

**CRISTIANE CABRAL COSTA**

**EFEITO DA TRIIODOTIRONINA E DO GC-1,  
UM TIREOMIMÉTICO SELETIVO PELA  
ISOFORMA  $\beta$  DO RECEPTOR DE HORMÔNIO  
TIREOIDEANO, SOBRE PARÂMETROS  
HISTOMORFOMÉTRICOS E BIOMECÂNICOS  
DO TECIDO ÓSSEO DE ROEDORES  
ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Cecília H. de A. Gouveia

São Paulo  
2008

## RESUMO

Costa CC. Efeito da triiodotironina e do GC-1, um tireomimético seletivo pela isoforma  $\beta$  do receptor de hormônio tireoideano, sobre parâmetros histomorfométricos e biomecânicos do tecido ósseo de roedores adultos [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Sabe-se que o excesso de hormônios tireoideanos (HT) leva a um aumento da atividade osteoblástica e osteoclástica, com predomínio da última, o que leva à perda de massa óssea. Sabe-se, ainda, que diferentes isoformas de receptores nucleares de HT ( $TR\alpha 1$ ,  $TR\alpha 2$  e  $TR\beta 1$ ) são expressos no tecido ósseo, entretanto, o papel funcional de cada TR é pouco entendido. Em um primeiro estudo, avaliamos o efeito de doses crescentes de triiodotironina (T3) na massa, estrutura e biomecânica ósseas de ratas Wistar adultas e investigamos o mecanismo através do qual o T3 promoveu osteopenia por histomorfometria óssea. Ratas de 140 dias de idade foram tratadas com 2.5x; 5x; 10x, 20x e 40x a dose fisiológica de T3 (0.3  $\mu\text{g}/100$  g PC/dia) por 10 semanas. No fêmur, houve diminuição, dose-dependente, na densidade mineral óssea (BMD), no volume de osso trabecular (BV/TV), na espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th) e na espessura de osso cortical (Ct.Wi). Vimos, ainda, aumento na taxa de aposição mineral (MAR) e na taxa de formação óssea (BFR) até a dose de 10xT3. Em doses mais elevadas, 20x ou 40xT3, observamos redução na BFR, na superfície osteoclástica (Oc.S/BS) e na superfície de erosão óssea (ES/BS), em relação aos animais tratados com 10xT3. Esses resultados mostram que, até um certo grau de tireotoxicose (determinada por 10xT3 neste estudo), a osteopenia ocorre em função de um aumento da formação e reabsorção ósseas, com predomínio da última. Em graus mais elevados de tireotoxicose, a osteopenia ocorre em função de uma redução no remodelamento ósseo, mas ainda com predomínio da atividade reabsortiva. Em um segundo estudo, comparamos os efeitos do T3 e GC-1, um análogo do T3 seletivo pelo  $TR\beta$ , na estrutura trabecular e em parâmetros biomecânicos do tecido ósseo de camundongos fêmeas C57BL/6J adultas de 130 dias de idade. Os camundongos foram tratados com metimazol (0,1%) e perclorato de sódio (1%) adicionados à água de beber, para inativação da função tireoideana, e com doses crescentes de T3 (10x, 20x ou 40x a dose fisiológica = 0.35  $\mu\text{g}/100$  g PC/dia, i.p.) ou doses equimolares de GC-1 por 60 dias. Na tíbia, o tratamento com T3 promoveu redução na resistência (avaliada pela carga máxima aplicada ao osso), na rigidez e na resiliência (capacidade do osso em sofrer deformação elástica) ósseas. Por outro lado, e surpreendentemente, o GC-1 promoveu

aumento na resistência, rigidez e resiliência ósseas, além de alterar positivamente a estrutura trabecular: aumentou a Tb.Th. Esses achados mostram que, *in vivo*, o tecido ósseo de camundongos é responsivo ao GC-1 e que a administração desse análogo melhora a qualidade óssea. Considerando-se a seletividade do GC-1 pelo TR $\beta$  e os efeitos positivos desse análogo sobre os parâmetros biomecânicos da tíbia, os nossos achados sugerem que o TR $\beta$  medeia predominantemente ações anabólicas e positivas do T3 no tecido ósseo.

**Palavras-Chave:** Hormônio da tireóide; Receptor do hormônio tireoideano; GC-1; Densitometria óssea; Histomorfometria óssea; Qualidade óssea.

## ABSTRACT

Costa CC. Effect of triiodothyronine and GC-1, a thyroid hormone receptor  $\beta$ -selective thyromimetic, on histomorphometric and biomechanical parameters of bone tissue of adults rodents [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

It is well known that the excess of thyroid hormones (TH) increases the osteoblastic and osteoclastic activities, where the latter predominates favoring bone loss. It is also known that different isoforms of nuclear TH receptor ( $TR\alpha_1$ ,  $TR\alpha_2$  e  $TR\beta_1$ ) are expressed in the bone tissue. However, the physiological role of each TR isoform is unclear. In a first study, we evaluated the effects of increasing doses of triiodothyronine (T3) on bone mass, structure and biomechanics of adult female Wistar rats and the mechanisms by which T3 promotes osteopenia, by bone histomorphometry. 140 day-old rats were treated with 2.5x; 5x; 10x, 20x e 40x the physiological dose of T3 (0.3  $\mu$ g/100 g BW/day) for 10 weeks. In the femur, there was a dose-dependent decrease in the bone mineral density (BMD), trabecular bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and in the cortical bone width (Ct.Wi). We also detected an increase in the Mineral Appositional Rate (MAR) and in the Bone Formation Rate (BFR) up to 10xT3. With higher doses, 20x or 40xT3, a reduction in BFR, osteoclastic surface (Oc.S/BS) and in erosion surface (ES/BS), compared to animals treated with 10xT3, was observed. These results show that T3 treatment with doses up to 10xT3 induces osteopenia as a consequence of an increase in bone formation and resorption, with a predominance of the latter. In more severe thyrotoxicosis, the osteopenia is the result of a reduction in bone remodeling, with a predominance of bone resorption as well. In a second study, the effects of T3 and GC-1, a  $TR\beta$ -selective T3 analog, were compared. Trabecular structure and biomechanical parameters of bone tissue of adult female C57BL/6J mice (130 day-old) were analyzed. Animals we treated with metimazole (0.1%) and sodium perchlorate (1%) added to drinking water, to inhibit thyroid function. They were also treated with increasing doses of T3 (10x, 20x or 40x the physiological dose = 0.35  $\mu$ g/100 g BW/day, i.p.) or equimolar doses of GC-1 for 60 days. In the tibia, the treatment promoted reduction in bone resistance (evaluated by the maximal load applied to the bone), stiffness and resilience (bone capacity of suffering elastic deformation). On the other hand, and surprisingly, GC-1 promoted an increase in bone resistance, stiffness and resilience, besides improving the trabecular structure, increasing Tb.Th. These findings show that the bone tissue of mice is

responsive to GC-1 and that its administration improves bone quality. Considering the TR $\beta$  selectivity of GC-1 and the positive effects of this analog on tibial biomechanical parameters, our findings suggest that TR $\beta$  mainly mediates anabolic and positive actions of T3 on bone tissue.

**Key words:** Thyroid Hormone; Thyroid Hormone Receptor; GC-1, Bone densitometry; Bone histomorphometry; Bone quality.

---

## 1 INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoideanos (HT) são essenciais para o desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos normais. Estudos com animais experimentais e estudos clínicos mostram que tanto a deficiência quanto o excesso de HT resultam em efeitos importantes no esqueleto. Durante o desenvolvimento, a deficiência dos HT causa atraso na maturação do esqueleto e disgnese das epífises, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas (Allain e McGregor, 1993). Por outro lado, o excesso de HT resulta em maturação esquelética acelerada, fechamento prematuro das placas de crescimento e subsequente diminuição do crescimento dos membros (Gouveia, 2004).

Os HTs também têm efeito no osso do adulto, sendo importante para a manutenção do metabolismo ósseo, uma vez que estimulam tanto a formação quanto a reabsorção óssea, por regular a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Uma série de estudos mostra 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 e Mosekilde, 1977).

Entretanto, em um estudo recente do nosso grupo (dados não publicados), vimos que, na tireotoxicose gerada por alta dose de triiodotironina (T3), a atividade osteoblástica foi inibida e a atividade osteoclástica mantida, com conseqüente perda de massa óssea. Vimos que a taxa de formação óssea foi significativamente reduzida pelo T3, em aproximadamente 80%. Somando-se a isso, o T3 também reduziu a taxa de mineralização óssea (MAR) e a superfície de mineralização óssea (MS/BS) em 50% e 51%, respectivamente. Por outro lado, a atividade osteoclástica foi mantida com uma tendência a aumento, o que foi evidenciado por tendências no aumento da superfície de erosão óssea e da superfície osteoclástica (51% e 17%, respectivamente, *versus* controle). Esses achados são parcialmente corroborados por um estudo de Mosekilde, *et al.*, (1977), onde a correlação entre parâmetros histomorfométricos e a função tireoideana foram investigados. Este estudo mostrou que o remodelamento ósseo estava aumentado em pacientes hipertireoideos, com aumento tanto na reabsorção quanto na formação óssea, entretanto, a reabsorção óssea estava positivamente correlacionada com a atividade tireoideana, enquanto que a formação estava inversamente correlacionada. Esses autores mostraram que a MAR não foi alterada, e que a MS/BS diminuiu com o aumento da

---

atividade tireoideana. Isso indica que a mineralização e a formação ósseas são maiores em pacientes com hipertireoidismo brando a moderado do que em pacientes com hipertireoidismo severo (Mosekilde, *et al.*, 1977). Esses achados sugerem que a severidade da tireotoxicose possa alterar o mecanismo através do qual o excesso de HT leva a perda de massa óssea. Assim sendo, no presente estudo, tivemos como um primeiro objetivo investigar o mecanismo através do qual os HT causam osteopenia em ratas adultas. Para essa investigação, avaliamos o impacto de diferentes graus de tireotoxicose no tecido ósseo dos animais.

É importante dizer que os efeitos osteopênicos do excesso de HT foram primeiramente descritos 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 do qual os HT levam à perda de massa óssea devem contribuir para o entendimento da patofisiologia da osteoporose.

Embora a importância dos HT no desenvolvimento e metabolismo ósseos seja clara, pouco se sabe a respeito dos mecanismos que medeiam os seus efeitos no tecido ósseo. Sabe-se que os HT atuam indiretamente nesse tecido por aumentar a secreção de hormônio do crescimento (GH) e *insulin-like growth factor-1* (IGF-I), fatores que apresentam efeitos diretos importantes no tecido ósseo. Contudo, acredita-se que os HT também atuem diretamente no esqueleto modulando a expressão de genes alvo via receptores nucleares específicos (TRs). A identificação de TRs em células osteoblásticas e osteoclasticas (Rizzoli, Poser e Burgi, 1986; Sato, *et al.*, 1987; Lebron, *et al.*, 1989), bem como a responsividade dessas células aos HT em culturas isoladas (Abu, *et al.*, 1997), evidenciam uma ação direta do T3 no tecido ósseo.

A presença de TRs foi identificada primeiramente em linhagens de células osteoblasto-like de ratos (ROS17/2.8 cells, UMR-106) (Rizzoli, Poser e Burgi, 1986; Sato, *et al.*, 1987; Lebron, *et al.*, 1989) e camundongos (MC3T3-E1) (Kasono, *et al.*, 1988) através de estudos de *binding*. Estudos similares identificaram sítios de ligação de T3 também no núcleo de células ósseas originárias de culturas primárias de ratos adultos (Egrise, *et al.*, 1990) e de células de calvárias de camundongos (Krieger, Stappenbeck e Stern, 1988). Aumentos na secreção de osteocalcina (OC) (Sato, *et al.*, 1986; Egrise, *et al.*, 1990) e na atividade da fosfatase alcalina (ALP) (Kasono, *et al.*, 1988; Egrise, *et al.*, 1990) dessas células sugeriram um acoplamento dos TRs com as respostas biológicas ao T3. Posteriormente, a presença de mRNA e proteína das isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 foram identificadas em células de osteosarcoma de ratos (Allain, *et al.*, 1996; Williams, Bland e Sheppard, 1994, 1995). Há

---

pouco mais de dez anos, Allain, *et al.*, (1996) identificaram a presença de todas as isoformas conhecidas de TR, com exceção de TR $\beta$ 2, no núcleo de células osteoclásticas humanas, originárias de osteoclastoma. Abu, *et al.*, (1997) confirmaram a presença de TRs em osteoclastos humanos através de hibridização *in situ*. A presença de TRs também foi demonstrada nos condrócitos das placas de crescimento de humanos (Abu, *et al.*, 1997; Williams, Robson e Shalet, 1998) e de ratos (Ballock, *et al.*, 1999).

Apesar da identificação de TRs em células ósseas, a importância funcional das diferentes isoformas de TR é praticamente desconhecida no tecido ósseo. Williams, *et al.*, (1994) demonstraram que as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 estão presentes, funcionalmente e em proporções variadas, em três linhagens de células de osteosarcoma que expressam fenótipos de fibroblasto, preosteoblasto, e osteoblasto maduro (ROS 25/1, UMR 106 e ROS17/2.8, respectivamente), o que sugere uma possível mudança na ação do hormônio tireoideano durante o desenvolvimento ósseo (Williams, Bland e Sheppard, 1995). De fato, essas células apresentaram diferentes respostas ao tratamento com T3. Abu, *et al.*, (1997) demonstraram uma variação da expressão das isoformas de TR dependendo da localização/atividade de células ósseas humanas. Em locais de remodelamento ósseo, TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 foram amplamente expressos em osteoblastos, mas em superfícies de formação óssea, por ossificação intramembranosa apenas TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 foram detectados. Em superfícies de reabsorção óssea, TR $\beta$ 1 e TR $\alpha$ 2 foram encontrados em osteoclastos, enquanto TR $\alpha$ 1 foi detectado apenas raramente. Em regiões de ossificação endocondral, TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 foram identificados em condrócitos indiferenciados e TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 foram identificados em condrócitos maduros e hipertróficos. TR $\alpha$ 1 foi raramente identificado nessas células.

A inativação (*knockout*) e mutação (*knockin*) dos receptores de hormônio tireoideano em camundongos têm sido importantes ferramentas para desvendar o papel de cada uma das isoformas de TR nas diversas respostas ao T3. Esses modelos também têm sido importantes para a identificação dos tecidos-alvo nos quais o hormônio tireoideano tem papel fundamental.

Camundongos com a inativação isolada do TR $\alpha$ 1 (TR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup>) (Wikstrom, *et al.*, 1998) ou TR $\beta$  (TR $\beta$ <sup>-/-</sup>) praticamente não apresentaram alteração evidente no tecido ósseo. Por outro lado, camundongos com a inativação simultânea de TR $\alpha$ 1 e TR $\alpha$ 2 (TR $\alpha$ <sup>-/-</sup>) (Fraichard, *et al.*, 1997) e camundongos com a inativação de ambos os receptores  $\alpha$  e  $\beta$  [TR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup>TR $\beta$ <sup>-/-</sup> (Gothe, *et al.*, 1999) e TR $\alpha$ <sup>-/-</sup>TR $\beta$ <sup>-/-</sup> (Gauthier, *et al.*, 1999)] apresentaram praticamente o mesmo



fenótipo de retardo no crescimento e maturação ósseos, similar ao que ocorre no hipotireoidismo congênito (Ohlsson, *et al.*, 1993), mas com menos severidade. A falta de alteração evidente do crescimento e maturação ósseos nos camundongos TR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> e TR $\beta$ <sup>-/-</sup> sugere um substancial *overlap* da ação desses dois receptores no controle do desenvolvimento ósseo. Além disso, TR $\alpha$ 2 parece ter um papel importante nesse processo, uma vez que os mutantes TR $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> (Wikstrom, *et al.*, 1998), ao contrário dos camundongos TR $\alpha$ <sup>-/-</sup> (Fraichard, *et al.*, 1997), apresentaram crescimento e maturação ósseos praticamente normais. Kaneshige, *et al.*, (2000) geraram um camundongo *knockin*, com uma mutação na região carboxi-terminal (exon 10) do TR $\beta$ , derivada de uma paciente com resistência generalizada ao hormônio tireoideano (RTH). Esse receptor beta, denominado PV, não é capaz de ligar T3 e é um dos mais potentes mutantes negativo-dominantes do TR $\beta$ . Dentre outras alterações, o mutante PV apresentou níveis séricos elevados de TSH e T4 e atraso na maturação óssea. O fenótipo desenvolvido por todos esses camundongos mutantes sugere que uma complexa interação das diferentes isoformas de TR com os seus genes alvo medeia os efeitos do hormônio tireoideano no desenvolvimento e maturação ósseos e apontam o esqueleto como um importante tecido-alvo do T3.

Em um estudo recente do nosso grupo (Freitas, *et al.*, 2005), utilizamos o tireomimético seletivo pelo TR $\beta$ , o GC-1, como ferramenta farmacológica para investigar o papel das isoformas de TR em mediar os efeitos do T3 no desenvolvimento ósseo. Ratas hipotireoideas foram tratadas com T3 ou doses equimolares de GC-1 e o desenvolvimento esquelético foi analisado. Como esperado, o hipotireoidismo resultou em baixos níveis séricos de IGF-I, o que está de acordo com a conhecida supressão do eixo GH/IGF-I que acompanha o hipotireoidismo (Miki, *et al.*, 1992; Nanto-Salonen, *et al.*, 1993). Isso foi seguido por um fenótipo esquelético severo de retardo no crescimento, diminuição da massa óssea e defeito generalizado na ossificação endocondral. Enquanto o tratamento com T3 quase que completamente reverteu os defeitos esqueléticos decorrentes da deficiência de HT, o tratamento com GC-1 teve efeitos apenas parciais. É digno de nota que, diferentemente do T3, o GC-1 não foi capaz de elevar os níveis séricos de IGF-I e de induzir a expressão protéica de IGF-I na lâmina epifiseal (LE). Esses achados sugerem que os HT têm efeitos no desenvolvimento ósseo independentes do eixo GH/IGF-I e mediados pelo TR $\beta$ .

Em um outro estudo do nosso laboratório, ratas adultas eutireoideas foram tratadas com doses suprafisiológicas de T3 ou com doses equimolares de GC-1 e a massa óssea foi avaliada por DXA (Freitas, *et al.*, 2003). Mostrou-se que, enquanto o T3 promoveu uma perda

generalizada na massa óssea, o GC-1 não alterou a massa óssea dos animais. Considerando-se a seletividade do GC-1 pelo TR $\beta$ , esses achados sugerem que a osteopenia induzida pelo T3 é mediada pelo TR $\alpha$ . Por outro lado, a incapacidade do GC-1 em induzir osteopenia pode indicar que o esqueleto adulto não seja responsivo a esse análogo. Contudo, uma série de estudos *in vivo* e *in vitro*, realizados em nosso laboratório, têm mostrado que células osteoblásticas e o tecido ósseo adulto são responsivos ao GC-1. No presente estudo, tivemos como um segundo objetivo investigar os efeitos do GC-1 sobre parâmetros biomecânicos e histomorfométricos do tecido ósseo de camundongos fêmeas adultas.

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que, juntamente com a cartilagem constitui o sistema esquelético. Esse tecido apresenta funções importantes: (i) mecânica: suporte e local de inserção muscular para tração e locomoção; (ii) protetora: para órgãos vitais e medula óssea; e (iii) metabólica: atua como uma reserva de íons – especialmente cálcio e fósforo – participando da homeostase mineral (Baron, 2003).

Apesar de sua rigidez, o osso é, na realidade, um tecido dinâmico e suprido por nervos e vasos sanguíneos. Várias de suas células estão ativas, tanto na criança quanto no adulto, alterando o tamanho longitudinal (crescimento) e a forma (modelamento) do osso ou, simplesmente, renovando velhas estruturas sem mudar a sua forma (remodelamento).

#### 2.1.1 Macro- e Micro-Anatomia Ósseas

O esqueleto é constituído por dois tipos macroscopicamente diferentes de osso: o cortical ou compacto, que predomina nos ossos longos e extremidades do esqueleto apendicular; e o trabecular ou esponjoso, que é encontrado predominantemente no esqueleto axial e no interior dos ossos longos, dentro de suas extremidades expandidas (metáfises e epífises). O osso cortical corresponde a aproximadamente 80% da massa esquelética, enquanto que o trabecular constitui os 20% restantes (Baron, 2003).

Ao nível microscópico, o osso, como qualquer outro tecido conjuntivo, é constituído por células e por uma matriz extracelular. Esta última pode ser dividida em termos das suas fases orgânica (35%) e inorgânica (65%). O componente orgânico é composto principalmente por colágeno do tipo I (90% do total de proteínas da matriz óssea) e por proteínas não colágenas, mucopolissacarídeos ácidos e lípidos (Baron, 2003).

Numerosas proteínas não-colágenas presentes na matriz óssea têm sido purificadas e identificadas, contudo, o papel fisiológico dessas proteínas foi apenas parcialmente caracterizado (Termine, 1993). A maioria delas é sintetizada pelas próprias células ósseas e aproximadamente um quarto é de origem exógena, ou seja, são proteínas plasmáticas incorporadas preferencialmente pela matriz óssea.

O componente inorgânico é constituído basicamente por cálcio e fósforo. Eles são inicialmente depositados como sais amorfos sobre a matriz extracelular e, posteriormente, durante o processo de mineralização óssea, rearranjam-se em estruturas cristalinas similares aos cristais de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . Quantidades variáveis de sódio, potássio, magnésio, carbonato e flúor também podem ser encontrados na matriz extracelular, dependendo da ingestão desses íons.

As células ósseas constituem apenas 2% de todo o volume ósseo, entretanto, é essa pequena porção que é metabolicamente ativa. Dentre as células ósseas, podemos citar as células osteoprogenitoras, que dão origem aos osteoblastos; os osteoblastos, que formam osso; os osteócitos, que se alojam na matriz extracelular; os osteoclastos, que reabsorvem osso e as células de revestimento, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas (Baron, 2003).

## 2.1.2 Células Ósseas

### 2.1.2.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são as células formadoras de osso. Eles se originam de células mesenquimais multi-potentes que se diferenciam em pré-osteoblastos e, posteriormente, em osteoblastos. Algumas das características histológicas dos osteoblastos, tais como um retículo endoplasmático altamente desenvolvido e um grande número de ribossomos, refletem o fato de que apresentam alta atividade metabólica de síntese e secreção protéicas (Puzaz, 1993).

Adjacente aos osteoblastos, geralmente observa-se uma ou duas camadas de células mesenquimais e pré-osteoblásticas. Os osteoblastos são encontrados sobre uma camada de matriz óssea não mineralizada, que está sendo produzida por eles mesmos. Essa camada é chamada de osteóide e reflete um período de tempo de, aproximadamente, 10 dias, entre a formação e a mineralização da matriz óssea. Este período é necessário para a maturação do osteóide. Os osteoblastos normalmente trabalham em grupos de aproximadamente 100 a 400 células, sendo que há *gap junctions* entre eles, além de processos citoplasmáticos na sua superfície secretora que se aprofundam no osteóide e entram em contato com processos citoplasmáticos dos osteócitos. Esses contatos e as *gap junctions* permitem a passagem de sinais e, conseqüentemente, uma ação celular coordenada (Doty, 1981).

Os osteoblastos são células responsáveis pela síntese e secreção do colágeno e de várias proteínas não-colágenas como a fosfatase alcalina (ALP), a osteopontina (OP) e a osteocalcina (OC), além de fatores de crescimento, tais como o *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) e *tumoral growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Além disso, os osteoblastos controlam espacialmente e temporalmente o processo de mineralização da matriz extracelular.

À medida que essas células vão passando pelo seu processo de maturação, os genes relacionados ao tecido ósseo vão sendo expressos ou inibidos, cada um no seu devido tempo, de forma que as proteínas apropriadas vão sendo secretadas no tempo e local corretos (Rodan e Rodan, 1995). Um exemplo é o gene da osteocalcina que normalmente está mais expresso em períodos próximos à mineralização.

Os osteoblastos possuem receptores de vários hormônios e fatores que induzem a reabsorção óssea, o que faz com que sejam os mediadores da maioria dos sinais sistêmicos para o recrutamento e ativação dos osteoclastos (Puzaz, 1993).

Assim sendo, os osteoblastos apresentam um papel central na fisiologia óssea, uma vez que sintetizam a matriz orgânica do tecido ósseo e controlam a sua mineralização além de controlar a osteoclastogênese e a atividade osteoclástica.

#### *2.1.2.2 Osteócitos*

À medida que os osteoblastos vão produzindo a matriz extracelular, aproximadamente 10-20% vão se tornando encarcerados dentro de lacunas, pelo seu próprio produto, que posteriormente, torna-se mineralizado. Quando o encarceramento é total, a atividade metabólica dessas células diminui, devido à dificuldade de difusão de nutrientes, dando origem aos osteócitos (Puzaz, 1993). Dessa forma, os osteócitos são encontrados embebidos por toda a matriz extracelular calcificada, dentro de lacunas, e representa um dos destinos dos osteoblastos. A fonte de nutrientes e de troca de gases à qual os osteócitos têm acesso é a que ocorre através de pequenos canais, conhecidos como canalículos, que são formados por processos celulares dos próprios osteócitos, que se organizam durante a formação da matriz e antes da sua mineralização. Os canalículos formam uma extensa rede de nutrição e de comunicação entre os osteócitos e deles com os osteoblastos e com as células de revestimento, por toda a matriz óssea (Franz-Odenaal, Hall e Witten, 2006).

Tem-se mostrado que os osteócitos são capazes de sintetizar matriz óssea na superfície da lacuna osteocítica, a qual pode, posteriormente, sofrer mineralização. Embora os osteócitos

sejam classicamente considerados como capazes de reabsorver o osso mineralizado, que envolve a sua lacuna, estudos mais recentes põem em dúvida essa idéia (Noble, 2008). Além disso, os osteócitos parecem ser importantes na recepção e transdução dos estímulos mecânicos, detectando as deformações produzidas pela força mecânica (Yeh e Rodan, 1984). Há ainda, uma série de evidências de que tenham o papel de ativar localmente o remodelamento ósseo, além de estarem ativamente envolvidos na manutenção da matriz óssea (Burguer, *et al.*, 2003).

### *2.1.2.3 Osteoclastos*

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea. São células gigantes e multinucleadas (4-20 núcleos), formadas pela fusão de células mono-nucleadas hematopoiéticas (Kahn, Simmons e Krukowski, 1981). Eles são normalmente encontrados em contato com superfícies de osso mineralizado ou dentro de uma lacuna (lacuna de Howship), que é consequência da sua própria atividade reabsortiva. Há, geralmente, 1 ou 2 osteoclastos em um mesmo local de reabsorção, entretanto, podem ser encontrados até 5.

A região de contato do osteoclasto com o osso é caracterizada por uma borda em escova rodeada por uma área citoplasmática livre de organelas, conhecida por *clear zone* (Marchisio, *et al.*, 1984). Esta área é enriquecida por proteínas contráteis que, provavelmente, participam da ligação do osteoclasto à superfície óssea (BurrIDGE, *et al.*, 1988), formando uma zona selada. O mecanismo e locais precisos de ligação desta zona à superfície óssea ainda não são totalmente conhecidos, entretanto, há evidências de que a membrana celular apresente receptores, conhecidos como integrinas, que reconhecem e interagem com seqüências específicas de aminoácidos (Arg-Gly-Asp) presentes em proteínas da matriz óssea (Hynes, 1992).

A zona selada, a borda em escova e a superfície óssea formam um compartimento fechado extracelular, de reabsorção, que funcionalmente equivale a um lisossomo secundário. Esse compartimento é acidificado pela secreção de íons de hidrogênio através de bombas de prótons eletrogênicas presentes na borda em escova (Bekker e Gay, 1990). Os prótons são fornecidos a essas bombas pela anidrase carbônica, cuja atividade específica é bastante alta no citosol dos osteoclastos (Anderson, Schraer e Gay, 1982). Os osteoclastos são ricos em mitocôndrias, que fornecem ATP para as bombas, e em vesículas carregadas de enzimas

lisossomais, que também são secretadas no compartimento de reabsorção (lisossomo secundário) através da borda em escova.

A reabsorção óssea ocorre em função do baixo pH no lisossomo secundário que, por si só, causa a dissolução dos cristais de hidroxiapatita e expõe a matriz orgânica. As enzimas lisossomais, agora em pH ótimo, degradam os componentes da matriz. Os resíduos desta digestão extracelular são internalizados e transportados através da célula (transcitose) para serem liberados pela membrana basolateral e/ou liberados para o interstício nos períodos em que a zona selada é desfeita. Isso possivelmente ocorre por indução de sensores de cálcio que detectam o aumento da sua concentração intracelular, caracterizando um mecanismo de feedback (Malgaroli, *et al.*, 1989; Zaidi, *et al.*, 1989). Dessa forma, a elevação do cálcio intracelular inibe a atividade osteoclástica (Zaidi, *et al.*, 1989).

Percebe-se, portanto, que a atividade das células ósseas desempenha as funções de manutenção da integridade do esqueleto e homeostase mineral.

### **2.1.3 Remodelamento Ósseo**

Ao longo da vida, o tecido ósseo sofre remodelamento, ou seja, é constantemente renovado pelo acoplamento, extremamente regulado, dos processos de formação e reabsorção ósseas. Para que o remodelamento ósseo ocorra, é necessário que haja uma contínua troca de sinais entre as diferentes populações de células ósseas, o que, por sua vez, irá garantir uma ação coordenada dos diferentes tipos de células ósseas. A maior parte do remodelamento ocorre nas superfícies ósseas periósticas e endósticas (externas e internas, respectivamente), especialmente na última, que apresenta íntimo contato com a medula óssea. Essas superfícies são recobertas por células ósseas organizadas em camadas, constituindo, assim, o perióstio e o endóstio, respectivamente. São superfícies heterogêneas e refletem as atividades celulares envolvidas no remodelamento ósseo (Baron, 2003).

Através do remodelamento, o tecido ósseo vai sendo renovado pela constante remoção de osso “velho” (reabsorção óssea) e reposição de osso “novo” (formação óssea). Assim sendo, em condições normais, a formação e a reabsorção devem ocorrer de maneira balanceada, de forma que a mesma quantidade de osso reabsorvida seja repostada. Distúrbios do remodelamento podem levar a alterações da arquitetura óssea, o que pode resultar em perda da competência mecânica e em subsequente aumento do risco de fraturas esqueléticas.

---

## 2.2 OS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS

Os hormônios tireoideanos (HT) exercem uma ampla variedade de efeitos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo dos tecidos, incluindo o tecido ósseo. Considerando-se as ações genômicas dos HT, a tiroxina (T4), produto primário da glândula tireóide, é relativamente inativa e é convertida à forma ativa do hormônio, a triiodotironina (T3), pela enzima 5'-desiodase do tipo I e II.

Acredita-se que as ações do T3 são primariamente resultantes da sua interação com os TRs. Esses receptores ligam-se a regiões específicas dos genes alvo do T3, os elementos responsivos dos TRs (TREs) e modificam a sua expressão. É importante salientar que um número de efeitos dos HT ocorre rapidamente e não é afetado por inibidores da transcrição ou tradução, sugerindo que os HT também promovem seus efeitos via mecanismos não genômicos. Estas ações têm sido descritas em vários tecidos e tipos celulares, incluindo o tecido adiposo marrom, o coração e a hipófise. Os sítios de ações não genômicas têm sido localizados na membrana plasmática, citoplasma e organelas celulares. Essas ações incluem a regulação de canais iônicos, a fosforilação oxidativa e a transcrição de genes mitocondriais e, envolve a geração de segundos mensageiros intracelulares e a indução de cascatas sinalizadoras intracelulares (Basset, Harvey e Williams, 2003; Kavok, Krasilnikova e Babenko, 2001; Watanabe, *et al.*, 2005).

### 2.2.1 Receptores Nucleares de T3

Os TRs são membros de uma super-família de fatores de transcrição nucleares hormônio-responsivos (receptores nucleares) que são similares em estrutura e mecanismo de ação. Essa super-família inclui os receptores dos hormônios esteróides, do ácido retinóico (RAR e RXR), da Vitamina D (VDR) e do T3 (Lazar, 1993), bem como outros numerosos prováveis receptores de ligantes desconhecidos (Moore, 1990). Esses receptores apresentam duas características estruturais comuns. Uma delas é a porção da proteína que interage com o DNA, o “domínio de ligação ao DNA” (*DNA-binding domain*, DBD). O DBD inclui duas seqüências de aminoácidos com resíduos cisteína que formam duas estruturas em forma de alça com uma molécula de zinco cada, conhecidas como “dedos de zinco” (Freedman, 1992). Vários aminoácidos dentro dessa estrutura servem para determinar a seqüência de DNA específica (elemento responsivo) ao qual um determinado receptor se liga, outros são



---

importantes para a dimerização do receptor (Freedman, 1992). A segunda característica é o “domínio de ligação ao ligante” (*ligand-binding domain*, LBD), que confere especificidade a um determinado ligante (Lazar, 1993).

Há dois genes que codificam TRs -  $\alpha$  e  $\beta$  - localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente (Freedman, 1992). Pelo menos duas isoformas de TR $\alpha$  e duas de TR $\beta$  foram identificadas e são o resultado de *splicing* alternativo (Freedman, 1992). As isoformas TR $\alpha$  diferem na porção carboxi-terminal do LBD e as isoformas TR $\beta$  diferem na porção amino-terminal. As isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 ligam T3, enquanto a isoforma TR $\alpha$ 2 não liga. Esta última isoforma funciona, pelo menos *in vitro*, como antagonista da transcrição gênica mediada por TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 (Katz e Lazar, 1993). Acredita-se que os mecanismos desse antagonismo envolvam competição pela ocupação de elementos responsivos do T3 em genes alvo ou a competição por parceiro de heterodimerização.

RNAs mensageiros (mRNAs) codificando as isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 são expressos virtualmente em todos os tecidos, embora apresentem distribuições características. Por outro lado, a isoforma TR $\beta$ 2 é expressa quase que exclusivamente na adenohipófise (Hodin, *et al.*, 1989), no hipotálamo, no hipocampo em desenvolvimento e no corpo estriado (Cook, *et al.*, 1992). Em geral, há pequena correlação entre os níveis de mRNA que codifica cada isoforma de TR com a quantidade da proteína correspondente presente em um determinado tecido (Strait, *et al.*, 1990; Falcone, *et al.*, 1992), o que demonstra que a expressão das isoformas de TR é regulada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais.

Os receptores de hormônio tireoideano interagem com seqüências específicas dos genes alvo, os TREs, cuja interação resulta na regulação positiva ou negativa da expressão gênica, dependendo da natureza do TRE e da presença de T3. Em células de mamíferos, TRs não ligados ao T3 geralmente suprimem a atividade basal de promotores que contém TREs positivos (Brent, *et al.*, 1989). A ligação do T3 aos TRs reverte a supressão e estimula a transcrição a níveis que podem ser ainda maiores do que aquela do estado basal. Por outro lado, a atividade basal de promotores que contém TREs negativos é estimulada por receptores não ligados ao ligante e a transcrição é reprimida após a ligação do T3 (Hollenberg, Monden e Wondisford, 1995; Tagami e Jameson, 1998).

---

### 2.2.2 O Análogo do T3: GC-1

Chiellini, *et al.*, (1998) desenvolveram o GC-1, um análogo do T3 cujas características-chaves incluem uma ligação com metileno ao invés de uma ligação éter, uma cadeia lateral do ácido oxiacético ao invés de uma cadeia lateral alanina e grupos metil ou isopropil no lugar dos iodetos. Uma característica muito interessante do GC-1 é que ele apresenta alta afinidade pelo TR $\beta$ 1. O GC-1 liga-se ao TR $\beta$ 1 com a mesma afinidade que o T3, entretanto, o faz com uma afinidade 10 vezes maior do que pelo TR $\alpha$ 1. As propriedades de ativação gênica do GC-1 foram testadas em células de mamíferos através da transfecção de plasmídeos repórteres que continham TREs e/ou através da transfecção de plasmídeos que expressavam TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1.

Experimentos de transativação celular do tipo dose-resposta demonstram que o GC-1 é um agonista total do TR com potência similar ao T3, entretanto, a sua capacidade de ativação gênica é aproximadamente 20 vezes maior na presença de TR $\beta$ 1 do que na presença de TR $\alpha$ 1. Assim sendo, o GC-1 exerce seletividade pelo TR $\beta$  nas suas funções de ligação ao receptor e de ativação gênica. O T3, entretanto, não expressa tal seletividade e liga-se ao TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 com a mesma afinidade. A propriedade seletiva do GC-1 pelo TR $\beta$  faz com que esse análogo seja útil em estudos animais que têm o objetivo de investigar os papéis relativos do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$  na mediação das ações do T3. Efeitos do GC-1 no sistema nervoso central (Manzano, *et al.*, 2003; Morte, *et al.*, 2002, 2004), tecido adiposo marrom (Ribeiro, *et al.*, 2001), tecido ósseo (Freitas, *et al.*, 2003, 2005), coração (Trost, *et al.*, 2000), níveis séricos de colesterol e triglicérides (Trost, *et al.*, 2000) e na metamorfose de girinos (Furlow, *et al.*, 2004) evidenciam a seletividade do GC-1 pelo TR $\beta$ .

---

## 7 CONCLUSÃO

### 7.1 ESTUDO I – Efeito do T3 no Tecido Ósseo de Ratas *Wistar* adultas

O estudo dos efeitos do T3 em ratas *Wistar* adultas sugere que:

- 1- Até um determinado grau de tireotoxicose, há aceleração do remodelamento ósseo, com aumento tanto da reabsorção quanto da formação óssea, mas com predomínio da reabsorção, favorecendo a perda de massa óssea. No presente estudo, este grau de tireotoxicose foi atingido com a dose de 10xT3. Em graus mais elevados de tireotoxicose, determinados no presente estudo pelo tratamento com 20x ou 40xT3, o mecanismo de perda de massa óssea é alterado. Nessa condição, ocorre uma desaceleração do remodelamento ósseo, com inibição tanto da formação quanto da reabsorção ósseas, entretanto, a inibição da formação óssea é maior, também levando à perda de massa óssea.
- 2- A ação osteopênica do excesso de hormônio tireoideano ocorre predominantemente no osso cortical.
- 3- A ação deletéria da tireotoxicose se caracteriza, predominantemente, pela perda de massa óssea, sendo que a qualidade óssea praticamente não é alterada.

### 7.2 ESTUDO II – Efeito do T3 e GC-1 no Tecido Ósseo de Camundongos Fêmeas

Os nossos achados sugerem que:

- 1- O tecido ósseo de camundongos fêmeas adultas é responsivo ao GC-1;
- 2- O GC-1 tem efeito positivo sobre o tecido ósseo adulto, levando a um aumento do conteúdo de osso trabecular, a uma melhoria da qualidade óssea e, conseqüentemente, a um aumento da resistência óssea.

---

Considerando-se a seletividade do GC-1 pelo TR $\beta$ , os nossos achados sugerem que o TR $\beta$  medeia predominantemente efeitos anabólicos e positivos do hormônio tireoideano sobre parâmetros determinantes da qualidade óssea.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*. 1997; 21(2):137-42.

Allain TJ, McGregor AM. Thyroid hormones and bone. *J Endocrinol*. 1993; 139(1):9-18.

Allain TJ, Yen PM, Flanagan AM, McGregor AM. The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *Eur J Clin Invest*. 1996; 26(5):418-25.

Anderson RE, Schraer H, Gay CV. Ultrastructural immunocytochemical localization of carbonic anhydrase in normal and calcitonin-treated chick osteoclasts. *Anat Rec*. 1982; 204(1):9-20.

Ballock R, Mita BC, Zhou X, Chen DH, Mink LM. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in rat growth plate cartilage in vivo. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(9):1550-6.

Baron R. General Principles of Bone Biology. In: Favus MJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 5 ed. Washington: The American Society for Bone and Mineral Research; 2003. p. 1-8.

Basset JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cel Endocrinol*. 2003; 213(1):1-11.

Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone*. 1996; 18(5):397-403.

Bekker PJ, Gay CV. Biomechanical characterization of an electrogenic vacuolar proton pump in purified chicken osteoclast plasma membrane vesicles. *J Bone Miner Res*. 1990; 5(6):569-579.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. 2002; 23(1):38-89.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Bianco AC, Silva JE. Nuclear 3,5,3'- triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology*. 1987; 120(1):55-62.

Brent GA, Larsen PR, Harney JW, Koenig RJ, Moore DD. Functional characterization of the rat growth hormone promoter elements required for induction by thyroid hormone with and without a co-transfected beta type thyroid hormone receptor. *J Biol Chem*. 1989; 264(1):178-182.

Broulik PD, Posenkrancová J, Ruzicka P, Sedláček R. Effects of triiodotironine and estrogen administration on bone mass, mineral content and bone strength in male rats. *Horm Metab Res*. 2003; 35(9):527-31.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*. 1988; 4:487-525.

Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol*. 1998; 5(6):299-306.

Cook CB, Kakucska I, Lechan RM, Koenig RJ. Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology*. 1992; 130(2):1077-1079.

Compston J. Bone Quality: What is it and How is it Measured?. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006; 50(4):579-85.

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29(2):211-8.

Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int*. 1981; 33(5):509-512.

Egrise D, Martin D, Neve P, Verbas M, Schoutens A. Effects and interactions of 17 beta-estradiol, T3 and 1,25(OH)2D3 on cultured osteoblasts from mature rats. *Bone Miner*. 1990; 11(3):273-283.

Erben RG. Bone-Labeling Techniques. In: An YH, Martin KL, editors. *Handbook of Histology Methods for Bone And Cartilage*. Totowa: Humana Press; 2003. p. 99-117.

Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(6):1085-1098.

Falcone M, Miyamoto T, Fierro-Renoy F, Macchia E, DeGroot LJ. Antipeptide polyclonal antibodies specifically recognize each human thyroid hormone receptor isoform. *Endocrinology.* 1992; 131(5):2419-2429.

Fallon MD, Perry HM 3rd, Bergfeld M, Droke D, Teitelbaum SL, Avioli LV. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. *Arch Intern Med.* 1983; 143(3):442-444.

Fox JN, Kimura S, Plato CC, Kitagawa T. Bilateral asymmetry in bone weight at various skeletal sites of the rat. *Anat Rec.* 1995; 241(2):284-287.

Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, Legrand C, Gauthier K, Kedinger M, Malaval L, Rousset B, Samarut J. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *Embo J.* 1997; 16(14):4412-20.

Franz-Odendaall TA, Hall BK, Witten PE. Buried Alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006; 235(1):176-90.

Fraser SA, Anderson JB, Smith DA, Wilson GM. Osteoporosis and fractures following thyrotoxicosis. *Lancet.* 1971; 1(7707):981-983.

Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev.* 1992; 13(2):129-145.

Freitas FR, Capelo LP, O'Shea PJ, Jorgetti V, Moriscot AS, Scanlan TS, Williams GR, Zorn TM, Gouveia CH. The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(2):294-304.

Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, Soares AG, Passarelli M, Scanlan TS, Brent GA, Bianco AC, Gouveia CH. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR  $\beta$ -selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285(5):E1135-41.

Friedman AW. Important determinants of bone strength: beyond bone mineral density. *J Clin Rheumatol.* 2006; 12(2):70-7.

Furlow JD, Yang HY, Hsu M, Lim W, Ermio DJ, Chiellini G, Scanlan TS. Induction of larval tissue resorption in *Xenopus laevis* tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1. *J Biol Chem.*, 2004; 279(25):26555-62.

Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J. Different functions for the thyroid hormone receptors TR $\alpha$  e TR $\beta$  in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *Embo J.* 1999; 18(3):623-31.

Gloss B, Trost S, Bluhm W, Swanson E, Clark R, Winkfein R, Janzen K, Giles W, Chassande O, Samarut J, Dillmann W. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology.* 2001; 142(2):544-50.

Göthe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barro AC, Ohlsson C, Vennström B, Forrest D. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* 1999; 13(10):1329-41.

Gouveia CHA. Efeito da administração de hormônio tireoideano na massa óssea de ratas [Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas; 1996.

Gouveia CH. [The molecular and structural effects of thyroid hormone in bones]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004; 48(1):183-95.

Gouveia CH, Jorgetti W, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res.* 1997; 12(12):2098-2107.

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science.* 1989; 244(4900):76-79.

Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE. Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem.* 1995; 270(24):14275-14280.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69(1):11-25.



Kahn AJ, Simmons DJ, Krukowski M. Osteoclast precursor cells are present in the blood of preossification chick embryos. *Dev Biol.* 1981; 84(1):230-234.

Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X-G, Dace A, Garret L, Carter TA, Kazlauskaitė R, Pankratz DG, Wynshaw-Boris A, Refetoff S, Weintraub B, Willingham MC, Barlow C, Cheng S-Y. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone  $\beta$  receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(24):13209-14.

Kasono K, Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Stimulation of alkaline phosphatase activity by thyroid hormone in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1): a possible mechanism of hyperalkaline phosphatasia in hyperthyroidism. *Bone Miner.* 1988; 4(4):355-363.

Katz D, Lazar MA. 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):20904-20910.

Kavok NS, Krasilnikova OA, Babenko NA. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone. *BMC Cell Biol.* 2001; 2:5.

Krieger NS, Stappenbeck TS, Stern PH. Characterization of specific thyroid hormone receptors in bone. *J Bone Miner Res.* 1988; 3(4):473-478.

Lazar M. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev.* 1993; 14(2):184-193.

Lebron BA, Pekary AE, Mirell C, Hahn TJ, Hershman JM. Thyroid hormone 5'-deiodinase activity, nuclear binding, and effects on mitogenesis in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res.* 1989; 4(2):173-178.

Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, Seo H, Hayashi Y, Samarut J, Murata Y, Weiss RE, Refetoff S. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(1):349-54.

Malgaroli A, Meldolesi A, Zallone AZ, Teti A. Control of cytosolic free calcium in rat and chicken osteoclasts: the role of extracellular calcium and calcitonin. *J Biol Chem.* 1989; 264(24):14342-14347.

Manzano J, Morte B, Scanlan TS, Bernal J. Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain. *Endocrinology*. 2003; 144(12):5480-7.

Marchisio PC, Cirillo D, Naldini L, Primavera MV, Teti A, Zambonin-Zallone A. Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J Cell Biol*. 1984; 99(5):1696-705.

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

Miki N, Ono M, Hizuka N, Aoki T, Demura H. Thyroid Hormone modulation of the hypothalamic growth hormone (GH) - releasing factor - pituitary GH axis in the rat. *J Clin Invest*. 1992; 90(1):113-20.

Moore DD. Diversity and unity in the nuclear hormone receptors: a terpenoid receptor superfamily. *New Biol*. 1990; 2(1):100-105.

Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennstrom B, Bernal J. Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor alpha 1 knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms. *Endocrinology*. 2004; 145(3):1386-91.

Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennstrom B, Bernal J. Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(6):3985-9.

Mosekilde L, Melsen F, Bagger JP, Myhre-Jensen O, Schwartz Sorensen N. Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism. *Acta Endocrinol*. 1977; 85(3):515-525.

Nanto-Salonen K, Muller HL, Hoffman AR, Vu TH, Rosenfeld RG. Mechanisms of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: all thyroid hormone effects are not growth hormone mediated. *Endocrinology*. 1993; 132(2):781-8.

Ohlsson C, Ingaard J, Tornell J, Nilsson A, Isaksson O, Lindahl A. Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Acta Paediatr Suppl*. 1993; 391:33-40.

Ongphiphadhanakul B, Alex S, Braverman LE, Baran DT. 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):1227-1231.

Parfitt, AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2(6):595-610.

Puzaz JE. The osteoblast. In: Favus MJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Diseases of Mineral Metabolism.* New York: Raven Press; 1993. p. 15-21.

Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, Brent GA. Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *J Clin Invest.* 2001; 108(1):97-105.

Rizzoli R, Poser J, Burgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism,* 1986; 35(1):71-74.

Rodan GA, Rodan SB. The cells of bone. In: Riggs L, Melton III J, editors. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and management.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1995. p. 1-27.

Sato K, Fujii Y, Asano S, Ohtsuki T, Kawakami M, Kasono K, Tsushima T, Shizume K. Recombinant human interleukin 1 alpha and beta stimulate mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) to produce macrophage-colony stimulating activity and prostaglandin E2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 141(1):285-291.

Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushirna T, Shizurne, K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology.* 1987; 120(5):1873-1881.

Strait KA, Schwartz HL, Perez-Castillo A, Oppenheimer JH. Relationship of c-erbA mRNA content to tissue triiodothyronine nuclear binding capacity and function in developing and adult rats. *J Biol Chem.* 1990; 265(18):10514-10521.

Suwanwalaikorn S, Ongphiphadhanakul B, Braverman LE, Baran DT. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adults rats. *Eur J Endocrinol.* 1996; 134(5):655-659.

Tagami T, Jameson JL. Nuclear corepressors enhance the dominant negative activity of mutant receptors that cause resistance to thyroid hormone. *Endocrinology*. 1998; 139(2):640-650.

Terminè JD. Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Diseases of Mineral Metabolism*. New York: Raven Press, 1993. p. 21-25.

Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover GJ, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS, Dillmann WH. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. 2000; 141(9):3057-64.

Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS, Ribeiro MO, Bianco AC, Gouveia CH. Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *J Endocrinol*. 2007; 193(1):21-29.

Von Recklinghausen FC. Die Fibrose Oder Deformierende Ostitis, Die Osteomalazie und Die Osteoplastische Karcinose in Ihren Gegenseitigen Beziehungen. In: Reimer G, editor. *Berlin: Festschrift Rudol Virchow*; 1891. p. 1-89.

Watanabe H, Washizuka T, Komura S, Yoshida T, Hosaka Y, Hatada K, Aizawa Y, Chinushi M, Yamamoto T, Ma M, Watanabe K. Genomic and non-genomic regulation of L-type calcium channels in rat ventricle by thyroid hormone. *Endocr Res*. 2005; 31(1):59-70.

Wikström L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Barros AC, Baas F, Forrest D, Thorén P, Vennström B. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J*. 1998; 17(2):455-61.

Williams AJ, Robson H, Kester MH, van Leeuwen JP, Shalet SM, Visser TJ, Williams GC. Iodothyronine deiodinase enzyme activities in bone. *Bone*. 2008; 43(1):126-34.

Williams GR, Bland R, Sheppard MC. Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling. *Endocrinology*. 1994; 135(6):2375-2385.

Williams GR, Bland R, Sheppard MC. Retinoids modify regulation of endogenous gene expression by vitamin D3 and thyroid hormone in three osteosarcoma cell lines. *Endocrinology*. 1995; 136(10):4304-4314.

Williams GR, Robson H, Shalet SM. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J Endocrinol.* 1998; 157(3):391-403.

Yeh CK, Rodan GA. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. *Calcif Tissue Int.* 1984; 36:S67-S71.

Zaidi M, Datta HK, Patchell A, Moonga B, MacIntyre I. 'Calcium-activated' intracellular calcium elevation: a novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 163(3):1461-1465.