Bianca Neofiti Papi

Avaliação da interação do hormônio tireoidiano com o sistema nervoso simpático, via receptor β 2-adrenérgico, na regulação da massa e metabolismo ósseos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof^a. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira

SÃO PAULO

2018

Bianca Neofiti Papi

Avaliação da interação do hormônio tireoidiano com o sistema nervoso simpático, via receptor β 2-adrenérgico, na regulação da massa e metabolismo ósseos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof^a. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira

SÃO PAULO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Papi, Bianca Neofiti

Avaliação da interação do hormônio tireoidiano com o sistema nervoso simpático, via receptor β_2 -adrenérgico, na regulação da massa e metabolismo ósseos / Bianca Neofiti Papi. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

Descritores: 1.Hormônios tireóideos 2.Sistema nervoso simpático
3.Morfofisiologia óssea 4.Receptores adrenérgicos beta 2.

USP/FM/DBD-111/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

***Dedico este trabalho aos meus avós,
que com muito amor e carinho torceram
sempre por mim, e hoje, estejam onde
estiver essa conquista também é de
você.***

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaria de agradecer a Deus pela minha vida, pelas oportunidades, pelas bênçãos dadas a mim, e por tudo que consegui alcançar até hoje.

A meus pais, Cláudia e Rogério, que são meu porto seguro, meu exemplo de vida. Obrigada por todo o apoio, incentivo e amor que sempre me deram, por acreditarem e sonharem comigo esse sonho, por me ensinarem como a vida pode ser leve mesmo com um turbilhão de acontecimentos e por ser quem são. Agradeço a Deus todos os dias por ter me dado a honra de ser filha de vocês.

Ao meu irmão, pelo carinho, parceria e força, que mesmo com a distância estive sempre presente. Obrigada pelas conversas boas, pela companhia em finais de semana que eu estava em casa, pelas leituras compartilhadas, por toda ajuda, e obrigada principalmente por ser o meu irmão.

Ao meu namorado, Gustavo, por todo carinho, amor, e compreensão. Foram dias distantes, aquele aperto no coração de saudade, mas conseguimos levar com leveza e muita parceria. Obrigada por todo apoio e por torcer muito por mim. Obrigada por ser você, sempre.

A todos os meus familiares, em especial a minha tia Silvia, tio Aldemar e Cristiano, por toda força, parceria, torcida, carinho e amor que me deram a cada visita, a cada abraço, a cada despedida de final de semana, a cada telefonema que duravam horas, em cada gesto que eu guardo sempre comigo.

A minha orientadora, Prof^a. Cecília Gouveia, que desde o início me acolheu com muito carinho e paciência em seu laboratório. Obrigada pela oportunidade de iniciar a minha vida acadêmica, de fazer parte do grupo LMO e pela experiência incrível de trabalhar esses anos aqui. Obrigada por sempre acreditar em mim, por todos os ensinamentos, conselhos, abraços, amizade e por estar ao meu lado. É um prazer ter você como minha Mestra!

Aos meus amigos do LMO, Lais, Vitor, Gisele, Mabi, Marcos e em especial a Manu, que foi quem me apresentou a vida dentro do laboratório, fez com que eu me apaixonasse ainda mais pela pesquisa e a quem eu tenho muito carinho. Obrigada

por toda parceira, conversas, ensinamentos, risadas, almoços, cantorias e danças que renderam vídeos engraçados, puxões de orelha, carinho, estudos, ajudas, companhia e pela amizade que levarei pra vida toda.

Aos meus amigos da vida, que mesmo de longe me dão muito apoio. Em especial, a Marina que acompanhou desde o início e sempre esteve comigo. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pela parceria, por tudo que já passamos juntas até aqui e por estar ao meu lado.

Aos meus mestres da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais do Campus de Poços de Caldas, por todo ensinamento compartilhado, pela paixão que me transmitiam em cada aula ministrada, que me inspiraram a seguir a carreira acadêmica, e em especial ao Prof. Marcelo Branco, por todo apoio, pela indicação da Prof^a Cecília, por confiar e acreditar no meu trabalho, pela amizade e por fazer parte de duas fases importantes da minha vida, a graduação e o mestrado. Obrigada por tudo!

A Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina (FMUSP) e ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III), que me proporcionaram toda a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho, pelo acolhimento e agradeço também a todos os funcionários, membros das secretarias dessas instituições por toda ajuda.

Gostaria de agradecer a FAPESP por todo o suporte financeiro cedido pelo processo de nº 2015/12554-6, pois sem esse apoio não seria possível a realização desse projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O Hormônio Tireoidiano	18
1.2. O Hormônio Tireoidiano e o Tecido Ósseo	19
1.3. O Sistema Nervoso Simpático	19
1.4. O Sistema Nervoso Simpático e o Tecido Ósseo	20
1.5. A Interação entre o Sistema Nervoso Simpático e o Hormônio Tireoidiano na Regulação do Metabolismo Ósseo	22
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Animais e Tratamentos	25
3.2. Comprimento dos Animais e do Fêmur Direito	26
3.3. Massa Úmida e Seca do Coração	26
3.4. Microtomografia Computadorizada (μ CT)	26
3.5. Teste Biomecânico do Fêmur	27
3.6. Histomorfometria Óssea	28
3.7. Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (<i>Real-Time PCR</i>)	29
4. ANÁLISE DE RESULTADOS	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Massa Corporal	32
5.2. Comprimento Corporal e do Fêmur Direito dos Animais	33
5.3. Massa do Coração	34
5.4. Análise da Microarquitetura do osso Trabecular do Fêmur (μ CT)	35
5.5. Análise da Microarquitetura do osso Cortical do Fêmur (μ CT)	37
5.6. Teste Biomecânico do Fêmur	40
5.7. Histomorfometria Óssea	42
5.8. PCR em Tempo Real do Fêmur	43
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	43
 Referências Bibliográficas	 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Duas dimensões

3D – Três dimensões

10xT3 – 10x a dose fisiológica de T3

20xT3 – 20x a dose fisiológica de T3

AC – Adenilato Ciclase

AMO – Alta Massa Óssea

AMPc – 3', 5' – adenosina cíclico

BV/TV – Volume ósseo/Volume trabecular

CO₂ – Dióxido de Carbono

Ct.Ar – Área do osso Cortical

Ct.Po – Porosidade Cortical

Ct.Th – Espessura do osso Cortical

D1 – Iodotironina Desiodase tipo 1

D2 – Iodotironina Desiodase tipo 2

D3 – Iodotironina Desiodase tipo 3

DbH^{-/-} - Deficiente de Dopamina β-hidroxilase

DPM – Desvio Padrão da Média

Ec.Pm – Perímetro Endocortical ou Endosteal

EFTP – Ensaio de Flexão de Três Pontos

EPM – Erro Padrão da Média

Fig. - Figura

FVB – Animal selvagem para o Knockout β2-AR

Hiper – Hipertireoidismo

HT – Hormônio Tireoidiano

ICV - Intracerebroventricular

KO - Knockout

Ma.Ar – Área Medular

MC – Massa Corporal

MSC – Massa seca do Coração

NE – Noradrenalina

OC – Osteocalcina

OPG - Osteoprotegerina

Ps.Pm – Perímetro Periosteal

RANK – Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B

RANKL – Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B

rT3 – T3 reverso

Selv - Selvagem

SMI – Índice do Modelo Estrutural

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

SNS – Sistema Nervoso Simpático

T2 - Diiodotironina

T3 - Triiodotironina

T4 – Tetraiodotironina ou Tiroxina

Tb.N – Número de Trabéculas

Tb.Pf – Fator de Padrão trabecular Ósseo

Tb.Sp – Separação de Trabéculas

Tb.Th – Espessura Trabecular

THRA – Receptor de Hormônio Tireoidiano A

THRB – Receptor de Hormônio Tireoidiano B

TRs – Receptor de Hormônio Tireoidiano

TRAP – Fosfatase Ácida Tartrato-Resistente

TREs – Elemento Responsivo do Hormônio Tireoidiano

TR α 1 – Receptor de Hormônio Tireoidiano α 1

TR α 2 – Receptor de Hormônio Tireoidiano α 2

TR β 1 – Receptor de Hormônio Tireoidiano β 1

TR β 2 – Receptor de Hormônio Tireoidiano β 2

Tt.Ar – Área Tecidual Total

VMH – Núcleo Ventromedial do Hipotálamo

α 2-AR – Receptor Adrenérgico α 2

α 2A – Receptor Adrenérgico α 2A

α 2B – Receptor Adrenérgico α 2B

α 2C – Receptor Adrenérgico α 2C

α 2A/ α 2C^{-/-} - Deleção de genes dos receptores α 2A e α 2C Adrenérgicos

β 2-AR – Receptor Adrenérgico β 2

$\beta 2$ -AR^{-/-} - Deleção de genes do receptor $\beta 2$ Adrenérgico

μ CT – Microtomografia Computadorizada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Massa corporal dos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	32
Fig. 2. Ganho de massa corporal dos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	33
Fig. 3. Comprimento corporal e do fêmur direito dos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	34
Fig. 4. Efeito do tratamento com T3 na massa cardíaca dos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	34
Fig. 5. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso trabecular do fêmur direito dos camundongos fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	36
Fig. 6. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso trabecular do fêmur direito dos camundongos machos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	37
Fig. 7. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso cortical do fêmur direito dos camundongos fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	38
Fig. 8. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso cortical do fêmur direito dos camundongos machos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	40
Fig. 9. Efeito da tireotoxicose em parâmetros biomecânicos do fêmur direito dos camundongos fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	41
Fig. 10. Efeito da tireotoxicose em parâmetros biomecânicos do fêmur direito de camundongos machos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$	42
Fig. 11. Efeito da tireotoxicose no Ec.MAR nos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ da diáfise média tibial	43
Fig. 12. Representação esquemática da interação entre o hormônio tireoidiano e o $\beta 2\text{-AR}$ no osso cortical.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de Animais	25
Tabela 2. Sequências de Primers para PCR em Tempo Real	30

RESUMO

Papi BN. *Avaliação da interação do hormônio tireoidiano com o sistema nervoso simpático, via receptor β 2-adrenérgico, na regulação da massa e metabolismo ósseos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O hormônio tireoidiano (HT) é essencial para o desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos, enquanto que o sistema nervoso simpático (SNS) é, também, um potente regulador do remodelamento ósseo. Demonstrou-se que SNS regula negativamente a massa óssea, agindo via receptores β 2-adrenérgicos (β 2-AR), expressos em osteoblastos. O nosso grupo demonstrou que os receptores α 2 adrenérgicos (α 2-AR) também medeiam ações do SNS no esqueleto e que são expressos em osteoblastos, osteócitos, condrócitos e osteoclastos. Considerando-se que o HT interage com o SNS para regular uma série de processos fisiológicos, e que o excesso de HT e a ativação do SNS causam perda de massa óssea, levantamos a hipótese de que há interação entre o HT com o SNS para regular a massa óssea. Estudos do nosso grupo vêm sustentando essa hipótese, uma vez que camundongos com inativação gênica dos receptores α 2-AR apresentam resistência à osteopenia induzida por doses tóxicas de HT. Considerando-se, ainda, que a interação do HT com o SNS em vários tecidos e/ou órgãos depende da sinalização β 2 adrenérgica, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a interação do HT com o SNS para regular a morfofisiologia óssea envolve o β 2-AR. Para tanto, estudamos o efeito de 10x e 20x a dose fisiológica de triiodotironina (3,5 μ g ou 7.0 μ g de T3/100g de massa corporal/dia, respectivamente), por 90 dias, na microarquitetura óssea e em parâmetros biomecânicos do fêmur de camundongos com inativação gênica do β 2-AR (β 2-AR^{-/-}), e nos seus respectivos Selvagens (Selv), os camundongos da linhagem FVB. Como esperado, o tratamento com T3 promoveu efeitos deletérios na microarquitetura trabecular das fêmeas Selv, enquanto alguns desses efeitos foram mais brandos ou inexistentes nos animais β 2-AR^{-/-}, revelando resistência do osso trabecular dos animais knockout (KO) aos efeitos deletérios da tireotoxicose. Em contraste, a microarquitetura femoral dos camundongos machos β 2-AR^{-/-} se mostrou mais sensível aos efeitos deletérios da tireotoxicose, em relação aos respectivos Selv. Quanto ao osso cortical femoral, vimos que o tratamento com T3 aumentou o perímetro endosteal e a área medular nos animais Selv machos e

fêmeas, mas não nos animais $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, o que sugere que o T3 promove reabsorção óssea endosteal no osso cortical, em um mecanismo que depende da via de sinalização do $\beta 2\text{-AR}$. Vimos, ainda, que o tratamento com T3 causou reduções significativas na carga máxima, tenacidade, rigidez e resiliência do fêmur dos camundongos fêmeas Selv. Em contraste, nenhum desses parâmetros biomecânicos foi afetado pelo tratamento com T3 no fêmur das fêmeas KO, evidenciando, mais uma vez, uma resistência desses animais aos efeitos deletérios da tireotoxicose no tecido ósseo. Por outro lado, os camundongos machos Selv e KO se mostraram resistentes aos efeitos deletérios do tratamento com T3 sobre os parâmetros biomecânicos do fêmur, sugerindo a participação de fatores sexuais na interação do HT com o SNS para regular a morfofisiologia óssea. Em conjunto, os achados do presente estudo corroboram a hipótese de que o HT interage com o SNS através da via dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos para regular a morfofisiologia óssea, especialmente em fêmeas e no osso cortical.

Descritores: hormônios tireóideos; sistema nervoso simpático; morfofisiologia óssea; receptor adrenérgico beta 2.

ABSTRACT

Papi BN. *Evaluation of the interaction of thyroid hormone with the sympathetic nervous system, via β 2-adrenergic receptor, in the regulation of bone mass and metabolism* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Thyroid hormone (TH) is essential for bone development, maturation and metabolism, while the sympathetic nervous system (SNS) is also a potent regulator of bone remodeling. SNS has been shown to negatively regulate bone mass, acting via β 2-adrenergic (β 2-AR) receptors expressed in osteoblasts. Our group demonstrated that α 2-adrenergic (α 2-AR) receptors also mediate SNS actions in the skeleton and are expressed in osteoblasts, osteocytes, chondrocytes and osteoclasts. Considering that TH interacts with the SNS to regulate a series of physiological processes, and that the excess of TH and the activation of the SNS cause loss of bone mass, we hypothesize that there is interaction between TH and the SNS to regulate the bone mass. Studies of our group have supported this hypothesis, since mice with gene inactivation of α 2-AR present resistance to the osteopenia induced by toxic doses of TH. Considering that the TH-SNS interaction in various tissues and/or organs depends on β 2-adrenergic signaling, the present study aimed to evaluate whether the interaction of TH with the SNS to regulate the bone morphophysiology involves β 2-AR. Therefore, we studied the effect of 10x and 20x the physiological dose of triiodothyronine (3.5 μ g or 7.0 μ g of T3/100g body mass/day, respectively), for 90 days, in the bone microarchitecture and biomechanical parameters of the femur mice with β 2-AR gene inactivation (β 2-AR^{-/-}), and of their respective Wild-type (WT) controls, the FVB lineage mice. As expected, T3 treatment promoted deleterious effects on the trabecular microarchitecture of the WT females, while some of these effects were milder or nonexistent in β 2-AR^{-/-} animals, revealing trabecular bone resistance of knockout (KO) animals to the deleterious effects of thyrotoxicosis. In contrast, the femoral microarchitecture of the male β 2-AR^{-/-} mice was more sensitive to the deleterious effects of thyrotoxicosis, in relation to the respective WT animals. Regarding to the femoral cortical bone, we saw that T3 treatment increased the endosteal perimeter and the medullary area both male and female WT animals, but not in the β 2-AR^{-/-} mice, suggesting that T3 promotes endosteal bone resorption in the cortical bone, in a mechanism that depends on the

β 2-AR signaling pathway. We also found that treatment with T3 caused significant reductions in the maximum load, tenacity, stiffness and resilience of femurs of the WT female mice. In contrast, none of these biomechanical parameters was affected by T3 treatment in the KO females, demonstrating again resistance of these animals to the deleterious effects of thyrotoxicosis on bone tissue. On the other hand, WT and KO male mice were resistant to the deleterious effects of T3 treatment on the biomechanical parameters of the femur, suggesting the participation of sexual factors in the interaction of HT with the SNS to regulate bone morphophysiology. Taken together, the findings of the present study corroborate the hypothesis that TH interacts with the SNS through the β 2 adrenergic receptor pathway to regulate bone morphophysiology, especially in females and cortical bone.

Descriptors: thyroid hormones; sympathetic nervous system; bone morphophysiology; receptors, adrenergic, beta-2.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Hormônio Tireoidiano

A glândula tireoide secreta, principalmente, a 3,5,3',5'- tetraiodotironina (tiroxina ou T4) e a 3,5,3'- triiodotironina (T3) [1]. Estes são compostos resultantes da ligação de duas moléculas de tirosina iodadas. Nos mamíferos, cerca de 60-90 % da produção tireoidiana corresponde ao T4; 10-40 %, ao T3; e menos do que 1% é representado por outras iodotironinas biologicamente inativas, tais como o reverso (rT3) e diiodotironinas (T2). O T3 é considerado o hormônio tireoidiano (HT) biologicamente ativo e o T4, um pró-hormônio, uma vez que os receptores de hormônio tireoidiano (TRs), que são nucleares, têm uma afinidade 10 vezes maior pelo T3 do que pelo T4. Além disso, a concentração de T4 no núcleo celular é praticamente 10 vezes menor do que a do T3, fazendo com que a sua ligação aos TRs seja mínima e a sua atividade biológica, irrelevante. Assim sendo, o T4 deve ser convertido a T3 a fim ganhar importância fisiológica [2]. Essa conversão ocorre na própria tireoide e, principalmente, nos tecidos alvo do HT, por ação de enzimas denominadas desidases das iodotironinas. Três tipos dessas enzimas foram identificados em tecidos de mamíferos, as desidases do tipo I, II e III (D1, D2 e D3, respectivamente). A D1 converte T4 a T3, T4 a rT3 e T3a T2, sendo, portanto, ativadora e inativadora do HT. A D2 converte T4 a T3 e rT3 a T2. O T4 é o principal substrato de D2, o que faz dela uma enzima prioritariamente ativadora de T4. A D3 é a principal inativadora do HT, convertendo T4 a rT3, e T3 a T2. O hipotireoidismo regula positivamente a atividade da D2 e negativamente a atividade de D3, o oposto sendo observado em casos de tireotoxicose [3], modo este de garantir que os níveis intracelulares de T3 mantenham-se adequados.

O HT exerce uma ampla variedade de efeitos no desenvolvimento e metabolismo dos tecidos, incluindo o tecido ósseo. As ações do HT são primariamente resultado da sua interação com os seus receptores nucleares, os TRs, que são fatores de transcrição induzíveis pelo T3. Esses receptores ligam-se a regiões específicas dos genes alvo, os elementos responsivos do hormônio tireoidiano (TREs), e modificam a sua expressão, aumentando ou diminuindo a taxa de transcrição gênica.

Há quatro isoformas clássicas de TRs codificadas por dois genes [4], o THRA e THRB, localizados, em humanos, nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. O THRB codifica o TR β 1 e TR β 2 enquanto o THRA codifica o TR α 1 e TR α 2. Essa última isoforma não se liga ao T3 e funciona, pelo menos *in vitro*, como um antagonista do TR α 1 e TR β 1 [5]. O TR α 1, TR α 2 e TR β 1 são expressos nas principais células esqueléticas, os osteoblastos, osteoclastos e condrócitos [6, 7]. Uma série de estudos mostra que o TR α 1 é a isoforma predominante no tecido ósseo [8-11], entretanto, estudos do nosso grupo mostram que o TR β 1 medeia efeitos do T3 em células osteoblásticas de ratos e camundongos [12] e, especialmente, no esqueleto de ratos em desenvolvimento [13], sugerindo que o TR β 1 tem relevância biológica no esqueleto.

1.2. O Hormônio Tireoidiano e o Tecido Ósseo

O HT é essencial para o desenvolvimento e metabolismo ósseos. O T3 estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea por regular a atividade dos osteoblastos e osteoclastos [14, 15]. Em condições de excesso de HT, a atividade dessas duas populações celulares está aumentada com predomínio da atividade osteoclástica, levando à diminuição da massa óssea [16]. Por outro lado, no hipotireoidismo, o remodelamento ósseo encontra-se reduzido, o que pode resultar em massa óssea ligeiramente aumentada ou inalterada [17]. O HT pode afetar o esqueleto indiretamente, alterando a síntese e/ou secreção de outros hormônios. Um exemplo é o hormônio de crescimento e IGF-I (*insulin-like growth factor-1*), cuja expressão gênica e proteica são reguladas pelo HT [18]. Por outro lado, sabe-se que o HT também atua diretamente nas células ósseas, modificando a sua proliferação, diferenciação e/ou atividade.

1.3. O Sistema Nervoso Simpático

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) constitui o componente eferente do Sistema Nervoso Visceral. Este se divide em Sistema Nervoso Simpático (SNS) e Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). A grande maioria das fibras pós-ganglionares simpáticas tem a noradrenalina (NE) como neurotransmissor, sendo, portanto, adrenérgica [19]. O sistema adrenérgico é um regulador essencial de funções neurais, endócrinas, cardiovasculares, vegetativas e metabólicas. As

catecolaminas endógenas, adrenalina e NE, transmitem seus sinais biológicos via receptores acoplados à proteína G para regular uma variedade de funções celulares [20]. Esses receptores são denominados receptores adrenérgicos, e é através deles que o SNS efetua suas ações sobre os órgãos alvo. A maioria desses receptores está localizada na membrana plasmática de neurônios e em células alvo neurais e não neurais. Nas células alvo desse sistema, há receptores α -adrenérgicos e/ou β -adrenérgicos. São conhecidos nove subtipos de receptores adrenérgicos, os quais se subdividem em: $\alpha 1$ ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$ e $\alpha 1D$) [21], $\alpha 2$ ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$) e β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) [22]. Todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos são ativados pela adrenalina e NE. Todas as isoformas de receptores β -adrenérgicos estimulam a adenilato ciclase (AC) e, portanto, induzem a síntese de 3',5'-adenosina cíclico (AMPC) [19, 23], que é o segundo mensageiro das ações da NE mediadas pelos receptores β -adrenérgicos. Por outro lado, os receptores $\alpha 2$ inibem a AC e, portanto, diminuem a formação de AMPC, antagonizando as ações mediadas pelos receptores β -adrenérgicos.

1.4. O Sistema Nervoso Simpático e Tecido Ósseo

Um importante achado das últimas duas décadas foi o de que o remodelamento ósseo também está sujeito ao controle do Sistema Nervoso Central (SNC), com o SNS agindo como efetor periférico [24, 25]. Evidências demonstram que o SNS regula negativamente a formação óssea e positivamente a reabsorção óssea [26]. Assim, é esperado que a diminuição e o aumento do tônus simpático resultem, respectivamente, em alto e baixo fenótipo de massa óssea. O estudo da ação do SNS sobre o tecido ósseo praticamente teve início ao se investigar o efeito de um pequeno hormônio polipeptídico, a leptina, no esqueleto. A leptina é secretada principalmente por adipócitos e controla especialmente o peso corporal e a função gonadal através das vias hipotalâmicas [27, 28], além de ser um potente regulador de massa óssea, atuando como inibidor da formação óssea [24]. O efeito antiosteogênico da leptina é prioritariamente central e não local [24]; ou seja, não ocorre, por exemplo, quando a leptina é hiperexpressa em osteoblastos de camundongos *in vivo* [26], mas sim quando ela é administrada diretamente no III Ventrículo por infusão intracerebroventricular (ICV) [24, 26], ou quando há aumento sérico importante da leptina [29]. Centralmente, a leptina ativa o SNS. A infusão de doses mínimas de leptina no III ventrículo leva a marcantes reduções da massa

óssea, tanto em camundongos selvagens quanto deficientes de leptina. Com base em lesões químicas, demonstrou-se que o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) medeia o efeito central da leptina [26]. Além disso, demonstrou-se que esse efeito central é mediado pelo SNS e, mais especificamente, por receptores $\beta 2$ -adrenérgicos ($\beta 2$ -AR) [26, 29].

O papel do SNS no controle do remodelamento ósseo foi evidenciado pelo fenótipo de alta massa óssea (AMO) em modelos de camundongos com baixa atividade simpática, como em animais Ob/Ob, que são deficientes de leptina, e em animais deficientes de dopamina β -hidroxilase ($DbH^{-/-}$), a enzima responsável pela síntese de catecolaminas [30]. Esses modelos animais, entretanto, apresentam disfunções endócrinas, incluindo hipercorticismo, hiperinsulinemia e hipogonadismo, que podem interferir nos efeitos do SNS no osso. Um papel mais preciso do $\beta 2$ -AR na massa óssea foi mostrado por análises de animais com inativação gênica (*knockout* = KO) desses receptores, os camundongos $\beta 2$ -AR $^{-/-}$, que não apresentam anormalidades endócrinas ou metabólicas. Esses animais apresentam massa 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 óssea [29]. Adicionalmente, esses animais são resistentes à perda de massa óssea induzida por ovariectomia. Outra evidência do papel dos receptores $\beta 2$ -AR na mediação das ações do SNS no tecido ósseo é o fato de que a administração de agonistas e antagonistas β -adrenérgicos levam, respectivamente, à perda e ao ganho de massa óssea [30-32].

Por outro lado, estudos do nosso grupo vêm demonstrando que os receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos também medeiam ações do SNS no esqueleto [20, 21]. Vimos que camundongos com duplo KO dos genes do $\alpha 2A$ -AR e do $\alpha 2C$ -AR ($\alpha 2A/2C$ -AR $^{-/-}$) também apresentam um fenótipo AMO [21]. Além disso, demonstramos que os receptores adrenérgicos $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$ ($\alpha 2A$ -AR, $\alpha 2B$ -AR e $\alpha 2C$ -AR) são expressos nas principais células ósseas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos; e em condrócitos da lâmina epifisial, dos centros de ossificação secundários, e da cartilagem articular [21]. Os $\alpha 2$ -ARs são autorreceptores pré-sinápticos que regulam negativamente a liberação de catecolaminas. Assim sendo, os camundongos $\alpha 2A/2C$ -AR $^{-/-}$ apresentam uma elevação crônica do tônus simpático [21]. O fato dos animais $\alpha 2A/2C$ -AR $^{-/-}$ apresentarem fenótipo de AMO, mesmo apresentando uma

elevação no tônus simpático e expressão de β 2-AR, demonstra que este último não é o único adrenoceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo, e que o α 2A-AR e/ou α 2C-AR apresentam um papel importante na mediação das ações do SNS na regulação da massa óssea.

1.5. A Interação entre o Sistema Nervoso Simpático e o Hormônio Tireoidiano na Regulação do Metabolismo Ósseo

Uma característica importante do HT, mas ainda pouco entendida, é a sua interação com o SNS. É bem sabido que pacientes com hipertireoidismo apresentam um estado de hiperatividade simpática [33]. Estudos revelam sinergismo entre as catecolaminas e o HT na indução da termogênese, lipólise, glicogenólise e gluconeogênese [34]. Demonstrou-se, por exemplo, que a produção de AMPc induzida pela adrenalina em culturas de células miocárdicas é aumentada de forma importante pelo T3 [35]. Os mecanismos desse sinergismo ainda não são completamente entendidos e vem sendo investigados nos diferentes sistemas. Sabe-se que o HT não aumenta a concentração de catecolaminas no plasma [36]. Um mecanismo desse sinergismo é o aumento da expressão dos receptores β -adrenérgicos em alguns tecidos, como, por exemplo, no coração [37]. Entretanto, esse efeito do HT sobre os receptores β -adrenérgicos é apenas brando, o que não explica completamente o sinergismo.

Considerando-se que o excesso de HT causa perda de massa óssea e que a ativação do SNS também apresenta efeito negativo na massa óssea, levantamos a hipótese de que há uma interação entre o HT e o SNS para regular o metabolismo ósseo e, conseqüentemente, a massa óssea. Estudos recentes do nosso grupo vêm sustentando essa hipótese, uma vez que camundongos com inativação gênica dos receptores α 2-adrenérgicos apresentam resistência à osteopenia induzida por doses tóxicas de T3 [20, 38], sugerindo que a via de ação do HT interage com a via dos α 2-ARs para promover os seus efeitos osteopênicos. Outra evidência dessa possível interação do HT com o SNS é o fato de que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol (um antagonista β -adrenérgico) corrige a hipercalcemia secundária à tireotoxicose [12]. Além disso, pacientes com hipertireoidismo tratados com propranolol apresentam redução da excreção de hidroxiprolina pela urina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea [33]. Esses

achados sugerem que o aumento da reabsorção óssea na tireotoxicose possa também envolver mecanismos dependentes dos receptores β -adrenérgicos. A confirmação dessa hipótese trará avanços com relação ao entendimento dos mecanismos através dos quais o HT regula a massa óssea. Assim sendo, o estudo do efeito do HT em camundongos com inativação gênica do β 2-AR representa um modelo experimental bastante interessante para a investigação dessa questão.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar se o HT interage com o SNS, via receptor β 2-adrenérgico, para regular a microarquitetura óssea trabecular e cortical, o remodelamento ósseo, bem como propriedades biomecânicas do fêmur.

2.2. Objetivos Específicos

-Analisar o efeito do tratamento com dose suprafisiológica de T3, em camundongos que apresentam inativação do gene do β 2-AR, nos seguintes parâmetros:

-Estrutura óssea, por microtomografia computadorizada (μ CT);

-Propriedades biomecânicas do fêmur (carga máxima, tenacidade, rigidez e resiliência), através do teste de flexão de três pontos;

-No remodelamento ósseo, através de histomorfometria óssea;

-Na regulação de genes relacionados à fisiologia óssea: Osteocalcin (OC), *Ligand receptor activator of nuclear factor- κ B* (RankL), *Osteoprotegerin* (OPG), *Receptor activator of nuclear factor- κ B* (Rank) e TRAP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e Tratamentos

Foram estudados camundongos fêmeas e machos com inativação gênica (knockout = KO) isolada do receptor adrenérgico $\beta 2$ ($\beta 2\text{-AR}^{-/-}$), em *background* genético de camundongos FVB [39], e os seus respectivos controles, os animais selvagens (Selv) FVB. Os camundongos KO e Selv foram cedidos pela Dra. Patrícia C. Brum, Professora Associada da Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo. Todos os animais apresentavam 120 dias de idade no início do estudo. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas em temperatura de aproximadamente 25°C), com acesso *ad libitum* à ração e água. Os animais foram agrupados, como especificados na Tabela 1.

Tabela 1. Grupos de Animais.

Grupos (n=8-11/grupo)	Tratamento com T3 ($\mu\text{g T3}/100 \text{ g}\cdot\text{MC}/\text{dia}$)
Selv-Eut	-
Selv-10xT3	3,5
Selv-20xT3	7
B2-AR ^{-/-} -Eut	-
B2-AR ^{-/-} -10xT3	3,5
B2-AR ^{-/-} -20xT3	7

O T3 foi administrado intraperitonealmente por 90 dias. 10x e 20x referem-se a 10 e 20 vezes a dose fisiológica diária de T3, respectivamente. Massa corporal (MC). Eutireoidismo (Eut).

O hipertireoidismo (Hiper) foi mimetizado pela administração diária e intraperitoneal de T3 (Sigma, St Louis MO, EUA), na dose de 3,5 μg de T3/100g de massa corporal (MC)/dia e na dose 7 μg de T3/100g de MC/dia. Essas doses

equivalem a, aproximadamente, 10 e 20 vezes a dose fisiológica de T3/dia. Ambos os tratamentos foram administrados por 90 dias.

Todos os animais foram pesados uma vez por semana para o acompanhamento da variação da massa corporal, em gramas, ao longo do período experimental, e para o ajuste das doses de T3 que foram administradas. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados por exposição a CO₂.

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, tendo sido, portanto, aprovados por esta Comissão (protocolo de número 121/2015), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP, aprovado também por esta Comissão (protocolo de número 158/15).

3.2. Comprimento dos Animais e do Fêmur Direito

O comprimento corporal foi aferido imediatamente após a eutanásia dos animais, obtendo-se a medida da ponta do focinho até a base da cauda, utilizando-se uma régua. O comprimento longitudinal do fêmur direito, medido entre a extremidade proximal e distal, foi feito utilizando-se um paquímetro digital (Digimess) em ossos dissecados.

3.3. Massa Úmida e Seca do Coração

Foi realizada a medida da massa úmida e massa seca do músculo cardíaco como medida indireta de hipertrofia cardíaca. Para tanto, após a eutanásia dos animais, o músculo cardíaco foi coletado e pesado em uma balança analítica de precisão (Denver Instrument M-220D) aferindo-se, assim, a massa úmida. Em seguida, o músculo cardíaco foi colocado em estufa a 60°C durante um período de 48 horas. Após este tempo, o músculo foi pesado novamente para aferição da massa seca. Foi calculado o conteúdo de água a partir da diferença entre a massa úmida e massa seca. A massa do músculo cardíaco foi dividida pela massa em gramas do animal e, portanto, expressa como $\text{g/g} \cdot \text{MC} \times 100$.

3.4. Microtomografia Computadorizada (μ CT)

O fêmur direito foi dissecado e mantido em salina a -20°C até o momento das análises. Parâmetros em duas e três dimensões (2D e 3D, respectivamente) do

fêmur foi obtido através do Microtomógrafo da Skyscan 1174 (Desktop X-ray microtomograph). O programa CT-Analyser (versão 1.5.0.0, SkyScan, Artselaar, Bélgica) foi utilizado para análise das imagens. A região de interesse analisada no fêmur foi a metade proximal do seu terço distal. Essa região foi delimitada dividindo-se por 3 o comprimento total do fêmur, para a seleção do terço distal, cujo comprimento foi dividido por 2, para a seleção da sua metade proximal. Os parâmetros trabeculares analisados foram o volume trabecular (Bone volume/tissue volume = BV/TV); espessura trabecular (Tb.Th); separação trabecular (Tb.Sp); número de trabéculas (Tb.N), fator de 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). Os parâmetros corticais foram a área total delimitada pelo periósteo (área tecidual total = Tt.Ar), área do osso cortical (Ct.Ar), o perímetro endocortical ou endosteal (Ec.Pm) e periosteal (Ps.Pm), a área medular (Ma.Ar), espessura do osso cortical (Ct.Th) e a porosidade cortical (Ct.Po) em 2D e 3D.

3.5. Teste Biomecânico do Fêmur

Os fêmures direitos foram dissecados e mantidos em salina, na temperatura de -20°C, até o momento das análises. Parâmetros biomecânicos foram obtidos pelo Ensaio de Flexão de Três Pontos (EFTP), utilizando o sistema para teste de materiais Instron, modelo 3344 (Instron Corporation, MA, USA). Foi utilizada uma célula de carga com capacidade máxima de 100 kgf. Durante o ensaio, as extremidades dos fêmures foram apoiadas em dois roletes, com diâmetro de 3,0 mm. Uma força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso no ponto médio entre os dois apoios, no sentido ântero-posterior no fêmur, por uma haste cilíndrica de 3,0 mm, a uma velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento de ruptura do osso. A força aplicada e o deslocamento da haste cilíndrica foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento (Instron Series IX), que construiu curvas de força-deformação, a partir das quais foi possível obter os seguintes parâmetros biomecânicos: (i) Carga Máxima (N): corresponde a maior força aplicada durante o ensaio, que se refere à força máxima à qual o osso é capaz de resistir; (ii) Rigidez (N/mm): corresponde à rigidez óssea e foi determinada pela inclinação da reta da fase elástica da curva força-deformação; (iii) Resiliência (J): é a propriedade do osso de retornar à sua forma original após

uma deformação elástica, e corresponde a energia absorvida por um material durante a deformação elástica; e (iv) Tenacidade (J): é a capacidade do osso de resistir a uma fratura.

3.6. Histomorfometria Óssea

Para a marcação das superfícies de mineralização óssea, os animais foram tratados com tetraciclina (2 mg/100 g de peso corporal), aplicada subcutaneamente nos dias 8 e 9 antes do sacrifício e com calceína (1,5 mg/100 g de peso corporal), também aplicada subcutaneamente nos dias 3 e 4 antes do sacrifício. Após o sacrifício, a tíbia esquerda foi dissecada e processada da seguinte maneira: permanência em etanol 70% por 7 dias, em etanol 100% por mais 7 dias e em tolueno por 24 horas. Em seguida, o material foi incubado a 4 °C em solução A (metilmetacrilato 75% + dibutilftalato 25%) por 7 dias, em solução 1 g (solução A + peróxido de benzoíla a 1%) por 7 dias e em solução 2 g (solução A + peróxido de benzoíla a 2%) por 7 dias. O fragmento foi incluído em um frasco com tampa, cujo fundo foi previamente preparado (solução 2 g em estufa a 37°C por 24 h), juntamente com solução 2 g. O frasco foi transferido para estufa a 37°C por 48h para endurecimento da solução e formação de um bloco (plástico + fragmento ósseo). O bloco foi posteriormente seccionado em cortes histológicos longitudinais de 5 µm para análise dos parâmetros estáticos e de 10 µm para fluorescência (parâmetros dinâmicos), utilizando-se um micrótomo de impacto Jung K (modelo K). Para facilitar a adesão do corte na lâmina, foi utilizado álcool a 50% e 100% e o material mantido em estufa (37 °C) por um mínimo de 12 horas. Para a coloração das lâminas, os cortes foram desplastificados com metilmetacrilato puro por 20 a 30 min, desidratados em álcool 100%, hidratados em álcool 50% e água destilada e finalmente corados em azul de toluidina por 10 minutos. Dois cortes não-consecutivos foram examinados para cada amostra através de microscópio óptico utilizando-se o Sistema OsteoMeasure (Osteometrics, Inc, Decatur, GA, USA). Parâmetros estruturais da formação e reabsorção óssea foram medidos num corte longitudinal, num total de 20 campos. Os parâmetros dinâmicos foram obtidos em cortes não corados examinados por microscopia de fluorescência (Nikon, Tóquio, Japão). O índice histomorfométrico analisado foi a taxa de aposição da mineralização endocortical (Ec.MAR). O índice histomorfométrico foi expresso de

acordo com a nomenclatura padrão recomendada pela *American Society for Bone and Mineral Research*.

3.7. Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (*Real-Time PCR*)

Os fêmures esquerdos foram dissecados rapidamente sobre uma superfície resfriada (0-4 °C), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em um freezer - 80°C. Para a extração do RNAm, os ossos foram pulverizados, na presença de nitrogênio líquido, em um *mortar* e pistilo de aço (Fisher Scientific International, Inc, Hampton, NH, USA) previamente resfriados em gelo seco. Ao "pó" de osso, foi adicionado Trizol (Gibco, BRL). A mistura de pó de osso mais Trizol foi homogeneizada com um polytron PT10-35 (Brinkmann Instruments, Inc, NY, USA). O RNA total dos ossos foram extraídos de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do TRizol e tratados com DNase I (Fermentas, Hanover, MD, USA), segundo indicação do fabricante. A concentração e pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria medindo 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 *Rever Aid-H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas, Hanover, MD, USA), conforme o seguinte protocolo: incubação com o oligo (dt) a 25 °C por 10 min, transcrição reversa a 37 °C por 1 hora e inativação por calor (heatin activation) da transcriptase reversa a 95 °C por 5 min no termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Os *primers* de oligonucleotídeos para amplificação por PCR foram desenhados através do software *Primer Express Version 1.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a partir das sequências dos genes de interesse (Tabela 2). Esses *primers* foram sintetizados pela XXIDT integrated (DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Os valores relativos à amplificação do RNAm referente a cada gene estudado foram avaliados através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador e detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), comparando todas as amostras e o controle em duplicatas. Após padronização da quantidade de DNAc e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 25 µl, com 450 nM de *primers* e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). O gene 18s rRNA foi selecionado como controle interno para corrigir a variabilidade nas amplificações. O DNAc foi amplificado em duplicatas nas seguintes condições: 1

ciclo a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (anelamento). Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados com o controle interno e a quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método do $\Delta\Delta C_t$ como previamente descrito por Livak.

Tabela 2 – Sequências de Primers para PCR em Tempo Real

RANK	F: 5'-TCTGCAGCTCTTCAATGACACT-3' R: 5'-CGATGAGACTGGGCAGGTAAG-3'
RANK-L	F: 5'-GGCCACAGCGCTTCTCAG-3' R: 5'-GAGTGACTTTATGGGAACCCGAT-3'
OC	F: 5'-CTCACAGATGCCAAGCCCA-3' R: 5'-CCAAGGTAGCGCCGGAGTCT-3'
TRAP	F: 5'-TGCACAGATTGCATACTCTAAGATCT-3' R: 5'-TTTTGAAGCGCAAACGGTAGT-3'
OPG	F: 5'-AGTCCGTGAAGCAGGAGTG-3' R: 5'-CCATCTGGACATTTTTTGCAAA-3'
18S	F: 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' R: 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3'

F = *Forward primer* e R = *Reverse primer*

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

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

5. RESULTADOS

5.1. Massa Corporal

Figura 1. Massa corporal dos camundongos Selv e β_2 -AR^{-/-}. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μ g de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17ª semana de vida. A massa corporal foi aferida uma vez por semana. Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média.

Na Fig. 1 A e D, podemos observar que não houve diferença entre os animais Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ quanto à massa corporal (MC), tanto para as fêmeas quanto para os machos. A análise da MC absoluta mostrou que o tratamento com 10xT3 e 20xT3 não promoveu alterações significativas nas fêmeas e machos Selv e KO (Fig. 1 B,C,E e F).

Fig. 2. Ganho de massa corporal dos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μ g de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17^a semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). O ganho de massa corporal foi obtido através da diferença entre a última pesagem, realizada na 29^a semana de vida (massa corporal final), pela primeira pesagem, realizada na 17^a semana de vida (massa corporal basal). Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ vs. sem tratamento (-); e + $p < 0.05$ vs. 10xT3.

Quando avaliamos o ganho de MC (Fig. 2), novamente não observamos diferenças entre os camundongos Selv e KO, tanto fêmeas quanto machos. O tratamento com T3 não alterou o ganho de massa corporal nos animais fêmeas, mas promoveu alterações nos animais machos. Observamos que o tratamento com 10xT3 promoveu ganho significativo de MC nos animais KO, enquanto que o tratamento com 20xT3 promoveu ganho de MC nos animais Selv e KO.

5.2. Comprimento Corporal e do Fêmur Direito dos Animais

Quanto ao comprimento corporal (Fig. 3 A e B), medido do focinho até a base da cauda, podemos observar que praticamente não houve diferença entre os animais Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ fêmeas e machos, e que o tratamento com T3 não promoveu alterações neste parâmetro. O mesmo foi observado quanto ao comprimento do fêmur (Fig. 3 C e D).

Fig. 3. Comprimento corporal e do fêmur direito dos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μ g de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17ª semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). O comprimento corporal foi medido do focinho até a base da cauda. Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média.

5.3. Massa do Coração

Como pode ser observado na Fig. 4 A, o tratamento com T3 não promoveu hipertrofia cardíaca nos camundongos fêmeas Selv e KO. Nota-se apenas uma tendência a hipertrofia cardíaca nas fêmeas Selv tratadas com 20xT3. Nos machos (Fig. 4 B), o tratamento com 20xT3 promoveu ganho de massa cardíaca tanto nos animais Selv quanto KO.

Fig. 4. Efeito do tratamento com T3 na massa cardíaca dos camundongos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μ g de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17ª semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). Os valores foram calculados dividindo a massa seca do coração (MSC) pela massa corporal (MC) [(g de MSC/g de MC)x100]. Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. *p<0.05 e **p<0,01 vs. sem tratamento (-).

5.4. Análise da Microarquitetura do osso Trabecular do Fêmur (μ CT)

Quanto à microarquitetura do osso trabecular das fêmeas, a tireotoxicose claramente promoveu efeitos deletérios mais severos nos animais Selv do que nos animais $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ (Fig. 5). O tratamento com 10xT3 causou redução significativa no BV/TV (33%) e Tb.N (33%), e aumento no Tb.Sp (26%) apenas nos animais Selv, mas não dos animais $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ (Fig. 5 A, B e D, respectivamente). Já o tratamento com 20xT3 causou redução no BV/TV e Tb.N e aumento no Tb.Sp nos animais Selv (56%, 49% e 28%, respectivamente) e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ (39%, 36% and 27%, respectivamente). Nota-se, ainda, que esses efeitos tenderam a ser mais intensos nos animais Selv do que nos animais KO. Além disso, o tratamento com 20xT3 causou redução no Tb.Th (14%) e aumento no Tb.Pf (41%), que é uma medida de conectividade trabecular (quanto maior o Tb.Pf, menor a conectividade) somente nos animais Selv (Fig. 5 C e E, respectivamente). Não houve diferença entre os animais Selv e KO eutireoideos para nenhum dos parâmetros trabeculares avaliados. Entretanto, entre os animais tratados com 10xT3, nota-se maior BV/TV e Tb.N e menor Tb.Sp (51%, 52% e 17%, respectivamente) nos animais KO em relação aos Selv (Fig. 5 A, B e D, respectivamente). Além disso, nota-se um Tb.Pf 23% menor nos animais KO tratados com 20xT3 em relação aos Selv também tratados com 20xT3 (Fig. 5 E), evidenciando a resistência do osso trabecular das fêmeas aos efeitos deletérios da tireotoxicose.

Fig. 5. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso trabecular do fêmur direito dos camundongos fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μg de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17ª semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. Os números acima das barras indicam os valores de p para as diferenças entre Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. sem tratamento (-). + $p < 0.05$ vs. 10xT3.

Os machos Selv foram mais resistentes aos efeitos deletérios da tireotoxicose do que as fêmeas Selv (Fig. 6). Diferentemente do que foi observado nas fêmeas, apenas a dose mais alta de T3 (20xT3) causou efeitos negativos nos machos Selv, causando redução apenas no BV/TV (41%) e Tb.N (36%). Também divergindo das fêmeas, nota-se que os machos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ foram mais sensíveis à tireotoxicose do que os machos Selv. Enquanto que, nos últimos, apenas 20xT3 promoveu efeitos negativos no BV/TV e Tb.N, nos machos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, tanto 10xT3 (29% e 31%, respectivamente) quanto 20xT3 (48% e 47%, respectivamente) causaram reduções nesses parâmetros (Fig. 6 A e B). Somando-se a isso, o tratamento com 20xT3 promoveu aumento no Tb.Sp (53%) apenas nos animais $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ (Fig. 6D).

Fig. 6. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso trabecular do fêmur direito dos camundongos machos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μg de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17^a semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. **p<0.01, ***p<0.0001vs. sem tratamento (-).

5.5. Análise da Microarquitetura do osso Cortical do Fêmur (μCT)

A análise do osso cortical do fêmur dos camundongos fêmeas mostrou que o tratamento com 10xT3 não alterou a sua arquitetura tanto nos animais Selv quanto KO (Fig. 7). Porém, apenas nas fêmeas Selv e não nas KO (Fig. 7 D-F), o tratamento com 20xT3 causou aumento significativo no perímetro endocortical ou endosteal (Ec.Pm; 4,1 vezes), levando a um aumento na área medular (Ma.Ar; 4,63 vezes) e a uma redução da espessura cortical (Ct.Th; 19%). Somando-se a isso, o tratamento com 20xT3 promoveu, novamente apenas nas fêmeas Selv, um aumento importante na porosidade cortical (Ct.Po), obtida em 2D (Fig. 7 G) e em 3D (Fig. 7 H), de 5,75 e 20 vezes, respectivamente.

Fêmeas

Fig. 7. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso cortical do fêmur direito dos camundongos fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μg de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17ª semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. Os números acima das barras indicam os valores de p para as diferenças entre Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ vs. sem tratamento (-); + $p < 0.05$ e +++ $p < 0.001$ vs. 10xT3.

Esses achados revelam uma resistência do osso cortical femoral das fêmeas $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ aos efeitos deletérios da tireotoxicose. Essa resistência é evidenciada pela diferença significativa entre as fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ tratadas com 20xT3 quanto ao Ec.Pm, 0,24 vezes menor nos animais KO (Fig. 7 D); Ct.Th, 14% maior nos KO (Fig. 7 F); e Ct.Po em 2D, 0,25 vezes menor nos animais KO (Fig. 7 G). Praticamente, não houve diferença entre os parâmetros de osso cortical entre os animais Selv e

KO eutireoideos. Nota-se apenas um Ps.Pm ligeiramente maior (7%) nos KOs (Fig. 7 C).

Já nos machos, observamos que o tratamento com 10xT3 promoveu aumento no Tt.Ar e Ct.Ar tanto nos animais Selv (16% e 13,5%, respectivamente) quanto nos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ (9,08% e 9,2%, respectivamente) (Fig. 8 A-B), e que o tratamento com 10xT3 e 20xT3 promoveu aumento no Ps.Pm tanto nos animais Selv (10% e 11%, respectivamente) quanto KO (9% e 8%, respectivamente) (Fig. 8 C). Por outro lado, de maneira similar ao que foi observado nas fêmeas, o tratamento com T3 (10xT3) promoveu aumento do Ec.Pm (3,34 vezes) e Ma.Ar (2,9 vezes) apenas nos animais Selv e não nos KOs (Fig. 8 E-D). Diferentemente do que foi observado nas fêmeas, o tratamento com T3 não causou redução no Ct.Th, o que se explica pelo aumento nos valores de Tt.Ar, e Ps.Pm observados nos animais tratados. Foi, ainda, observado que o tratamento com 10xT3 causou um aumento significativo na Ct.Po (3D) apenas nos machos Selv (54 vezes), e não nos animais KO (Fig. 8 H). Também não houve diferença entre os parâmetros de osso cortical entre os animais Selv e KO eutireoideos machos. Nota-se apenas uma Ct.Po em 3D 4,4 vezes maior nos animais Selv em relação aos animais KO tratados com 10xT3 (Fig. 8 H), evidenciando resistência, também dos animais machos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, aos efeitos deletérios da tireotoxicose no osso cortical.

Machos

Fig. 8. Efeito da tireotoxicose na microarquitetura do osso cortical do fêmur direito dos camundongos machos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μ g de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17^a semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. Os números acima das barras indicam os valores de p para as diferenças entre Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, **** $p<0,0001$, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$ e * $p<0,05$ vs. sem tratamento (-); + $p<0,05$ vs. 10xT3.

5.6. Teste Biomecânico do Fêmur

Através do Ensaio de Flexão de Três Pontos, observamos que o tratamento com 20xT3 promoveu uma redução significativa em todos os parâmetros biomecânicos avaliados no fêmur dos camundongos fêmeas Selv. Nota-se uma redução de 35%, 65%, 19% e 82% na carga máxima, tenacidade, rigidez e

resiliência, respectivamente, dos camundongos fêmeas Selv tratados com 20xT3 em relação as fêmeas Selv sem tratamento (Fig. 9). O tratamento com 10xT3 só afetou negativamente a resiliência das fêmeas Selv (redução de 64%), em relação às fêmeas Selv eutiroideas. Por outro lado, os tratamentos com 10x ou 20xT3 não promoveram nenhum efeito nos parâmetros biomecânicos do fêmur das fêmeas KO, revelando resistência desses animais também aos efeitos deletérios da tireotoxicose em parâmetros biomecânicos do osso. Nota-se, entretanto, que o fêmur das fêmeas KO eutiroideas mostrou uma menor carga máxima (31%) e resiliência (64%) em relação ao fêmur das fêmeas Selv.

Fig. 9. Efeito da tireotoxicose em parâmetros biomecânicos do fêmur direito dos camundongos fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μ g de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17^a semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. Os números acima das barras indicam os valores de p para as diferenças entre Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05 vs. sem tratamento (-); +p<0,05 vs. 10xT3.

Diferentemente das fêmeas, o fêmur dos machos Selv mostrou-se insensível aos efeitos deletérios da tireotoxicose em parâmetros biomecânicos (Fig. 10). Além disso, tanto 10x quanto 20xT3 não afetaram negativamente nenhum dos parâmetros

biomecânicos avaliados nos animais Selv e KO. Por outro lado, 10xT3 promoveu um aumento de 64% na tenacidade do fêmur dos animais Selv.

Fig. 10. Efeito da tireotoxicose em parâmetros biomecânicos do fêmur direito de camundongos machos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Os animais foram tratados com 10x ou 20x a dose fisiológica de T3 (3,5 e 7 μg de T3/100g de MC/dia) por 90 dias, a partir da 17ª semana de vida, ou permaneceram sem tratamento (-). Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. Os números acima das barras indicam os valores de p para as diferenças entre Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05 vs. sem tratamento (-); *p<0,05 vs. 10xT3.

5.7. Histomorfometria Óssea

Considerando os achados do μCT , sugerindo que a perda da sinalização $\beta 2\text{-AR}$ prejudica a resposta da superfície óssea endocortical à tireotoxicose, avaliamos, por histomorfometria óssea, o efeito do tratamento 20xT3, em fêmeas, e 10xT3, em machos, na aposição da mineralização endocortical (Ec.MAR) da diáfise tibial em camundongos Selv e KO. O Ec.MAR foi 3,6 vezes (p<0,01) maior nos camundongos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ do que nos camundongos Selv (Fig. 11A), o que corrobora com estudos anteriores que mostram aumento na formação óssea nesses animais [29] e aumento de Ec.MAR na diáfise tibial [40]. No entanto, essas diferenças não foram observadas em camundongos machos (Fig. 11B), sugerindo que o gênero modifica as ações de

sinalização $\beta 2$ -AR no esqueleto. O tratamento com 20xT3 promoveu um aumento de 3,5 vezes ($p < 0,05$) em Ec.MAR em fêmeas Selv, mas não em fêmeas KO, sugerindo que a sinalização $\beta 2$ -AR medeia ações estimulatórias de HT na formação óssea endocortical. Em contraste com o que foi observado nas fêmeas, a Ec.MAR não foi significativamente aumentada em 10xT3 em machos Selv e KO, mostrando que HT afeta a formação de osso cortical e, portanto, a remodelação óssea de uma maneira dependente de gênero.

Fig. 11. Efeito da tireotoxicose no Ec.MAR nos camundongos Selv e $\beta 2$ -AR^{-/-} da diáfise média tibial. A taxa de aposição de mineralização endocortical (Ec.MAR) na diáfise tibial foi determinada por histomorfometria óssea em (A) fêmea e (B) machos tratados com 20x ou 10x a dose fisiológica de T3 (7 e 3,5μg T3/100g PC/dia), respectivamente, ou permaneceram sem tratamento (-), por 12 semanas. Todos os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão da média. O número acima da linha indica o valor de p para Selv vs $\beta 2$ -AR^{-/-}, * $p < 0,05$ vs. sem tratamento (-).

5.8. PCR em Tempo Real do Fêmur

Finalmente, avaliamos a expressão gênica da osteocalcina, TRAP e do sistema Rank-Rank-L-OPG no fêmur dos animais Selv e KO por PCR em Tempo Real. Nenhum desses genes mostrou alteração da sua expressão em função do tratamento com T3 ou da deleção do $\beta 2$ -AR.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nos últimos 15 anos, uma série de estudos tem demonstrado que o SNS também controla o metabolismo ósseo [41]. Evidências mostram que a ativação do SNS regula negativamente a formação óssea e positivamente a reabsorção óssea, via sinalização $\beta 2$ -AR, levando à perda de massa óssea [26, 42, 43]. Assim, é esperado que a diminuição e o aumento do tônus simpático resultem,

respectivamente, em alto e baixo fenótipo de massa óssea. O papel do SNS no controle do remodelamento ósseo foi evidenciado pelo fenótipo de alta massa óssea (AMO) em modelos de camundongos com baixa atividade simpática, como em animais Ob/Ob, que são deficientes de leptina, e em animais deficientes de dopamina β -hidroxilase (DbH^{-/-}), a enzima responsável pela síntese de catecolaminas [30]. Esses modelos animais, entretanto, apresentam disfunções endócrinas, incluindo hipercorticismo, hiperinsulinemia e hipogonadismo, que podem interferir nos efeitos do SNS no osso. Um papel mais preciso do β 2-AR na massa óssea foi mostrado por análises de animais com inativação gênica (*knockout* = KO) desse receptor, os camundongos β 2-AR^{-/-}, que não apresentam anormalidades endócrinas ou metabólicas. Esses animais apresentam massa corporal normal, mas apresentam, também, um fenótipo de AMO a partir dos 6 meses de idade, que ocorre devido a um aumento da formação e diminuição da reabsorção óssea [29]. Adicionalmente, esses animais são resistentes à perda de massa óssea induzida por ovariectomia. Outra evidência do papel dos adrenorreceptores β 2 na mediação das ações do SNS no tecido ósseo é o fato de que a administração de agonistas e antagonistas β -adrenérgicos levam, respectivamente, à perda e ao ganho de massa óssea [30-32].

Considerando-se que o HT interage com o SNS para regular uma série de processos fisiológicos, levantamos a hipótese de que essa interação também ocorre para regular a massa e estrutura ósseas. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar se o HT interage com o SNS, via receptor β 2-adrenérgico, para regular a microarquitetura óssea trabecular e cortical, bem como propriedades biomecânicas do fêmur, um sítio do esqueleto bastante sensível ao HT [44, 45].

Para tanto, camundongos fêmeas e machos Selv e β 2-AR, de 120 dias de idade, foram submetidos à administração diária e intraperitoneal de 10 ou 20 vezes a dose fisiológica de triiodotironina (3,5 μ g e 7 μ g de T3/100g de peso corporal/dia, respectivamente), por 90 dias. Ao final do tratamento, a massa cardíaca foi estimada para avaliarmos hipertrofia cardíaca, um efeito conhecido da tireotoxicose [46-48]. A hipertrofia cardíaca é resultado de ações diretas do T3 no coração e é, também, resultado do aumento da pressão arterial, causada pela própria tireotoxicose [49]. Como esperado, observamos aumento da massa cardíaca nos animais machos Selv e β 2-AR^{-/-} tratados com 20xT3, mostrando que esse tratamento foi efetivo em

promover a tireotoxicose. Já os animais fêmeas Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ tratados com T3 apresentaram apenas um leve aumento na massa cardíaca, porém estes aumentos não foram significativos.

Apesar da presença de $\beta 2\text{-AR}$ na cartilagem de crescimento [21], o excesso do HT praticamente não causou alterações importantes no comprimento corporal e comprimento do fêmur dos animais fêmeas e machos Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Certamente, a idade selecionada para este estudo não é apropriada para investigarmos o efeito do HT no crescimento ósseo, o que não é objetivo deste projeto. A análise futura de camundongos mais jovens permitirá a avaliação de uma possível interação do HT com o SNS, via sinalização $\beta 2$ -adrenérgica, no crescimento longitudinal ósseo.

Quanto à MC, não houve diferença, no presente estudo, entre os animais Selv e $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, tanto fêmeas quanto machos. Além disso, o tratamento com doses suprafisiológicas de T3 praticamente não alterou a MC dos animais Selv (FVB) e KO. Esse achado está de acordo com estudos anteriores em ratos, que mostraram que doses suprafisiológicas de T3 não alteraram a MC [50, 51]. No entanto, o tratamento com 20xT3 aumentou significativamente a MC nos machos Selv, especialmente entre a 9ª e 12ª semana de tratamento, quando os animais estavam com 183 a 204 dias de idade. Estudos anteriores em camundongos C57BL/6NTac também identificaram um aumento na MC como consequência do hipertireoidismo, mas principalmente em fêmeas [52, 53], o que provavelmente resulta do aumento da ingestão de água e alimentos induzidos pela tireotoxicose. Por outro lado, em um estudo anterior do nosso grupo, encontramos uma diminuição significativa da MC, induzida pela tireotoxicose, observada em camundongos C57BL/6J (C57), entre 6 a 12 semanas de tratamento com as mesmas doses de T3 utilizadas no presente estudo [38]. Em ratos, doses suprafisiológicas de T3 mostraram aumentar a taxa metabólica basal, com um aumento compensatório na ingestão de alimentos, resultando em nenhuma mudança na MC [50, 51]. Essas diferenças quanto ao efeito do excesso de HT na MC são provavelmente explicadas pelo diferente *background* genético dos animais (diferentes linhagens de camundongos e camundongos versus ratos), além de fatores específicos de idade e sexo. Corroborando essa hipótese, um estudo de Dong-Hoon Kim et al [54] mostrou que camundongos de diferentes linhagens apresentaram diversas susceptibilidades para ganhar ou perder MC, quando expostos a uma mesma dieta obesogênica e alojados nas mesmas

condições, o que reforça a ideia de que as diferenças genéticas contribuem de forma importante para a variabilidade de respostas de MC ao HT.

Quanto à microarquitetura do osso trabecular do fêmur de camundongos fêmeas, vimos que o tratamento com doses suprafisiológicas de T3 causou efeitos deletérios na microarquitetura trabecular das fêmeas Selv, enquanto alguns desses efeitos foram mais brandos ou inexistentes nos animais $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$. Esses achados demonstram que a falta do $\beta 2\text{-AR}$ leva a uma resistência do osso trabecular aos efeitos deletérios da tireotoxicose em camundongos fêmeas. Por outro lado, os camundongos machos Selv se mostraram mais resistentes do que as fêmeas aos efeitos da tireotoxicose no osso trabecular. Mais importante ainda foi que, nos machos, a falta do $\beta 2\text{-AR}$ fez com que o osso trabecular se tornasse um pouco mais sensível aos efeitos deletérios de doses tóxicas de HT. O fato da falta do $\beta 2\text{-AR}$ modificar a resposta do osso trabecular ao HT, tanto em machos quanto em fêmeas, revela uma interação do SNS com o HT, via $\beta 2\text{-AR}$, para regular a microarquitetura óssea trabecular. Por outro lado, a contrastante sensibilidade do osso trabecular dos machos e fêmeas $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ à tireotoxicose sugere que fatores sexuais têm um importante papel na interação do HT com o SNS, via $\beta 2\text{-AR}$, para regular a morfofisiologia óssea.

Com relação ao osso cortical femoral, vimos que o tratamento com dose suprafisiológica de T3 causou aumento do perímetro do endóstio (Ec.Pm), levando a um aumento da área medular (Ma.Ar) e a uma diminuição da espessura do osso cortical (Ct.Th) em fêmeas Selv, o que foi acompanhado por um aumento da porosidade cortical (Ct.Po). Todos esses efeitos deletérios da tireotoxicose no osso cortical femoral não foram observados nas fêmeas com deleção do $\beta 2\text{-AR}$, sugerindo, mais uma vez, que o HT interage com a via de sinalização deste receptor para promover os seus efeitos deletérios no osso cortical. Efeitos similares da tireotoxicose foram observados no osso cortical dos camundongos machos Selv. Houve aumento do perímetro endosteal e da área medular nos animais tireotóxicos Selv. Entretanto, houve um aumento do perímetro periosteal, o que compensou o aumento do perímetro endosteal, e impediu a diminuição da espessura do osso cortical (Ct.Th), observada nas fêmeas. Assim como nas fêmeas, a deleção do $\beta 2\text{-AR}$ bloqueou o efeito deletério da tireotoxicose no perímetro endosteal e na área medular. Esses achados sugerem fortemente que uma interação entre o HT e o

SNS, envolvendo o $\beta 2$ -AR, é essencial para que o HT, em excesso, promova reabsorção óssea endosteal no fêmur (Fig. 12), tanto em machos, quanto em fêmeas.

Fig. 12. Representação esquemática da interação entre o hormônio tireoidiano e o $\beta 2$ -AR no osso cortical. O T3 interage com o seu receptor (TR) para promover a reabsorção óssea cortical endosteal e intracortical, em um mecanismo que depende da via de sinalização do $\beta 2$ -AR.

Por outro lado, a presença do $\beta 2$ -AR se mostra importante para que o HT, em excesso, promova efeitos deletérios sobre osso trabecular femoral de fêmeas, mas não de machos. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que camundongos fêmeas com duplo KO para os adrenorreceptores $\alpha 2A$ -AR e $\alpha 2C$ -AR [20] ou com deleção isolada do $\alpha 2C$ -AR [38] também apresentam resistência aos efeitos deletérios da tireotoxicose tanto no osso trabecular quanto no osso cortical do fêmur de camundongos fêmeas. Assim sendo, esses achados sugerem que a interação do HT com o SNS para regular a microarquitetura óssea trabecular e cortical envolve tanto a sinalização $\alpha 2$ quanto $\beta 2$ adrenérgica, além de envolver fatores sexuais.

Através da análise histomorfométrica, observou-se que a tireotoxicose aumentou significativamente a taxa de mineralização óssea (*mineralization apposition rate* - MAR), na região endocortical da tíbia (Ec.MAR), apenas em camundongos fêmeas Selv e não em fêmeas KO, o que é consistente com o aumento na formação óssea induzido pela tireotoxicose [15]. Por outro lado, os aumentos de Ec.Pm e Ma.AR, combinados com o aumento de Ec.MAR, são consistentes com o aumento da remodelação do osso cortical induzido pela tireotoxicose, com predomínio de reabsorção óssea endocortical [15, 55]. Nos machos, o T3 tendeu a aumentar Ec.MAR, mas este não foi estatisticamente

significativo, mostrando que a resposta do osso cortical à tireotoxicose é influenciada pelo sexo. O aumento de Ec.Pm e Ma.AR, com Ec.MAR normal na diáfise tibial de machos, sugere que a tireotoxicose ativa principalmente a reabsorção óssea endocortical em machos. Em conjunto, estes achados demonstram que o HT depende da sinalização $\beta 2$ adrenérgica para promover aumentos na formação e reabsorção óssea endocortical em camundongos fêmeas, enquanto depende da sinalização $\beta 2$ para aumentar apenas a reabsorção óssea endocortical em machos.

No presente estudo, observamos, ainda, que o impacto do tratamento com as doses suprafisiológicas de T3 sobre parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais Selv e KO está de acordo com os achados referentes à microarquitetura óssea. Através do teste de flexão de três pontos, vimos que o tratamento com T3 causou reduções significativas na carga máxima, tenacidade, rigidez e resiliência do fêmur dos camundongos fêmeas Selv. Em contraste, nenhum desses parâmetros biomecânicos foi afetado pelo tratamento com T3 no fêmur das fêmeas KO, evidenciando, mais uma vez, uma resistência desses animais aos efeitos deletérios da tireotoxicose no tecido ósseo. Por outro lado, os camundongos machos Selv e KO se mostraram resistentes aos efeitos deletérios do tratamento com doses suprafisiológicas de T3 sobre os parâmetros biomecânicos do fêmur, o que reforça a importância de fatores sexuais nas ações do HT no esqueleto e na sua interação com o SNS para regular a morfofisiologia óssea.

De fato, estudos recentes em camundongos mostraram que o sexo modula a ação da HT de maneira dependente de órgãos e funções específicas, e que as diferenças entre os sexos são mais pronunciadas nas condições de hipertireoidismo [52, 53]. Em camundongos C57BL/6N, o tratamento com doses suprafisiológicas de T4 resultou em T4 total duas vezes maior e concentrações séricas de T4 e T3 livre em fêmeas adultas e idosas comparadas a animais machos [52]. As fêmeas com hipertireoidismo também apresentaram aumento de peso e temperatura corporal, aumento da atividade e melhor coordenação motora do que os machos na mesma condição. Em contraste, uma diminuição de força muscular e coordenação motora induzida pelo excesso de HT foi mais pronunciada em camundongos machos. Por outro lado, nenhum impacto sexual foi encontrado na frequência cardíaca [52, 53]. No presente estudo, encontramos influência do gênero nas ações do HT na MC, massa cardíaca, microarquitetura do osso trabecular e cortical, Ec.MAR tibial e

biomecânica óssea. Em geral, tanto o osso trabecular como o cortical do fêmur mostraram-se mais sensíveis ao excesso de HT em fêmeas do que em machos. Curiosamente, a disfunção tireoidiana, ou seja, hiper e hipotireoidismo são mais prevalentes nas mulheres em comparação aos homens [56], mas a influência do sexo nas manifestações clínicas e nos desfechos das disfunções tireoidianas ainda não foi claramente investigada e descrita. Interessantemente, um estudo recente mostrou que as mulheres manifestam significativamente mais sintomas após a terapia de reposição de HT do que os homens [57]. Além disso, o risco de redução da densidade mineral óssea parece estar aumentado em mulheres com hipertireoidismo, na pós-menopausa, em comparação aos homens [58-60]. O presente estudo mostra claramente que o gênero é um importante modificador da manifestação fenotípica da tireotoxicose no esqueleto, bem como um modificador da interação do HT com o SNS para controlar a microarquitetura óssea e a função biomecânica.

É digno de nota que, no presente estudo, não encontramos aumento do volume ósseo trabecular e cortical em camundongos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ fêmeas e machos, em relação aos animais Selv. Além disso, Ec.MAR estava aumentado apenas em camundongos fêmeas $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ e não em machos KO (vs. controles Selv). Esses achados contrastam dados publicados que mostram que camundongos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ fêmeas e machos apresentam um fenótipo alta massa óssea no fêmur e vértebra aos 6 meses de idade, secundário ao aumento da formação óssea e diminuição da reabsorção óssea [29]. Uma possível explicação para essa discrepância é o diferente background genético dos animais KO usados nesses estudos. Enquanto o background genético dos camundongos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$, neste estudo, foi apenas a linhagem de camundongos FVB/N [39], o estudo de Elefteriou et al analisou os camundongos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ combinados com os modelos 129SvJ e FVB/N [29, 61]. Interessantemente, Pierroz et al [40] cruzaram camundongos com duplo KO para $\beta 1\text{-AR}$ e $\beta 2\text{-AR}$ (camundongos $\text{Adrb1b2}^{-/-}$), em um background genético misto de 129SvJ, FVB/N, C57BL/6J, com seus controles Selv, e em seguida os camundongos $\text{Adrb1b2}^{+/-}$ de dupla heterozigose foram cruzados entre si por seis gerações para gerar camundongos $\text{Adrb1}^{-/-}$ e $\text{Adrb2}^{-/-}$ específicos. Eles descobriram que os camundongos $\text{Adrb2}^{-/-}$ com quatro meses de idade apresentaram BV/TV vertebral e Tb.Th significativamente mais altos que os Selv controle. Por outro lado, o BV/TV e

Tb.N no fêmur distal foram significativamente menores em camundongos $Adrb2^{-/-}$ em relação ao Selv controle. Em conjunto, estas observações sustentam a ideia de que os fenótipos esqueléticos divergentes entre diferentes espécies de camundongos $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ dependem da diferente linhagem genética de cada espécie de camundongo.

É notável que os achados do presente estudo são corroborados por aqueles de um estudo anterior, [62], em que camundongos B6 fêmeas com noventa dias de idade foram tratados por seis semanas com uma dose suprafisiológica de tiroxina (10 vezes a dose fisiológica de T4 = 10xT4) isolada ou combinada com propranolol. Como esperado, o tratamento com 10xT4, após seis semanas, afetou negativamente a densidade mineral óssea (DMO), determinada por DXA, no fêmur total, na diáfise do fêmur e no fêmur distal. A administração apenas de propranolol não teve nenhum efeito na DMO em qualquer sítio femoral, mas preveniu o efeito prejudicial da tireotoxicose na DMO do fêmur total e distal. Conseqüentemente, a carga máxima e a rigidez femoral (determinadas pelo teste de flexão de três pontos) foram significativamente diminuídas pelo tratamento com T4. O tratamento com propranolol novamente não melhorou esses parâmetros biomecânicos no fêmur de camundongos eutireoidianos, mas evitou a redução desses parâmetros nos fêmures de camundongos tratados com T4 [62]. Com tudo, esses achados apoiam ainda mais a interação HT-SNS, envolvendo a sinalização $\beta 2\text{-AR}$, para regular a massa óssea e a resistência à fratura.

Na tentativa de entendermos mecanismos dessa interação, avaliamos a expressão gênica dos fatores que compõem o sistema RANK-RANKL-OPG, OC e TRAP. Nenhum desses fatores teve a sua expressão gênica alterada pelo tratamento com T3 e/ou pela inativação do $\beta 2\text{-AR}$, o que sugere que outros fatores devam participar da referida interação.

Em resumo, o presente estudo revela que (i) HT depende da sinalização $\beta 2\text{-AR}$ para promover seus efeitos deletérios nos compartimentos trabecular e cortical do fêmur em camundongos fêmeas e na cortical femoral em camundongos machos; (ii) em geral, os compartimentos ósseos trabecular e cortical do fêmur são menos sensíveis à tireotoxicose em camundongos machos do que em fêmeas, (iii) o gênero é um modificador importante das ações de HT no esqueleto, além de modificar as interações do HT com o SNS para controlar morfofisiologia óssea.

Em conclusão, estes novos achados mostram que a sinalização β 2-AR tem um papel importante no mecanismo pelo qual o TH promove efeitos deletérios na microarquitetura óssea, remodelação óssea e resistência óssea à fratura, especialmente em mulheres e osso cortical. Assim sendo, o uso de beta bloqueadores na tireotoxicose pode, não apenas contribuir para a melhoria dos sintomas adrenérgicos que acompanham essa condição, tais como taquicardia, tremor e ansiedade [63], mas também pode contribuir para proteger o tecido ósseo dos efeitos deletérios da tireotoxicose, principalmente em fêmeas.

Referências Bibliográficas

1. Guyton, *Tratado de Fisiologia Médica*. Vol. 12 edição. 2011.
2. Abdalla, S.M. and A.C. Bianco, *Defending plasma T3 is a biological priority*. Clin Endocrinol (Oxf), 2014. 81(5): p. 633-41.
3. Bianco, A.C., et al., *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases*. Endocr Rev, 2002. 23(1): p. 38-89.
4. Freedman, L.P., *Anatomy of the steroid receptor zinc finger region*. Endocr Rev, 1992. 13(2): p. 129-45.
5. Katz, D. and M.A. Lazar, *Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes*. J Biol Chem, 1993. 268(28): p. 20904-10.
6. Abu, E.O., et al., *The expression of thyroid hormone receptors in human bone*. Bone, 1997. 21(2): p. 137-42.
7. Williams, G.R., R. Bland, and M.C. Sheppard, *Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling*. Endocrinology, 1994. 135(6): p. 2375-85.
8. Gauthier, K., et al., *Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus*. Mol Cell Biol, 2001. 21(14): p. 4748-60.
9. O'Shea, P.J., et al., *A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone*. Mol Endocrinol, 2003. 17(7): p. 1410-24.
10. Stevens, D.A., et al., *Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation*. J Bone Miner Res, 2000. 15(12): p. 2431-42.
11. O'Shea, P.J., et al., *Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormone receptor alpha1 or beta*. Mol Endocrinol, 2005. 19(12): p. 3045-59.
12. Beber, E.H., et al., *The thyroid hormone receptor (TR) beta-selective agonist GC-1 inhibits proliferation but induces differentiation and TR beta mRNA expression in mouse and rat osteoblast-like cells*. Calcif Tissue Int, 2009. 84(4): p. 324-33.
13. Freitas, F.R., et al., *The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats*. J Bone Miner Res, 2005. 20(2): p. 294-304.
14. Allain, T.J., et al., *A histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats*. Bone, 1995. 16(5): p. 505-9.
15. Mosekilde, L. and F. Melsen, *A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism*. Acta Med Scand, 1978. 204(1-2): p. 97-102.
16. Ray, R.D., et al., *Growth and differentiation of the skeleton in thyroidectomized-hypophysectomized rats treated with thyroxine, growth hormone, and combination*. J Bone Joint Surg Am, 1954. 36-A(1): p. 94-103.
17. Eriksen, E.F., L. Mosekilde, and F. Melsen, *Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle*. Bone, 1986. 7(2): p. 101-8.
18. Hervas, F., G. Morreale de Escobar, and F. Escobar Del Rey, *Rapid effects of single small doses of L-thyroxine and triiodo-L-thyronine on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunoassay*. Endocrinology, 1975. 97(1): p. 91-101.
19. Ruffolo, R.R., Jr., A.J. Nichols, and J.P. Hieble, *Metabolic regulation by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors*. Life Sci, 1991. 49(3): p. 171-83.

20. Fonseca, T.L., et al., *Thyroid hormone interacts with the sympathetic nervous system to modulate bone mass and structure in young adult mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. 307(4): p. E408-18.
21. Fonseca, T.L., et al., *Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype*. J Bone Miner Res, 2011. 26(3): p. 591-603.
22. Brum, P.C., et al., *Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(5): p. H1838-45.
23. Ruffolo, R.R., Jr., et al., *Structure and function of alpha-adrenoceptors*. Pharmacol Rev, 1991. 43(4): p. 475-505.
24. Ducy, P., et al., *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass*. Cell, 2000. 100(2): p. 197-207.
25. Togari, A., *Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells*. Microsc Res Tech, 2002. 58(2): p. 77-84.
26. Takeda, S., et al., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system*. Cell, 2002. 111(3): p. 305-17.
27. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture*. Cell, 1996. 87(3): p. 377-89.
28. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. Nature, 1998. 395(6704): p. 763-70.
29. Elefteriou, F., et al., *Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART*. Nature, 2005. 434(7032): p. 514-20.
30. Bonnet, N., et al., *Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats*. Bone, 2005. 37(5): p. 622-33.
31. Cavalie, H., et al., *Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats*. J Appl Physiol (1985), 2002. 93(6): p. 2034-7.
32. Martineau, L., et al., *Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men*. Clin Sci (Lond), 1992. 83(5): p. 615-21.
33. Beylot, M., et al., *[Effects of propranolol and indomethacin upon urinary hydroxyproline in hyperthyroid patients (author's transl)]*. Nouv Presse Med, 1982. 11(13): p. 989-91.
34. Rude, R.K., et al., *Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol*. N Engl J Med, 1976. 294(8): p. 431-3.
35. Tse, J., et al., *Effects of triiodothyronine pretreatment on beta-adrenergic responses in stunned cardiac myocytes*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2003. 17(4): p. 486-90.
36. Kim, B., S.D. Carvalho-Bianco, and P.R. Larsen, *Thyroid hormone and adrenergic signaling in the heart*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2004. 48(1): p. 171-5.
37. Carvalho-Bianco, S.D., et al., *Chronic cardiac-specific thyrotoxicosis increases myocardial beta-adrenergic responsiveness*. Mol Endocrinol, 2004. 18(7): p. 1840-9.
38. Cruz Grecco Teixeira, M.B., et al., *Lack of alpha2C-Adrenoceptor Results in Contrasting Phenotypes of Long Bones and Vertebra and Prevents the Thyrotoxicosis-Induced Osteopenia*. PLoS One, 2016. 11(1): p. e0146795.
39. Chruscinski, A.J., et al., *Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene*. J Biol Chem, 1999. 274(24): p. 16694-700.
40. Pierroz, D.D., et al., *Deletion of beta-adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation*. J Bone Miner Res, 2012. 27(6): p. 1252-62.
41. Elefteriou, F., P. Campbell, and Y. Ma, *Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system*. Calcif Tissue Int, 2014. 94(1): p. 140-51.
42. Bonnet, N., D.D. Pierroz, and S.L. Ferrari, *Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2008. 8(2): p. 94-104.

43. Kondo, H., et al., *Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system*. J Biol Chem, 2005. 280(34): p. 30192-200.
44. Ongphiphadhanakul, B., et al., *Excessive L-thyroxine therapy decreases femoral bone mineral densities in the male rat: effect of hypogonadism and calcitonin*. J Bone Miner Res, 1992. 7(10): p. 1227-31.
45. Suwanwalaikorn, S., et al., *Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats*. Eur J Endocrinol, 1996. 134(5): p. 655-9.
46. Sanford, C.F., E.E. Griffin, and K. Wildenthal, *Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats*. Circ Res, 1978. 43(5): p. 688-94.
47. Siehl, D., et al., *Faster protein and ribosome synthesis in thyroxine-induced hypertrophy of rat heart*. Am J Physiol, 1985. 248(3 Pt 1): p. C309-19.
48. Hu, L.W., E.A. Liberti, and M.L. Barreto-Chaves, *Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats*. Virchows Arch, 2005. 446(3): p. 265-9.
49. Vargas-Uricoechea, H. and A. Bonelo-Perdomo, *Thyroid Dysfunction and Heart Failure: Mechanisms and Associations*. Curr Heart Fail Rep, 2017. 14(1): p. 48-58.
50. Soukup, T., et al., *Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status*. Physiol Res, 2001. 50(6): p. 619-26.
51. Villicev, C.M., et al., *Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats*. J Endocrinol, 2007. 193(1): p. 21-9.
52. Rakov, H., et al., *Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in aged mice*. Biol Sex Differ, 2017. 8(1): p. 38.
53. Rakov, H., et al., *Sex-specific phenotypes of hyperthyroidism and hypothyroidism in mice*. Biol Sex Differ, 2016. 7(1): p. 36.
54. Kim, D.H., et al., *Increased adipose tissue hypoxia and capacity for angiogenesis and inflammation in young diet-sensitive C57 mice compared with diet-resistant FVB mice*. Int J Obes (Lond), 2013. 37(6): p. 853-60.
55. High, W.B., C.C. Capen, and H.E. Black, *Effects of thyroxine on cortical bone remodeling in adult dogs: a histomorphometric study*. Am J Pathol, 1981. 102(3): p. 438-46.
56. Vanderpump, M.P., *The epidemiology of thyroid disease*. Br Med Bull, 2011. 99: p. 39-51.
57. Carle, A., et al., *Gender differences in symptoms of hypothyroidism: a population-based DanThyr study*. Clin Endocrinol (Oxf), 2015. 83(5): p. 717-25.
58. Mammen, J.S., et al., *Thyroid Hormone Therapy and Risk of Thyrotoxicosis in Community-Resident Older Adults: Findings from the Baltimore Longitudinal Study of Aging*. Thyroid, 2015. 25(9): p. 979-86.
59. Vestergaard, P. and L. Mosekilde, *Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients*. Thyroid, 2002. 12(5): p. 411-9.
60. Blum, M.R., et al., *Subclinical thyroid dysfunction and fracture risk: a meta-analysis*. JAMA, 2015. 313(20): p. 2055-65.
61. Rohrer, D.K., et al., *Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors*. J Biol Chem, 1999. 274(24): p. 16701-8.
62. Fonseca, T.d.L., *Interação do sistema nervoso simpático com o hormônio tireoideano na regulação da massa e metabolismo ósseos*, in Instituto de Ciências Biomédicas da USP - Departamento de Anatomia. 2009, Universidade de São Paulo - USP: São Paulo - SP.
63. Silva, J.E. and S.D. Bianco, *Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications*. Thyroid, 2008. 18(2): p. 157-65.