise do comprimento dos segmentos ósseos, entretanto, mostrou que o tratamento com dose suprafisiológica de hormônio tireoideano causou redução no comprimento do fêmur dos animais selvagens tanto aos 30 como aos 90 dias de tratamento, o que também corrobora dados da literatura. Sabe-se que o excesso de hormônio tireoideano causa fechamento prematuro das lâminas epifisiais, levando a uma redução do crescimento longitudinal ósseo (GOUVEIA, 2004). Um achado bastante interessante do presente estudo foi o de que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ foram resistentes à diminuição do comprimento dos ossos provocado pelo tratamento com dose suprafisiológica de hormônio tireoideano. Mesmo os 90 dias de tratamento com T3 não alteraram o comprimento do fêmur. Considerando-se que detectamos, anteriormente, a expressão proteica (por imunohistoquímica) de $\alpha_{2A}\text{-AR}$ na lâmina

epifisial de camundongos selvagens (FONSECA et al., 2011), os achados do presente estudo sugerem fortemente uma interação da via α_{2A} -AR com a do hormônio tireoideano na regulação do crescimento longitudinal ósseo. Uma avaliação detalhada do efeito da deficiência e excesso de T3 na lâmina epifisial de camundongos selvagens e de camundongos α_{2A} -AR^{-/-} será necessária para confirmarmos essa hipótese.

Surpreendentemente, ao contrário dos animais duplo KO, que são resistentes à osteopenia induzida pelo T3 (FONSECA, 2009), a microtomografia computadorizada mostrou que o osso trabecular femoral dos animais α_{2A} -AR^{-/-} foi mais sensível aos efeitos deletérios do excesso de hormônio tireoideano do que o osso trabecular dos animais selvagens. Enquanto trinta dias de tratamento com dose suprafisiológica de T3 não afetou o osso trabecular dos animais selvagens, esse tempo de tratamento já foi suficiente para causar redução de 55% e 75%, respectivamente, no Tb.N e BMD, com consequente aumento de 54% no Tb.Sp nos animais KOs. O tratamento de noventa dias afetou negativamente todos os parâmetros trabeculares avaliados nos animais KOs, com excessão do Tb.Th e DA, enquanto que, nos animais selvagens, apenas cinco dos nove parâmetros avaliados sofreram alteração deletéria do T3 (BV/TV, Tb.SP, Tb.N, Tb.Pf e Po). Por outro lado, o osso cortical femoral dos animais α_{2A} -AR^{-/-} foi menos sensível, em relação ao dos animais selvagens, ao tratamento com dose suprafisiológica de T3. Os animais selvagens tratados por 90 dias com T3 apresentaram alterações estruturais negativas, tais como aumento do perímetro do periósteo (TP.m) e uma diminuição da espessura da cortical femoral (Ct.Th), enquanto os animais α_{2A} -AR^{-/-}+T3 apresentaram diminuição da porosidade (sigla entre parênteses) aos 30 dias de tratamento e diminuição da BMD aos 90 dias de tratamento, em relação aos animais α_{2A} -AR^{-/-} não tratados.

Com relação à L5, 30 e 90 dias de tratamento com T3 afetaram de forma semelhante os parâmetros trabeculares dos animais α_{2A} -AR e selvagens. Com relação ao osso cortical de L5, observamos, novamente, como no fêmur, uma menor sensibilidade aos efeitos deletérios do excesso de T3 nos animais α_{2A} -AR^{-/-} em relação aos animais selvagens. Esses resultados sugerem que o α_{2A} -AR está envolvido em ações predominantemente positivas do T3 no osso trabecular do fêmur e negativas no osso cortical femoral e vertebral.

A análise da função óssea, através do teste biomecânico de três pontos, mostrou que tanto a tíbia quanto o fêmur dos animais selvagens foram mais sensíveis aos efeitos deletérios do hormônio tireoideano do que os ossos dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Essa melhor funcionalidade dos ossos dos animais KOs, provavelmente se explica por uma melhor estrutura do osso cortical desses camundongos, uma vez que os selvagens apresentaram uma importante diminuição da espessura da cortical, o que não foi encontrado nos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$. Além disso, é digno de nota que os animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ não tratados apresentaram menor porosidade no osso cortical do que os animais selvagens. Esses achados mais uma vez sugerem um possível papel deletério do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ em mediar ações negativas tanto do simpático quanto do hormônio tireoideano no osso cortical.

A análise por PCR em tempo real mostrou que o T3 não alterou a expressão gênica dos receptores alfa e beta adrenérgicos e dos TRs no fêmur dos camundongos selvagens e KOs. O T3, também, praticamente, não alterou a expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur dos animais selvagens e KOs. Vimos que o T3 aumentou a expressão do RANK no fêmur dos animais KOs. O RANK é um receptor de membrana presente nos osteoclastos e nas suas células precursoras. A ligação do RANK ao seu ligante, o RANK-L, ativa a osteoclastogênese e aumenta a atividade osteoclástica (WADA et al., 2006). Provavelmente este aumento da expressão de RANK no fêmur dos animais $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 tenha ocorrido predominantemente no osso trabecular, que, por sua vez, se mostrou mais sensível aos efeitos deletérios da tiroxicose nos animais KOs.

6 CONCLUSÕES

6.1 A comparação dos animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ não tratados sugere que

- O $\alpha_{2A}\text{-AR}$ está envolvido no processo de crescimento longitudinal ósseo, uma vez que os animais KOs apresentaram menor comprimento do fêmur e tíbia;
- o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ tem ação negativa na massa do osso trabecular de L5, uma vez que os animais KOs apresentaram menor Tb.Sp, maior Tb.N e BMD;
- o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ tem ação negativa na massa de osso cortical do fêmur, uma vez que os animais KOs apresentaram menor porosidade da cortical no fêmur.

6.2 A comparação do efeito do tratamento com dose suprafisiológica de T3 entre animais selvagens e $\alpha_{2A}\text{-AR}^{-/-}$ sugere que

- O $\alpha_{2A}\text{-AR}$ está envolvido nos mecanismos de ações predominantemente catabólicos do T3 no músculo esquelético e tecido adiposo branco, uma vez que esses tecidos foram menos sensíveis ao excesso de T3 nos animais KOs;
- o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ está envolvido em ações negativas do T3 no crescimento longitudinal ósseo, uma vez que os animais KOs foram resistentes à diminuição desse processo induzida pela tirotoxicose;
- o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ está envolvido em ações predominantemente negativas do T3 no osso cortical, uma vez que esse tecido foi menos sensível à tirotoxicose nos animais KOs;
- o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ está envolvido em ações predominantemente negativas do T3 na biomecânica óssea, uma vez que os animais KOs foram menos sensíveis aos efeitos deletérios da tirotoxicose em parâmetros ósseos biomecânicos.

REFERÊNCIAS*

- ABEL, E.; ARRIMA, R. S.; BOERS, M. E.; ELMQUIST, J. K.; WONDISFORD, F. E. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 1017-1023, 2001.
- ABID, M.; BILLINGTON, C. J.; NUTTALL, F. Q. Thyroid function and energy intake during weight gain following treatment of hyperthyroidism. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 18, n. 2, p. 189-193, 1999.
- ANDERSON, D. M.; MARASKOVSKY, E.; BILLINGSLEY, W. L.; DOUGALL, W. C.; TOMETSKO, M. E.; ROUX, E. R.; TEEPE M. C.; DUBOSE, R. F.; COSMAN. D.; GALIBERT, L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. **Nature**, v. 309, n. 6656, p. 175-179, 1997.
- ANGEL, N. Z.; WALSH, N.; FORWOOD, M. R.; OSTROWSKI, M. C., CASSADY, A. I.; HUME, D. A. Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 15, p. 103-110, 2000.
- BARON, R. Anatomy and Biology of bone matrix and cellular elements. In: MURRAY, J.; FAVUS, M. D. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research, 2003. p. 1-8.
- BELL, A.; GAGNON, A.; DODS, P.; PAPINEAU, D.; TIBERI, M.; SORISKI, A. TSH signaling and cell survival in 3T3-L1 preadipocytes. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 283, p. 1056-1064, 2002.
- BEYLOT, M.; VINCENT, M.; BENZONI, D.; BODSON, A.; RIOU, J. P.; MORNEX, R. Effects of propranolol and indomethacin upon urinary hydroxyproline in hyperthyroid patients. **La Nouvelle Presse Medicale**, v. 20, p. 989-991, 1982.
- BIANCO, A. C.; SALVATORE, D.; GEREKEN, B.; BERRY, M. J.; LARSEN, P. R. Biochemistry cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr. Rev.**, v. 23, p. 38-39, 2002.
- BJURHOLM, A.; KREICBERGS, A.; TERENIUS, L.; GOLDSTEIN, M.; SCHULTZBERG, M. Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 25, p. 119-125, 1988.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BONNET, N.; BENHAMOU, C. L.; BRUNET-IMBAULT, B.; ARLETTAZ, A.; HORCAJADA, M. N.; 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**, v. 37, p. 622-633, 2005.

BONNET, N.; BRUNET-IMBAULT, B.; ARLETTAZ, A.; HORCAJADA, M. N.; COLLOMP, K.; BENHAMOU, C. L.; COURTEIX, D. Alteration of trabecular bone under chronic beta2 agonists treatment. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v. 37, p. 1493-1501, 2005.

BONNET, N.; BEAUPIED, H.; VICO, L.; DOLLEANS, E.; LAROCHE, N.; COURTEIX, D.; BENHAMOU, C. L. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 22, p. 578-588, 2007.

BONNET, N.; PIERROZ, D. D.; FERRARI, S. L. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. **J. Musculo Skelet. Neuronal Interact.**, v. 8, p. 94-104, 2008.

BRENT, G. A.; MOORE, D. D.; LARSEN, P. R. Thyroid hormone regulation of gene expression. **Annual Rev. Physiol.**, v. 53, p. 17-35, 1991.

BRUM, P. C.; 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.**, v. 283, p. 1838-1845, 2002.

BYLUND, D. B.; EIKENBERG, D. C.; HIEBLE, J. P.; LANGER, S. Z.; LEFKOWITZ, R. J.; MINNERMAN, K. P. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, p. 121-136, 1994.

CAVALIE, H.; LAC, G.; LEBECQUE, P.; CHANTERANNE, B.; DAVICCO, M. J.; BARLET, J. P. Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 93, p. 2034-2037, 2002.

CRABTREE, N. J.; KIBIRIGE, J. N.; FORDHAM, L. M.; BANKS, F. M.; MUNTONI, F. CHINN, D. The relationship between lead body mass and bone mineral content in pediatric health and disease. **Bone**, v. 35, p. 965-72, 2004.

DANGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia humana**. São Paulo: Atheneu, 2007.

DE VRIES, F.; POUWELS, S.; BRACKE, M.; LEUFKENS, H. G.; COOPER, C.; LAMMERS, J. W.; VAN STAA, T. P. Use of beta-2 agonists and risk of hip/femur fracture: a population-based case-control study. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf.**, v. 16, p. 612-619, 2007.

DUCY, P.; AMLING, M.; TAKEDA, S.; PRIEMEL, M.; SCHILLING, A. F.; BEIL, F. T.; SHEN, J.; VINSON, C.; RUEGER, J. M.; KARSENTY, G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass. **Cell**, v. 100, p. 197-207, 2000.

ELEFTERIOU, F.; AHN, J. D.; TAKEDA, S.; STARBUCK, M.; YANG, X.; LIU, X.; KONDO, H.; RICHARDS, W. G.; BANNON, T. W.; NODA, M.; CLEMENT, K.; VAISSE, C.; KARSENTY, G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. **Nature**, v. 434, p. 514-520, 2005.

FALLON, M. D.; PERRY, H. M.; BERGFELD, M.; DROKE, D.; TEITELBAUM, S. L.; AVIOLI, L. V. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. **Arch. Intern. Med.**, v. 143, p. 442-444, 1983.

FONSECA, T. L. **Interação do sistema nervoso simpático com o hormônio tireoideano na regulação da massa e metabolismo ósseos**. 2009. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

FONSECA, T. L.; JORGETTI, V.; COSTA, C. C.; CAPELO, L. P.; COVARRUBIAS, A. E.; MOULATLET, A. C.; TEIXEIRA M. B. C. G.; HESSE, E.; MORETHSON, P.; BEBER, E. H.; FREITAS, F. R. S.; WANG, C. C.; NONAKA, K. O.; OLIVEIRA, R.; CASARINI, D. E.; ZORN, T. M.; BRUM, P. C.; GOUVEIA, C. H. A. Double disruption of $\alpha 2A$ e $\alpha 2c$ -adrenoreceptors results in sympathetic hyperactivity and high bone mass phenotype. **Bone**, v. 26, p. 591-603, 2011.

FORREST, D.; HANEBUTH, E.; SMEYNE, R. J.; EVERDS, N.; STEWART, C. L.; WEHNER, J. M.; CURRAN, T. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: Evidence for tissue-specific modulation of receptor function. **Embo J.**, v. 15, p. 3006-3015, 1996.

FRASER, S. A.; ANDERSON, J. B.; SMITH, D. A.; WILSON, G. M. Osteoporosis and fractures following thyrotoxicosis. **Lancet**, v. 1, p. 981-983, 1971.

FROST, H. M.; SCHONAU, E. The "muscle-bone unit" in children and adolescents: a 2000 overview. **J. Pediatr. Endocrinol. Metab.**, v. 13, p. 571-590, 2000.

FUKUMOTO, S.; MARTIN, J. T. Bone as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 5, p. 230-235, 2009.

GESTA, S.; HEJNOVA, J.; BERLAN, M.; DAVIDAUD, D.; CRAMPES, F.; STICH, V. In vitro and in vivo impairment of $\alpha 2$ -adrenergic receptor-dependent antilipolysis by fatty acids in human adipose tissue. **Hormone and Metabolic Research**, v. 33, p. 701-707. 2001.

GOUVEIA, C. H. The molecular and structural effects of thyroid hormone in bones. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 43, n. 1, p. 183-195, 2004.

GRAAF, V. D. **Anatomia humana**. São Paulo: Manole, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAHN, M.; VOGEL, M.; POMPESIUS-KEMPA, M.; DELLING, G. Trabecular bone pattern factor- a new parameter for simple quantification of bone microarchitectura. **Bone**, v. 13, p. 327-330, 1992.

HEIN, L.; ALTMAN, J. D.; KOBILKA, B. K. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. **Nature**, v. 402, p. 181-184, 1999.

HEIN, L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. **Cell Tissue Res.**, v. 326, p. 541-551, 2006.

HILDBRAND, T.; RUEGSEGG, P. Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, v. 1, p. 15-23, 1997.

HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **J. Mol. Med.**, v. 79, p. 243-253, 2001.

HU, L. W.; LIBERTI, E. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone –an acute study in rats. **Virchows Arch.**, v. 446, p. 265-269, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KNAUS, A. E.; MUTHIG, V.; SCHICKINGER, S.; MOURA, E.; BEETZ, N.; GILSBACH, R.; HEIN, L. Alpha2-adrenoceptor subtypes--unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. **Neurochem. Int.**, v. 51, p. 277-281, 2007.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KRAGSTRUP, J.; MELSEN, F.; MOSEKILDEM, L. Effects of thyroid hormone(s) on mean wall thickness of trabecular bone packets. **Metab. Bone Dis. Relat. Res.**, v. 3, p. 181-185, 1981.

KRONENBERG, H. M. **Williams textbook of endocrinology**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. **Endocr. Rev.**, v. 63, p. 716-738, 1995.

LAKHLANI, P. P.; MACMILLAN, L. B.; GUO, T. Z.; MCCOOL, B. A.; LOVINGER, D. M.; MAZE, M.; LIMBIRD, L. E. Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via "hit and run" gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 9950–9955, 1997.

LEE, N. K.; SOWA, H.; HINOI, E.; FERRON, M.; AHN, J. D.; CONFAVREUX, C.; DACQUIN, R.; MEE, P. J.; MCKEE, M. D.; JUNG, D. Y.; ZHANG, Z.; KIM J. K.; MAUVAIS-JARVIS, F.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456-469, 2007.

LEE, J.Y.; TAKAHASHI, N.; YASUBUSHI, M.; KIM, Y.; HASHIZAKI, H.; KIM, M. J.; SAKAMOTO, T.; GOTO, T.; KAWADA, T. Triiodothyronine Induces UCP1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 302, n. 2, p. 463-472, 2009.

LEVASSEUR, R.; DARGENT-MOLINA, P.; SABATIER, J. P.; MARCELLI, C.; BREART, G. Beta-blocker use, bone mineral density, and fracture risk in older women: results from the Epidemiologie de l'Osteoporose prospective study. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 53, p. 550-562, 2005.

LINK, R. E.; STEVENS, M. S.; KULATUNGA, M.; SCHEININ, M.; BARSH, G. A.; KOBILKA, B. K. Targeted inactivation of the gene encoding the mouse α_{2C} -adrenoceptor homolog. **Mol. Pharmacol.**, v. 48, p. 48-55, 1995.

LIU, X. K.; KIRSCHENBAUM, A.; YAO, S.; LEVINE, A. C. Cross between the interleukin-6 and prostaglandin E (2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1991-1998, 2005.

LIVAK, K. **ABI Prism 7700 Sequence Detection system, user bulletin 2**: manual. Foster City: PE Applied Biosystems, 1997

LU, R.; CHEN, Y.; COTTINGHAM, C.; PENG, N.; JIAO, K.; LIMBIRD, L. E.; WYSS, M. J.; WANG, Q. Enhanced hypotensive, bradycardic, and hypnotic Responses to α_2 -Adrenergic agonists in spinophilin-null mice are accompanied by increased G protein coupling to the α_{2A} -adrenergic receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 78, p. 279-286, 2010.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. São Paulo: Atheneu, 2006.

MACMILLAN, L. B.; HEIN, L.; SMITH, M. S.; PIASCIK, M. T.; LIMBIRD, L. E. Central hypotensive effects of the α_{2A} adrenergic receptor subtype. **Science**, v. 273, p. 803-801, 1996.

MALTIN, C. A.; DELDAY, M. I.; WATSON, J. S.; HEYS, S. D.; NEVISON, I. M.; RITCHIE, I. K.; GIBSON, P. H. Clenbuterol, a betaadrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 84, p. 651-664, 1993.

MARTINEAU, L.; HORAN, M. A.; ROTHWELL, N. J.; LITTLE, R. A. Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 83, p. 615-621, 1992.

MELSEN, F.; MOSEKILDE, L. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hyperthyroidism. **Acta Pathol. Microbiol. Scand**, v. 85, p. 141-150, 1977.

MILLER, R. J. Presynaptic receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 201-227, 1998.

MORETTO, R. L.; PEDRO, A. B.; LEITE, A. C.; ROMALDINI, J. H. Evaluation of body weight in patients with Graves' disease during the treatment with methimazole. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 56, n. 6, p. 364-369, 2012.

MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. **Acta Med. Scand**, v. 204, p. 97-102, 1978.

MUNDY, G.; OYAJOB, B. O. Bone remodeling. In: FAVUS, M. J. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research, 2003. p. 46-58.

OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L.; LANE, J. T.; THOMPSON, M. P. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 125-132, 1991.

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**, v. 9, p. 116, 1996.

PETERHOFF, M.; SIEG, A.; BREDE, M.; CHAO, C. M.; HEIN, L.; ULLRICH, S. Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in α 2-adrenoceptor knockout mice. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 149, p. 343-350, 2003.

PHILIPP, M.; BREDE, M.; HEIN, L. Physiological significance of α (2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 283, p. 287-295, 2002.

PHILIPP, M.; HEIN, L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 101, p. 65-74, 2004.

PRUMMEL, M. F.; BROKKEN, L. J.; MEDURI, G.; MISRAHI, M.; BAKKER, O.; WIERSINGA, W. M. Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 4347-4353, 2000.

PIJL, H.; DE MEIJER, P. H.; LANGIUS, J.; COENEGRACHT, C. I.; VAN DEN BERK, A. H.; CHANDIE SHAW, P. K. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 5848-5853, 2001.

PIERROZ, D. D. M. P.; GLANTT, V.; BOUXSEIN, M.; RIZZOLI, R.; FERRARI, S. L. β_1 β_2 - Adrenergic receptor KO mice have decreased total body and cortical bone mass despite increased trabecular number. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, p. 28-32, 2004.

POZGAJOVÁ, M.; SACHS, U. J. H.; HEIN, L.; NIESWANDT, B. Reduced thrombus stability in mice lacking the α_2A -adrenergic receptor. **American Society of Hematology**, v. 108, p. 514-510, 2006.

REID, I. R.; GAMBLE, G. D.; GREY, A. B.; BLACK, D. M.; ENSRUD, K. E.; BROWNER, W. S.; BAUER, D. C. beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. **J. Bone Miner. Res.**, v. 20, p. 613-618, 2005.

REJNMARK, L.; VESTERGAARD, P.; KASSEM, M.; CHRISTOFFERSEN, B. R.; KOLTHOFF, N.; BRIKEN, K.; MOSEKILDE, L. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. **Calcif. Tissue Int.**, v. 75, p. 365-372, 2004.

RUDE, R. K.; OLDHAM, S. B.; SINGER, F. R.; NICOLOFF, J. T. Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol. **The New England Journal of Medicine**, v. 19, p. 431-443, 1976.

RUFFOLO, R. R.; NICHOLS, J. R.; STADEL, J. M.; HIEBLE, J. P. Structure and function of alpha-adrenoceptors. **Pharmacology**, v. 43, p. 475-505, 1991.

RUFFOLO, R. R.; NICHOLS, J. R.; HIEBLE, J. P. Metabolic regulation by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. **Life Sci.**, v. 49, p. 171-183, 1991.

SCHNEEWEIS, L. A.; WILLARD, D.; MILLA, M. E. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-Kappa B ligand. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 41155-41164, 2005.

STARKE, K.; ENDO, T.; TAUBE, H. D. Pre- and postsynaptic components in effect of drugs with alpha adrenoceptor affinity. **Nature**, v. 254, p. 440-451, 1945.

TAKEDA, S.; KARSENTY, G. Central control of bone formation. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 19, p. 195-198, 2001.

TAKEDA, S.; ELEFTERIOU, F.; LEVASSEUR, R.; LIU, X.; ZHAO, L.; PARKER K. L.; ARMSTRONG, D.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. **Cell**, v. 111, p. 305-317, 2002.

TAKEDA, S. Central control of bone remodeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 328, p. 697-689, 2005.

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.**, v. 61, p. 579-586, 2001.

THOMAS, S. A.; MATSUMOTO, A. M.; PALMITER, R. D. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. **Nature**, v. 374, p. 643-646, 1995.

THOMAS, S. A.; PALMITER, R. D. Examining adrenergic roles in development, physiology, and behavior through targeted disruption of the mouse dopamine beta-hydroxylase gene. **Adv. Pharmacol.**, v. 42, p. 57-60, 1998.

TOGARI, A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. **Microsc. Res. Tech.**, v. 58, p. 77-84, 2002.

VILLICEV, C. M.; FREITAS, F. R.; AOKI, M. S.; TAFFAREL, C.; SCANLAN, T. S.; MORISCOT, A. S.; RIBEIRO, M. O.; BIANCO, A. C.; GOUVEIA, C. H. 2007 Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. **J. Endocrinol.**, v. 193, p. 21-29, 2007.

VON RECKLINGHAUSEN, F. C. **Die fibrose oder deformierende ostitis, die osteomalazie und die osteoplastische karcinose in ihren gegenseitigenbeziehungen.** In: REIMER, G. (Ed.). Berlin: Festschrift Rudol Virchow, 1891. p. 1-89.

SANFORD, C. F.; GRIFFIN, E. E.; WILDENTHAL, K. Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. **Circulation Research**, v. 43, p. 688-694, 1978.

SCHEIBNER, J.; TRENDLENBURG, A. U.; HEIN, L.; STARKE, K.; CORRADO, B. α_2 -Adrenoceptors in the enteric nervous system: a study in α_2A -adrenoceptor-deficient mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 697-704, 2002.

SCHLIENGER, R. G.; KRAENZLIN, M. E.; JICK, S. S.; MEIER, C. R. Use of beta-blockers and risk of fractures. **Jama**, v. 292, p. 1326-1332, 2004.

SCHNEEWEIS, L. A.; WILLARD, D.; MILLA, M. E. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-Kappa B ligand. **J. Biol. Chem.**, n. 50, v. 280, p. 41155-41164, 2005.

SHI, Y.; YADAV, V. K.; SUDA, N.; LIU, X. S.; GUO, X. E.; MYERS M. G. J. R.; KARSENTY, G. Dissociations of the neuronal regulation of bone mass and energy metabolism by leptin in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 105, p. 20529-20533, 2008.

WADA, T.; NAKASHIMA, T.; HIROSHI, N.; PENNINGER, J. M. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends Mol. Med.**, v. 12, n. 1, p. 17-25, 2006.

WAUNG, J. A.; BASSET, D.; WILLIAMS, G. R. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. **Cell**, v. 24, n. 4, p. 155-162, 2012.

WHITE, P.; BURTON, K. A.; FOWDEN, A. L.; DAUNCEY, M. J. Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. **Faseb J.**, v. 15, p. 1367-1376, 2001.

WILLIAM, G. L. **The thyroid gland**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1989.

WILLIAMS, G. R. Actions of thyroid hormones in bone. **Polish Journal of Endocrinology**, v. 60, n. 5, p. 388-380, 2009.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiology**, v. 81, p. 1097-1142, 2001.