

Manuela Miranda Rodrigues

**Avaliação da Interação do Hormônio
Tireoideano com o Sistema Nervoso Simpático, na
Regulação do Crescimento Ósseo via Receptor α_{2c}
Adrenérgico**

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

Rodrigues-Miranda M. Avaliação da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático, na regulação do crescimento ósseo via receptor α_2C adrenérgico. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Um importante achado dos últimos anos é que o remodelamento ósseo está sujeito ao controle do sistema nervoso central (SNC), com o sistema nervoso simpático (SNS) agindo como efetor periférico. Uma série de estudos sugere que o SNS regula negativamente a massa óssea via receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR), que é expresso em osteoblastos. Entretanto, estudos do nosso grupo (1) demonstraram que camundongos com dupla inativação dos genes dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) apresentam fenótipo de alta massa óssea (AMO), apesar de apresentarem hiperatividade simpática crônica e β_2 -AR intacto. Identificamos, por imunohistoquímica, que os receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (α_{2A} -AR e α_{2C} -AR) são expressos em osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e em condrócitos das lâminas epifisiais, dos centros de ossificação secundários e da cartilagem articular, o que sugere que os receptores α_2 adrenérgicos também medeiam ações do SNS no esqueleto. Esses achados sugerem que o hormônio tireoideano interage com o SNS, através da sinalização dos receptores α_2 adrenérgicos, para regular o metabolismo e crescimento ósseos. O presente estudo tem como objetivo investigar a participação α_{2C} -AR e a possível interação do SNS com o HT na regulação do crescimento longitudinal ósseo (CLO). Para tanto, avaliamos o crescimento ósseo e a morfologia da lâmina epifisial (LE) do fêmur de camundongos fêmeas de 21 dias de idade, selvagens (Selv) e com inativação gênica do α_{2C} AR^{-/-} (n=8/grupo), tratados por quatro semanas, com uma dose suprafiológica de triiodotironina (7 μ g/100gPC/dia), para mimetizar o hipertireoidismo (Hiper), ou tratados com drogas inibidoras da função tiroideana, o metimazol (0,1%) e perclorato de sódio (1%), adicionados à água de beber, para indução do hipotireoidismo (Hipo). Em comparação aos animais Selv, a LE dos animais α_{2C} AR^{-/-} eutiroideos apresentou uma importante desorganização da zona proliferativa (ZP) e aumento significativo (30%, p<0,001) do número de condrócitos hipertróficos maduros (CHM). Nos animais Selv, o Hipo promoveu alterações conhecidas: redução importante do CLO, desorganização da ZP e diminuição do número de CHM. Surpreendentemente, o Hipo promoveu efeitos contrários na LE dos animais α_{2C} AR^{-/-} em relação aos animais Selv. O Hipo foi capaz de reverter, pelo menos parcialmente, a desorganização da ZP dos camundongos α_{2C} AR^{-/-} eutiroideos, além de resultar em um maior número de CHM (27%), em relação aos animais Selv Hipo. Já o Hiper levou a aumento do número de condrócitos hipertróficos (CH) nos animais Selv e redução nos animais α_{2C} AR^{-/-}. Além disso, os animais α_{2C} AR^{-/-}Hiper apresentaram uma diminuição extremamente significativa (2x menor) no número de CH e CHM, quando comparados aos animais Selv Hiper. Esses achados reforçam as hipóteses de que o SNS regula o crescimento longitudinal ósseo via α_{2C} AR e que o HT e SNS interagem para regular o crescimento longitudinal ósseo.

Palavras-chave: Hormônio Tireoideano. Sistema Nervoso Simpático. Crescimento Ósseo.

ABSTRACT

Rodrigues-Miranda M. Evaluation of the interaction of thyroid hormone with the sympathetic nervous system in the regulation of bone growth via alpha 2c adrenergic receptor.[Master's thesis (Science Morphofunctional)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

An important finding of the recent years is that bone remodeling is under control of the central nervous system (CNS), with the sympathetic nervous system (SNS) acting as the peripheral effector. Evidence suggests that the SNS can negatively regulate bone mass via β_2 -adrenergic receptor (AR- β_2), which is expressed in osteoblasts. However, previous research by our group has demonstrated that mice with α_{2A} and α_{2C} adrenergic receptors double inactivation (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) exhibit a high bone mass phenotype (AMO), in spite of presenting chronic sympathetic hyperactivity and intact β_2 -AR. By immunohistochemistry, we showed that α_{2A} and α_{2C} adrenergic receptors (α_{2C} -AR and α_{2A} -AR) are expressed in osteoblasts, osteocytes, osteoclasts, and in chondrocytes of the epiphyseal growth plate (EGP), of the secondary ossification centers and of the articular cartilage, which suggests that α_2 adrenergic receptors also mediate the actions of the SNS in the skeleton. We also found that α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} mice are resistant to the thyroid hormone (TH) excess-induced osteopenia and that mice with the single inactivation of α_{2A} -AR or α_{2C} -AR are resistant to the reduction of bone longitudinal growth caused by thyrotoxicosis. These findings suggest that TH interacts with the SNS, through α_2 adrenergic receptor signaling to regulate bone metabolism and growth. The present study aimed to investigate the role α_{2C} -AR and the possible interaction between the SNS and TH to regulate the bone longitudinal growth (BLG). Thus, we evaluated the bone growth and the morphology of the femoral EGP of 21-day old female wild-type (WT) and α_{2C} AR^{-/-} mice (n=8/group), treated for four weeks with a supraphysiological dose of triiodothyronine (7 μ g/100gBW/day), to mimic hyperthyroidism (Hyper), or treated with inhibitory drugs of the thyroid function, methimazole (0.1%) and sodium perchlorate (1%) added to drinking water, for hypothyroidism (Hypo) induction. Comparing to the Selv mice, euthyroid α_{2C} AR^{-/-} mice a more important disorganization of proliferative zone (PZ) and significant increase (30%, p<0.001) in the number of mature hypertrophic chondrocytes (MHC) of the EGP. In WT animals, Hypo promoted known modifications: a significant reduction in the BLG, PZ disorganization and a decreased number of MHC. Surprisingly, Hypo promoted opposite effects in EGP of α_{2C} AR^{-/-} compared to WT mice. Hypo was able to partially revert the PZ disorganization observed in euthyroid α_{2C} AR^{-/-}, and resulted in a greater number of MHC (27%) compared to WT Hypo. On the other hand, Hyper caused an increase in the number of hypertrophic chondrocytes (HC) in WT mice and a reduction in α_{2C} AR^{-/-} mice. Furthermore, Hyper α_{2C} AR^{-/-} animals showed a very significant reduction (2-fold lower) in the number of HC and MHC, when compared to the Hyper WT mice. These findings support the hypothesis that the SNS regulates the bone longitudinal growth via α_{2C} AR and that the interaction between SNS and TH can regulate the longitudinal bone growth.

Keywords: Thyroid Hormone. Sympathetic Nervous System. Bone Growth.

INTRODUÇÃO

1.1 O Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que, juntamente com os tecidos cartilaginoso, hematopoiético e adiposo, além de vasos sanguíneos e nervos, compõem os ossos. Estes realizam funções mecânicas de sustentação e de proteção dos órgãos, além de compor um sistema de alavancas para o movimento do corpo. Somando-se a isso, os ossos apresentam funções de hematopoiese e de homeostase mineral, e ainda servem como depósito de minerais e gordura (2).

Recentemente, detectou-se a participação do tecido ósseo na regulação do metabolismo mineral e da glicose, através da liberação do fator de crescimento fibroblástico 23 (*fibroblast growth factor 23* - FGF23) e da osteocalcina, respectivamente. O FGF23 é produzido por osteócitos, circula como um hormônio e age no rim estimulando a excreção urinária de fósforo (3). A osteocalcina, sintetizada pelos osteoblastos, aumenta a síntese, secreção e sensibilidade à insulina e aumenta a utilização da glicose e o gasto energético (4). Assim sendo, uma série de evidências sugere que o tecido ósseo atua, também, como um órgão endócrino (3).

Anatomicamente, um osso longo é subdividido nas seguintes regiões: (a) *diáfise*: é o chamado corpo do osso, sendo a sua maior parte alongada cilíndrica; (b) *epífise*: abrange as extremidades distal e proximal do osso; (c) *metáfise*: em um osso maduro, são as regiões em que as diáfises se unem as *epífises*. Já em um osso em crescimento, cada metáfise inclui uma lâmina epifisial, que compreende uma camada de cartilagem hialina responsável pelo crescimento longitudinal do osso; (d) *cartilagem articular*: camada de cartilagem hialina que recobre a face articular do osso; (e) *periósteo*: bainha rígida de tecido conjuntivo não modelado que circunda a superfície de todo o osso; (f) *cavidade medular*: é o espaço que aloja a medula óssea e (g) *endósteo*: membrana que reveste a superfícies ósseas internas (5, 6).

Macroscopicamente, o osso pode ser classificado como cortical (ou compacto) e trabecular (ou esponjoso). Embora os elementos constituintes sejam os mesmos nos dois tipos de osso, o tecido ósseo dispõe-se diferentemente conforme

o tipo considerado. O osso cortical se organiza de forma compacta e está presente predominantemente nos ossos longos. O osso cortical corresponde a aproximadamente 80% da massa esquelética total, além de apresentar uma importância fundamental na resistência óssea. Já o osso trabecular, que corresponde a 20% da massa esquelética, se organiza na forma de traves ou trabéculas ósseas interconectadas entre si, compondo a substância esponjosa. O osso trabecular é encontrado predominantemente no esqueleto axial e nas extremidades dos ossos longos. A substância esponjosa proporciona resistência adicional aos ossos, além de acomodar a medula óssea por entre as suas traves ósseas (2).

O tecido ósseo assim como o tecido conjuntivo, é constituído por um componente celular e por uma ampla matriz extracelular.

1.1.1 A matriz óssea

No osso maduro, a matriz extracelular (MEC) é constituída por aproximadamente 35% de material orgânico e por 65% de material inorgânico. A fase orgânica da matriz óssea é formada por colágeno, proteínas não-colágenas (osteocalcina, osteonectina, etc), glicopolissacarídeos e lipídios. Essas proteínas, além de serem responsáveis pela mineralização da matriz, por apresentarem sítios de ligação aos íons, também apresentam funções na proliferação e diferenciação celular(7). A fase inorgânica da matriz óssea é constituída predominantemente por íons de cálcio e fósforo, que se combinam formando estruturas cristalinas, similares aos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Esses cristais, por sua vez, mineralizam a porção orgânica da MEC, se depositando ao longo de uma estrutura tridimensional formada principalmente por moléculas de colágeno (7).

1.1.2 As células ósseas

As principais células ósseas são: os (a) *osteoclastos*, responsáveis pela reabsorção óssea; (b) *osteoblastos*: responsáveis pela formação óssea; (c) *osteócitos*, responsáveis pela integridade da matriz óssea; e as (d) *células de revestimento*, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas (2).

Os osteoclastos são células multinucleadas gigantes, derivadas de uma linhagem de células progenitoras de monócitos/macrófagos, que se encontra presente no sangue e na medula óssea. Os osteoclastos são encontrados em contato íntimo com a superfície óssea, em depressões denominadas lacunas de reabsorção, também chamadas de lacunas de Howship, que são resultado da sua atividade reabsortiva. A região de contato do osteoclasto com o osso é caracterizada por borda em escova, rodeada por uma área citoplasmática livre de organelas, porém com abundância de proteínas contráteis que participam da ligação do osteoclasto à superfície do osso, formando uma zona selada. A zona selada, a borda em escova e a superfície óssea formam um compartimento extracelular fechado de reabsorção, que é acidificado pela secreção de íons de hidrogênio através de bombas de prótons presentes na borda em escova. A reabsorção óssea ocorre em função do pH baixo, o que causa dissolução dos cristais de hidroxiapatita e expõe a matriz óssea. Em seguida, as enzimas lisossomais dos osteoclastos degradam os componentes orgânicos da matriz e formam as lacunas de Howship.

A síntese de tecido ósseo é realizada pelos osteoblastos. Essas células se originam de células mesenquimais multipotentes, que se diferenciam em células pré-osteoblásticas (células comprometidas a se diferenciarem em osteoblastos). As células pré-osteoblásticas encontram-se próximas aos osteoblastos ativos no perióstio e endóstio. Os osteoblastos são células cuboides e mononucleadas e formam uma única camada que recobre todos os locais ativos de formação óssea. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz óssea. A matriz óssea recém formada, adjacente aos osteoblastos ativos, ainda não calcificada, recebe o nome de osteóide. Os osteoblastos também exercem um papel importante, embora indireto, na regulação da reabsorção do osso, uma vez que são essas células, e não os osteoclastos, que possuem receptores para a maioria dos fatores que induzem a reabsorção óssea, como por exemplo, o hormônio da paratireóide (PTH). Para isso, os osteoblastos liberam fatores de acoplamento, como por exemplo, o ligante do ativador do receptor do fator nuclear κ B (RANKL, do inglês *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*), que ativam os osteoclastos. Além disso, os osteoblastos sintetizam e depositam fatores de crescimento na matriz óssea, como o IGF-I, que, posteriormente, serão liberados durante o processo de reabsorção óssea e atuarão sobre os próprios osteoblastos ou células

osteoprogenitoras, ativando a sua proliferação ou diferenciação. Assim sendo, os osteoblastos exercem um papel central no metabolismo e fisiologia ósseos, uma vez que sintetizam a matriz extracelular, controlam a sua mineralização e comandam a reabsorção óssea.

À medida em que a atividade osteoblástica de formação óssea prossegue, algumas dessas células podem se tornar encarceradas pelo seu próprio produto (a matriz óssea). Uma vez embebidos na matriz óssea, os osteoblastos sofrem mudanças morfológicas e metabólicas e, então, são chamados de *osteócitos*. Estas células estão localizadas em lacunas na matriz óssea, das quais partem canalículos onde estão situados prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos, que os mantêm em contato com outros osteócitos, com osteoblastos e com as células de revestimento encontradas nas superfícies ósseas, compondo uma extensa rede funcional. Ainda não são claras as funções dos osteócitos, porém, há evidências de que eles têm um papel essencial na manutenção da integridade da matriz óssea, já que podem atuar como sensores da condição mecânica e química da matriz óssea e que, por meio de suas comunicações com as células de revestimento, podem ativar o remodelamento ósseo(8). Acredita-se ainda, que os osteócitos apresentam habilidade de depositar e reabsorver osso ao redor de suas lacunas, mudando a forma dessas lacunas.

Um outro grupo importante de células presentes no tecido ósseo são as *células de revestimento*. Essas células se originam a partir de osteoblastos que entram em um estado de relativa quiescência e assumem uma forma achatada. Essas células recobrem todas as superfícies ósseas inativas, ou seja, onde não está ocorrendo formação ou reabsorção óssea. As células de revestimento estão em contato umas com as outras e com os osteócitos, através de junções celulares. Essas células protegem as superfícies ósseas de agentes químicos que possam degradar a matriz óssea e são responsáveis pela liberação imediata de cálcio para a circulação sanguínea. Há evidência, ainda, de que as células de revestimento exercem um papel importante na ativação do remodelamento ósseo e na regulação da diferenciação das células osteoprogenitoras. Uma evidência disso é o fato de que essas células possuem receptores de hormônios e fatores que ativam o remodelamento ósseo (9).

1.1.3 Osteogênese

A osteogênese, formação de osso, ocorre através de dois processos: a ossificação intramembranosa ou ossificação endocondral.

A *ossificação intramembranosa* ocorre no interior de uma membrana conjuntiva. Esse processo de ossificação inicia-se pela condensação de células mesenquimais e posterior vascularização dessa condensação celular, constituindo uma membrana. Em seguida, células mesenquimais da membrana se diferenciam em osteoblastos, os quais começam a sintetizar matriz óssea. Essa matriz é, então, mineralizada, constituindo um centro primário de ossificação. Os vários centros de ossificação crescem radialmente, substituindo a membrana conjuntiva inicial por osso.

O processo de *ossificação endocondral* (Fig. 1) tem início sobre um molde de cartilagem hialina. Na formação dos ossos longos, o molde cartilaginoso possui uma parte média estreita e as extremidades dilatadas, correspondendo à diáfise e epífises, respectivamente. O primeiro tecido ósseo a aparecer é formado por ossificação intramembranosa, a partir do pericôndrio, que reveste a parte média da diáfise, formando um cilindro, chamado de colar ósseo. Enquanto o colar ósseo é formado, os condrócitos por ele envolvidos sofrem multiplicação, hipertrofia, induzem mineralização da matriz cartilaginosa e sofrem apoptose. Vasos sanguíneos atravessam o colar ósseo, levando células osteoprogenitoras, que se proliferam e se diferenciam em osteoblastos. Estes formam camadas contínuas nas superfícies das traves cartilaginosas calcificadas e iniciam síntese da matriz óssea que logo se mineraliza. Forma-se, assim, o tecido ósseo sobre as traves, o que compõe a esponjosa primária. Esse centro de ossificação, que aparece na parte média da diáfise, é chamado de centro de ossificação primário. Seu crescimento rápido, em sentido longitudinal, acaba por ocupar toda a diáfise. No início da formação do centro primário de ossificação, surgem osteoclastos, que reabsorvem o tecido ósseo formado no centro de cartilagem, formando assim, o canal medular. À medida que o canal medular é formado, ele vai sendo ocupado por medula óssea. Posteriormente, formam-se os centros de ossificação secundários, um ou mais em cada epífise. Estes centros formam-se de maneira semelhante ao centro de ossificação primário, mas seu crescimento é radial em vez de longitudinal. A porção central do osso

formado nos centros de ossificação secundários também contém medula óssea. Quando o tecido ósseo formado nos centros secundários ocupa a epífise, o tecido cartilaginoso fica reduzido a uma lâmina epifiseal, entre a diáfise e epífise, que será responsável, de agora em diante, pelo crescimento longitudinal do osso.

Figura 1: Visão geral do desenvolvimento de um osso por ossificação endocondral.

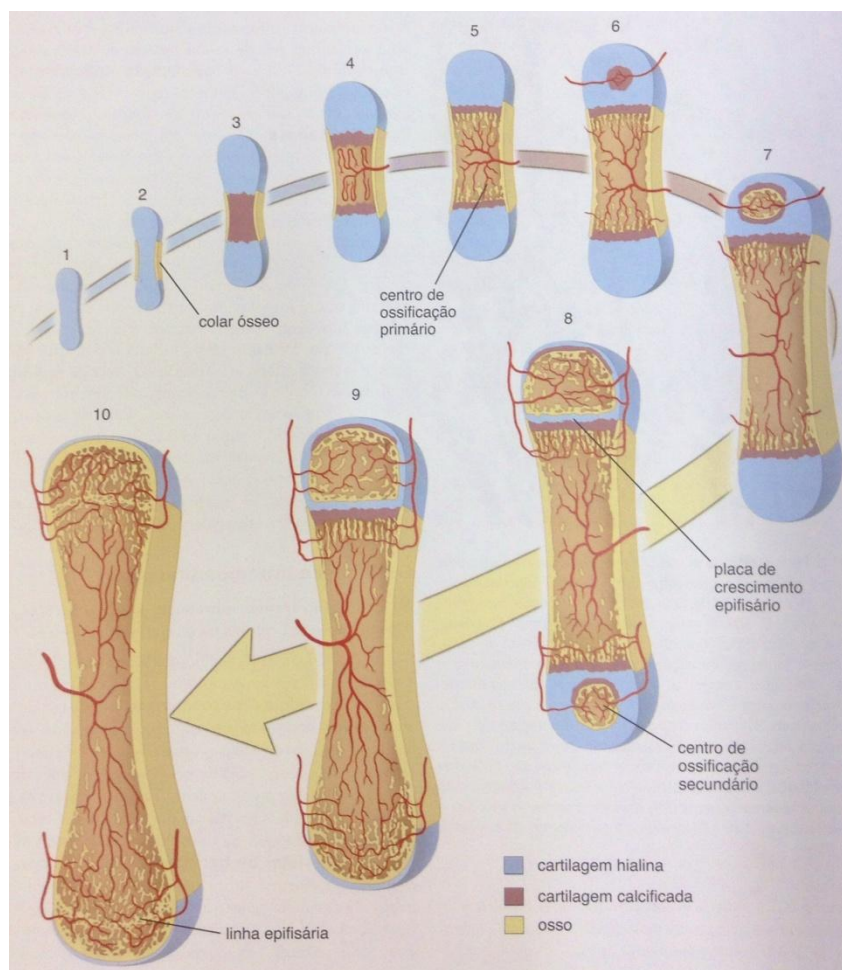


Figura 1: (1) O molde cartilaginoso do futuro osso. (2 e 3) O colar periosteal sendo formado e o início da formação do centro primário de ossificação. (4 e 5) O centro primário começa a se expandir para as extremidades proximal e distal do molde cartilaginoso. (6, 7, 8 e 9) Os centros secundários de ossificação são formados nas extremidades dos moldes cartilagosos, formando a lâmina epifisial entre eles e o centro primário de ossificação. (10) A maturidade do esqueleto é alcançada pela completa substituição da cartilagem na lâmina epifisial por osso, somente a cartilagem articular permanece nas extremidades distais e/ou proximais dos ossos. (10).

1.1.4 Crescimento longitudinal ósseo

O Crescimento longitudinal ósseo é resultado de uma série de processos que ocorrem nas lâminas epifisais, incluindo a proliferação e diferenciação dos condrócitos e a ossificação endocondral. Esses processos resultam na deposição de cartilagem epifiseal no sentido epífise-diáfise e na ossificação endocondral dessa cartilagem, no sentido diáfise-epífise, o que leva ao aumento do comprimento da diáfise. Esses dois processos (deposição de cartilagem e ossificação) são equilibrados, o que mantém a espessura da lâmina epifiseal praticamente constante durante toda a infância. Na adolescência, a ossificação supera a deposição de cartilagem, levando à ossificação total da lâmina e parada do crescimento ósseo longitudinal por volta dos 18 anos na mulher e dos 21 anos no homem.

1.1.4.1 A lâmina epifiseal

A lâmina epifiseal (LE) é uma estrutura cartilaginosa altamente organizada (11). Ela é dividida em zonas (Fig. 2) horizontais de condrócitos em diferente estágios de diferenciação: zona de reserva, zona proliferativa, zona pré hipertrófica e zona hipertrófica (11). A *zona de reserva* contém condrócitos dispersos na matriz extracelular. Essas células parecem ser cruciais para a orientação das colunas de condrócitos na zona proliferativa e, conseqüentemente, para o crescimento ósseo unidirecional. Por um estímulo ainda não conhecido, os condrócitos da zona de reserva sofrem divisões na direção longitudinal e se organizam em colunas, formando a *zona proliferativa*. Os condrócitos proliferativos sintetizam uma grande quantidade de proteínas da matriz extracelular, que são essenciais para a estrutura da lâmina epifiseal. Num dado momento, em função de um número definido de divisões ou em função da exposição a determinados fatores, os condrócitos proliferativos perdem sua capacidade de divisão, começam a diferenciar e sofrem hipertrofia, tornando-se pré-hipertróficos. Os condrócitos pré-hipertróficos localizam-se na região denominada *zona pré-hipertrófica*. Em seguida essas células (condrócitos pré-hipertróficos) se diferenciam em hipertróficos, formando então a *zona hipertrófica*. Este estágio é caracterizado por um aumento da concentração intracelular de cálcio, que é essencial para a produção de vesículas da matriz, que

são liberadas pelos condrócitos. Essas vesículas liberam hidroxapatita e metaloproteinases da matriz, resultando na mineralização da matriz ao redor da vesícula. Esse processo de mineralização atrai vasos sanguíneos. Em seguida, os condrócitos hipertróficos sofrem apoptose, deixando um suporte para a formação do osso, configurando o início da ossificação endocondral. Os septos deixados pelos condrócitos são reabsorvidos pelos osteoclastos. Ao mesmo tempo, osteoblastos começam a sintetizar tecido ósseo. A combinação da proliferação e maturação dos condrócitos e da produção de matriz extracelular, seguidos da ossificação endocondral, são os maiores contribuintes para o crescimento longitudinal ósseo.

1.2 O hormônio tireoideano

A glândula tireóide tem origem endodérmica que se desenvolve precocemente na porção cefálica do tubo digestivo(12) e está localizada imediatamente inferior a laringe, ocupando as regiões laterais e anterior da traquéia. Possui dois lobos que são unidos por um istmo e é envolta por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo. Os produtos secretórios da glândula tireóide são as iodotironinas, compostos resultantes da ligação de duas moléculas de tirosina iodadas. Nos mamíferos, entre 60-90% da produção tireoideana corresponde a 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina ou T4), 10-40% corresponde a 3,5,3'-triodotironina (T3) e menos do que 1% é representado por outras iodotironinas (T3 reverso e T2). A ação do hormônio tireoideano depende de sua interação com os seus receptores nucleares (TRs), que agem como fatores de transcrição. A afinidade dos receptores nucleares de hormônios tireoideanos (TRs) é aproximadamente 10 vezes maior pelo T3 em relação ao T4. Por conta disso, considerando os efeitos genômicos do hormônio tireoideano, o T4 funciona como um pró-hormônio, e o T3 como o hormônio ativo. O T4 é convertido a T3, por ação de enzimas celulares, as selenodesiodases das iodotironinas. Essa conversão ocorre na própria tireóide e, principalmente, nos tecidos alvo do hormônio tireoideano (13). Existem três isoformas dessas enzimas, as desiodases do tipo I, II e III (D1, D2 e D3). A D1 converte T4 a T3, T4 a T3 reverso (rT3) e T3 a T2, sendo, portanto, ativadora e inativadora dos hormônios tireoideanos. A D2 converte T4 a T3 e rT3 a T2. O T4 é o principal substrato da D2, o que faz dela uma enzima prioritariamente ativadora de

T4. A D3 é a principal inativadora dos hormônios tireoideanos, convertendo T4 a rT3, e T3 a T2. O hipotireoidismo regula positivamente a atividade da D2 e negativamente a atividade da D3, o oposto sendo observado em casos de tireotoxicose (14).

Como dito anteriormente, a ação do hormônio tireoideano depende da sua interação com os seus receptores nucleares, os TRs. Há dois genes que codificam TRs, o TR α e o TR β , os quais codificam por *splicing* alternativo, o TR α 1 e TR α 2 e o TR β 1 e TR β 2, respectivamente. As quatro isoformas de TRs apresentam domínio de ligação ao DNA (DBD). Por outro lado, o TR α 1TR β 1 e TR β 2 possuem domínio de ligação ao ligante (LDB) e, portanto, se ligam ao T3, enquanto o TR α 2 não apresenta LDB agindo como um fraco antagonista do hormônio tireoideano (15). O TR β 2 é primariamente expresso no hipotálamo e na hipófise, onde medeia a regulação do feedback negativo do TSH e TRH (16). Tanto o TR α 1 quanto o TR β 1 são expressos, mas de forma heterogênea, na maioria dos tecidos corporais. No esqueleto, observa-se a expressão de ambos os receptores, sendo que, no tecido ósseo, a expressão do TR α é dez vezes maior do que a do TR β (17, 18).

1.2.1 Ações do hormônio tireoideano no esqueleto.

O hormônio tireoideano (HT) é essencial para o desenvolvimento, crescimento e metabolismo ósseos. A triiodotironina (T3) estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea através da regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos (19). O excesso de HT estimula mais a atividade osteoclástica do que a osteoblástica, o que resulta em aumento da calcemia e redução da massa óssea. Durante o desenvolvimento, a deficiência do hormônio tireoideano causa atraso generalizado na ossificação intramembranosa e endocondral, somando-se a importantes alterações na lâmina epifisial, tais como redução da sua espessura, desorganização das colunas de condrócitos e prejuízo na diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos(20), resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas(21). Por outro lado, o excesso de hormônio tireoideano resulta em maturação esquelética acelerada com fechamento prematuro da lâmina epifisial, e com subsequente diminuição do crescimento longitudinal ósseo (18, 21).

Embora a importância do hormônio tireoidiano no desenvolvimento e metabolismo ósseo seja clara, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos que medeiam os efeitos desse hormônio no tecido ósseo. Sabe-se que o hormônio tireoidiano pode agir de maneira direta ou indireta no esqueleto. Acredita-se que grande parte das suas ações diretas seja mediada por receptores nucleares de hormônio tireoidiano, os TRs. A identificação das isoformas TR α 1, TR α 2 e TR β 1 nos osteoblastos e osteoclastos, e nos condrócitos da lâmina epifisial, assim como a responsividade dessas células ao T3 em culturas isoladas(20, 22), evidenciam a ação direta do T3 no tecido ósseo, contudo a importância funcional das diferentes isoformas de TR no esqueleto é ainda é pouco conhecida.

O hormônio tireoideano também age no tecido ósseo indiretamente, através do eixo GH/IGF-I. A transcrição do gene do GH é estimulada pelo T3, o que faz com que o hipotireoidismo seja acompanhado de uma menor atividade do eixo GH/IGF-I (23). Sabe-se que tanto o GH quanto o IGF-I apresentam efeitos importantes no osso, tais como a indução da proliferação e diferenciação dos condrócitos da lâmina epifisial(24) e dos osteoblastos (25), regulando, assim, o crescimento longitudinal ósseo e a massa óssea. A interação entre as vias de ação do T3 e GH na regulação do metabolismo ósseo ocorre em várias etapas, além do efeito do T3 na regulação da transcrição gênica do GH. O hormônio tireoideano, assim como o GH, é capaz de regular a expressão local de IGF-I. Lewinson, Bialik e Hochberg(26) mostraram que a expressão proteica de IGF-I na cartilagem condilar está reduzida em ratos hipotireoideos e que o hormônio tireoideano é requerido para sua restauração. Além disso, foi demonstrado que o T3 aumenta a expressão proteica de IGF-I em cultura de osteoblastos de ratos (27). O hormônio tireoideano também atua no eixo GH/IGF-I, regulando a expressão dos receptores destes fatores. Foi mostrado que o tratamento com T3 restaura a expressão do receptor de GH (GHR) na lâmina epifisial de ratos hipofisectomizados (24) e induz a expressão gênica do receptor de IGF-1 (IGF-1R) em condrócitos da lâmina epifisial de ratos (28).

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 (SNP) e

Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). A grande maioria das fibras pós-ganglionares simpáticas tem a noradrenalina como neurotransmissor, sendo, portanto, adrenérgica(29).

O sistema adrenérgico é um regulador essencial de funções neurais, endócrinas, cardiovasculares, vegetativas e metabólicas. As catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, transmitem seus sinais biológicos via receptores acoplados à proteína G para regular uma variedade de funções celulares (30). 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 alvos desse sistema, há receptores α -adrenérgicos e/ou β -adrenérgicos. São conhecidos 9 subtipos de receptores adrenérgicos, os quais se subdividem em: α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}) (31), α_2 (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) e β (β_1 , β_2 e β_3) (32). Todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos são ativados pela adrenalina e noradrenalina.

Todas as isoformas de receptores β -adrenérgicos estimulam a adenilato ciclase (AC) e, portanto, induzem a síntese de 3',5'-adenosina cíclico (AMPc) (33), que é, portanto, o segundo mensageiro das ações da noradrenalina mediadas pelos receptores β -adrenérgicos. Por outro lado, os receptores α_2 inibem a AC e, portanto, diminuem a formação de AMPc, antagonizando as ações mediadas pelos receptores β -adrenérgicos.

Os receptores adrenérgicos α_2 (α_2 -ARs) são autorreceptores pré-sinápticos (modulam a liberação de neurotransmissores pelo próprio neurônio) que regulam negativamente a liberação de catecolaminas. Além de estarem localizadas em membranas pré-sinápticas de terminações simpáticas e em neurônios adrenérgicos do SNC, os receptores adrenérgicos α_2 também estão localizados em membranas pós-sinápticas de uma série de tecidos e estruturas, incluindo vasos, veias, miométrio e ilhotas pancreáticas (31), onde atuam na regulação da pressão arterial, do processo de analgesia e sedação e na modulação do comportamento e dor (34).

Os receptores α_1 atuam principalmente na regulação do tônus vascular e no desenvolvimento cardíaco, além de participar da modulação do comportamento. Esses receptores α_1 localizam-se no SNC, átrio direito, ventrículo, fígado, baço, íleo,

glândulas parótidas, mucosa nasal, bexiga, uretra, corpo cavernoso próstata e também nos vasos e veias de diversos tecidos (31, 34).

1.3.1 Ações do sistema nervoso simpático no esqueleto.

Um dos mais importantes achados dos últimos anos foi o de que o remodelamento ósseo também está sujeito ao controle do SNC, com o SNS agindo como efetor periférico(35, 36). Uma quantidade substancial de evidências demonstra que o SNS regula negativamente a formação óssea e positivamente a reabsorção óssea (37, 38). Assim, é esperado que a diminuição e o aumento do tônus simpático resultem, respectivamente, em alto e baixo fenótipo de massa óssea.

O papel do SNS no controle do remodelamento ósseo foi evidenciado pelo fenótipo de alta massa óssea (AMO) em modelos de camundongos com baixa atividade simpática, como em animais Ob/Ob, que são deficientes de leptina, e em animais deficientes de dopamina β -hidroxilase ($DbH^{-/-}$), a enzima limitante responsável pela síntese de catecolaminas (39). Esses modelos animais, entretanto, apresentam disfunções endócrinas, incluindo hipercortisolismo, hiperinsulinemia e hipogonadismo, que podem interferir nos efeitos do SNS no osso. Um papel mais preciso do β_2 -AR na massa óssea foi mostrado por análises de animais com inativação gênica (*knockout* = KO) desses receptores, os camundongos β_2 -AR^{-/-}, que não apresentam anormalidades endócrinas ou metabólicas. Esses animais apresentam peso corporal normal, mas apresentam também um fenótipo de AMO a partir dos 6 meses de idade, que ocorre devido a um aumento da formação e diminuição da reabsorção óssea (40). Adicionalmente, esses animais são resistentes à perda de massa óssea induzida por ovariectomia.

Apesar de um crescente corpo de evidências de que a sinalização do β_2 -AR é um elemento chave na regulação do remodelamento ósseo, experimentos farmacológicos e genéticos têm produzido resultados contrastantes e inconclusivos. É digno de nota que a administração de alguns agonistas β -adrenérgicos, como salbutamol (41, 42), clenbuterol (41, 43) e formoterol(44) promoveram efeitos positivos na massa óssea de ratos. Além disso, os efeitos positivos dos β bloqueadores não são sempre detectáveis e parecem ser dose-dependentes, com diminuição dos benefícios em altas doses (42). Em humanos, uma série de estudos

mostrou que a administração desses β bloqueadores promove efeitos positivos(42, 45), negativos (46) ou não promove efeitos(47, 48) na densidade mineral óssea (DMO) e/ou em fraturas ósseas. Assim, os efeitos dos β agonistas no metabolismo ósseo permanecem controversos.

Um estudo recente do nosso grupo analisou o fenótipo esquelético de um modelo de camundongo com hiperatividade simpática crônica(49). Esse modelo animal é baseado no duplo KO dos genes α_{2A} - e do α_{2C} dos receptores adrenérgicos (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}). Como mencionado anteriormente nesta revisão, os receptores adrenérgicos α_2 (α_2 -ARs) são autorreceptores pré-sinápticos que regulam negativamente a liberação de catecolaminas. Três subtipos de α_2 -ARs foram identificados: α_{2A} -AR, α_{2B} -AR e α_{2C} -AR(50). A ativação desses receptores no tronco encefálico leva a uma redução no tônus simpático, o que resulta em diminuição da frequência cardíaca e da pressão sanguínea (1, 51). Esses efeitos são potencializados pela estimulação dos α_2 -ARs em terminações nervosas simpáticas(48), mostraram que o bloqueio simultâneo do α_{2A} -ARs e do α_{2C} -ARs em camundongos leva a uma elevação crônica do tônus simpático. Esses camundongos KOs apresentam alta mortalidade e diminuição da função cardíaca a partir dos 4 meses de idade (52).

De acordo com o esperado, vimos que os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam níveis plasmáticos elevados de noradrenalina (NE) e hipertrofia cardíaca (determinada pelo aumento da massa seca do músculo cardíaco), o que confirma a hiperatividade do SNS. Considerando-se as evidências de que a ativação do SNS apresenta efeitos negativos na massa óssea, a nossa expectativa era a de que os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentassem um esqueleto osteopênico. Surpreendentemente, vimos que esses animais apresentam um fenótipo generalizado de AMO(1).

A análise da massa óssea por *dual energy X-ray absorptiometry* (DXA) por um período de 12 semanas mostrou que o fenótipo de AMO nos animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} se torna mais evidente à medida que os animais envelhecem. Análises histomorfométricas mostraram um aumento de osso trabecular no corpo vertebral da quinta vértebra lombar (L5). Análises por μ CT também mostraram aumento de osso trabecular, além de mostrar uma melhor conexão entre as trabéculas e maior quantidade de trabéculas em forma de placas no fêmur e na vértebra dos animais

KOs. As melhorias na massa óssea e na microarquitetura trabecular apresentadas por esses animais KOs foram acompanhadas por melhoras nos parâmetros biomecânicos do fêmur e da tíbia. Nesses dois sítios esqueléticos, a carga máxima (uma medida de força óssea) estava significativamente elevada nos animais KOs (8-18%). Além disso, a resiliência, que reflete a habilidade do osso de sofrer deformação elástica, também estava aumentada na tíbia desses animais comparados aos animais selvagens (1).

O fato de que animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam fenótipo de AMO, mesmo apresentando elevação do tônus simpático e sinalização normal do $\beta_2\text{-AR}$, levanta a hipótese de que os receptores $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e/ou $\alpha_{2C}\text{-AR}$ também apresentam um papel na mediação, direta ou indireta, das ações do SNS no esqueleto. Os receptores α_2 -adrenérgicos foram inicialmente caracterizados como receptores pré-sinápticos que regulam a liberação de NE (53). Depois, foi mostrado que esses receptores não inibem só a liberação de outros neurotransmissores, mas que também podem regular a exocitose de outros neurotransmissores no SNC e periférico (54). Como também já foi mencionado nesta revisão, estudos mostram que os $\alpha_2\text{-ARs}$ não estão restritos a localidades pré-sinápticas, mas também possuem funções pós-sinápticas, que incluem regulação da temperatura corporal, pressão intraocular, lipólise e percepção da dor (54, 55). Nós mostramos que o $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e $\alpha_{2C}\text{-AR}$ são expressos no tecido ósseo de camundongos selvagens e em células MC3T3-E1, que são células osteoblasto-*like* derivadas da calvaria de camundongos. Além disso, observamos a expressão proteica, por imunohistoquímica, do $\alpha_{2A}\text{-AR}$ e $\alpha_{2C}\text{-AR}$ em condrócitos da zona de reserva e pré-hipertrófica da lâmina epifisial da tíbia de camundongos de 35 dias de idade. Detectamos, ainda, a expressão protéica desses receptores em condrócitos da cartilagem articular de ossos longos e em condrócitos hipertróficos de centros de ossificação secundários (1).

Coletivamente, os recentes achados do nosso grupo trazem novas evidências de que a regulação da fisiologia e estrutura esqueléticas pelo SNS é extremamente complexa. O fato de que os animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentam fenótipo de AMO mesmo apresentando uma elevação no tônus simpático e $\beta_2\text{-AR}$ intacto sugere que o $\beta_2\text{-AR}$ não é o único adrenoceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo. Além disso, os nossos achados também levantam a hipótese de que os adrenoceptores α_{2A} e/ou α_{2C} apresentam um papel importante na mediação das

ações do SNS na regulação da massa óssea. Por outro lado, a presença dos receptores α_2 adrenérgicos na lâmina epifisial e em condrócitos hipertróficos de centros de ossificação secundários levanta a hipótese de que o SNS, o α_{2A} -AR e/ou o α_{2C} -AR tenham um papel no processo de crescimento longitudinal ósseo e de ossificação do esqueleto. Essa hipótese vem ganhando força a partir de estudos em andamento no nosso laboratório (Projeto FAPESP de número: 2010/06409-0), onde pudemos observar que camundongos adultos com inativação isolada do α_{2A} -AR e do α_{2C} -AR apresentam um menor comprimento longitudinal ósseo do fêmur.

1.4 Evidências de que o hormônio tireoideano interage com o sns via receptores α_2 adrenérgicos para regular a estrutura e fisiologia ósseas.

Uma característica importante do HT, mas ainda pouco entendida, é a sua interação com o SNS. É bem sabido que essa interação é necessária para que ocorra a máxima termogênese, lipólise, glicogenólise e gluconeogênese (56). Estudos anteriores mostraram que pacientes com hipertireoidismo apresentam tônus simpático elevado (57). Considerando-se que o excesso de HT causa perda de massa óssea e que a ativação do SNS também apresenta efeito negativo na massa óssea, levantamos a hipótese de que o HT também interage com o SNS para regular o metabolismo ósseo e, conseqüentemente, a massa óssea. Uma evidência dessa possível interação é o fato de que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol (antagonista β -adrenérgico) corrige secundariamente a hipercalcemia (58). Além disso, pacientes com hipotireoidismo tratados com propranolol apresentam redução da excreção de hidroxiprolina pela urina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea.

Para investigar essa hipótese, tratamos camundongos fêmeas selvagens e α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} de 40 dias de idade com doses suprafisiológicas de T3 (10xT3=3,5 μ g/100g PC/dia) por 80 dias. Como esperado, os animais selvagens tratados com T3 apresentaram diminuição na DMO do fêmur (13%, $p<0,01$), vértebras (14%, $p<0,001$) e corpo posterior, que inclui a coluna lombar, pélvis e membros posteriores (11%, $p<0,01$). Surpreendentemente, vimos que os animais KOs tratados com T3 não apresentaram diminuição da DMO, ou seja, são resistentes à osteopenia induzida pelo T3. Mostramos, ainda, que o T3 inibe a

expressão do α_{2C} -AR no osso de camundongos. Também observamos que o T3 reduziu significativamente a expressão da osteoprotegerina (OPG), uma proteína que limita a atividade osteoclástica, nos animais selvagens, mas não nos animais KOs(1).Esse estudo sugere fortemente que o HT interage com o SNS para regular a massa óssea.

Como mencionado anteriormente, estudos em andamento no nosso laboratório (Projeto FAPESP de número: 2010/06409-0) mostram que camundongos adultos com inativação isolada do α_{2A} -AR ou do α_{2C} -AR apresentam um menor comprimento longitudinal ósseo do fêmur. Mais importante, ainda, esses estudos mostram que o tratamento, por 30 ou 90 dias, com dose suprafisiológica de T3 prejudica o crescimento longitudinal ósseo do fêmur e tibia de camundongos selvagens, mas não afeta o crescimento ósseo de camundongos com inativação isolada do α_{2A} -AR ou do α_{2C} -AR.

A observação de que os animais α_{2A} -AR^{-/-} e α_{2C} -AR^{-/-} são resistentes à diminuição do comprimento dos ossos induzida pela tirotoxicose, associada ao fato de que detectamos a expressão desses receptores em condrócitos da zona de reserva e pré-hipertrófica da lâmina epifisial da tibia de camundongos(1)sugere fortemente uma interação do HT com o SNS, via α_{2A} -AR e/ou α_{2C} -AR, para regular o crescimento longitudinal ósseo.

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

2 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados apresentados no presente estudo reforçam a hipótese de que o SNS regula o crescimento longitudinal ósseo e que há uma interação entre o HT e o SNS, para regular esse processo. Além disso, os nossos achados sugerem que o α_{2C} -AR participa das ações do SNS no crescimento e desenvolvimento ósseos e que esse receptor, também, participa da interação do HT com o SNS nesses processos.

REFERÊNCIAS*

1. Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. *J Bone Miner Res.* 2011 Mar;26(3):591-603.
2. 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.
3. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2009 Jul;20(5):230-6.
4. Lee DO, Jee BC, Ku SY, Suh CS, Kim SH, Choi YM, et al. Relationships between the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene G3174A polymorphism, serum IGF-I levels, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *J Bone Miner Metab.* 2008;26(1):42-6.
5. Tortora GJ. *Princípios de Anatomia Humana.* Koogan G, editor. Rio de Janeiro;2007.
6. Fattini CA. *Anatomia básica dos sistemas orgânicos.* São Paulo: Atheneu;2009.
7. Robey PG, Boskey AL. *Extracellular matrix and biomineralization of bone.* Washington: MJ F; 2003.
8. Knothe Tate ML AJ, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *J Biochem Cell Biol.* 2004;1-8.
9. Franz-Odenall TA HB, Witten PE. How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics.* 2006:176-90.
10. Michael H. Ross WP. *Ossificação endocondral.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
11. van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev.* 2003 Dec;24(6):782-801.
12. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
13. Engler D, Burger AG. The deiodination of the iodothyronines and of their derivatives in man. *Endocr Rev.* 1984 Spring;5(2):151-84.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors.[Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

14. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):38-89.
15. Nicholls JJ, Brassill MJ, Williams GR, Bassett JH. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol.* 2012 Jun;213(3):209-21.
16. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest.* 2001 Apr;107(8):1017-23.
17. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):789-99.
18. O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, Kaneshige M, Kaneshige K, Cheng SY, et al. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol.* 2003 Jul;17(7):1410-24.
19. Pijl H, de Meijer PH, Langius J, Coenegracht CI, van den Berk AH, Chandie Shaw PK, et al. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec;86(12):5848-53.
20. Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone.* 1997 Aug;21(2):137-42.
21. Allain TJ MA. Thyroid hormones and bone. *J Endocrinol.* 1993:9-18.
22. 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 Dec;135(6):2375-85.
23. 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 Feb;132(2):781-8.
24. Gevers EF, van der Eerden BC, Karperien M, Raap AK, Robinson IC, Wit JM. Localization and regulation of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in the rat growth plate. *J Bone Miner Res.* 2002 Aug;17(8):1408-19.
25. Barnard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology.* 1991 Mar;128(3):1459-64.

26. Lewinson D, Harel Z, Shenzer P, Silbermann M, Hochberg Z. Effect of thyroid hormone and growth hormone on recovery from hypothyroidism of epiphyseal growth plate cartilage and its adjacent bone. *Endocrinology*. 1989 Feb;124(2):937-45.
27. Lakatos P, Caplice MD, Khanna V, Stern PH. Thyroid hormones increase insulin-like growth factor I content in the medium of rat bone tissue. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8(12):1475-81.
28. Ohlsson C, Nilsson A, Isaksson O, Bentham J, Lindahl A. Effects of tri-iodothyronine and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on alkaline phosphatase activity, [3H]thymidine incorporation and IGF-I receptor mRNA in cultured rat epiphyseal chondrocytes. *J Endocrinol*. 1992 Oct;135(1):115-23.
29. Machado AB. *Neuroanatomia funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.
30. Hoffmann BB LR. *Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists*. Therapeutics GGspbo. New York, 1996.
31. Civantos Calzada B, Aleixandre de Artinano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res*. 2001 Sep;44(3):195-208.
32. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1994 Jun;46(2):121-36.
33. Rang, HP. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
34. Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V, Hein L. alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biol Cell*. 2004 Jun;96(5):343-8.
35. Ducky P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):197-207.
36. Togari A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc Res Tech*. 2002 Jul 15;58(2):77-84.
37. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):305-17.
38. Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, Togari A. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochem Pharmacol*. 2001 Mar 1;61(5):579-86.

39. Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Richard O, et al. Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone*. 2005 Nov;37(5):622-33.
40. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):514-20.
41. Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008 Apr-Jun;8(2):94-104.
42. Wang L, Shao YY, Ballock RT. Leptin synergizes with thyroid hormone signaling in promoting growth plate chondrocyte proliferation and terminal differentiation in vitro. *Bone*. 2011 May 1;48(5):1022-7.
43. Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA*. 2004 Sep 15;292(11):1326-32.
44. Cavalie H, Lac G, Lebecque P, Chanteranne B, Davicco MJ, Barlet JP. Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. *J Appl Physiol* (1985). 2002 Dec;93(6):2034-7.
45. Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen BR, Kolthoff N, Brixen K, et al. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. *Calcif Tissue Int*. 2004 Nov;75(5):365-72.
46. Martineau L, Horan MA, Rothwell NJ, Little RA. Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Nov;83(5):615-21.
47. Reid IR, Gamble GD, Grey AB, Black DM, Ensrud KE, Browner WS, et al. beta-Blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2005 Apr;20(4):613-8.
48. Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*. 1999 Nov 11;402(6758):181-4.
49. Knaus AE, Muthig V, Schickinger S, Moura E, Beetz N, Gilsbach R, et al. Alpha2-adrenoceptor subtypes--unexpected functions for receptors and ligands derived from gene-targeted mouse models. *Neurochem Int*. 2007 Oct;51(5):277-81.
50. Ruffolo RR, Jr., Nichols AJ, Hieble JP. Metabolic regulation by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. *Life Sci*. 1991;49(3):171-83.
51. Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Nov;283(5):H1838-45.

52. Maltin CA, Delday MI, Watson JS, Heys SD, Nevison IM, Ritchie IK, et al. Clenbuterol, a beta-adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Jun;84(6):651-4.
53. Katsumata K, Nishizawa K, Unno A, Fujita Y, Tokita A. Association of gene polymorphisms and bone density in Japanese girls. *J Bone Miner Metab*. 2002;20(3):164-9.
54. Bouxsein ML, Devlin MJ, Glatt V, Dhillon H, Pierroz DD, Ferrari SL. Mice lacking beta-adrenergic receptors have increased bone mass but are not protected from deleterious skeletal effects of ovariectomy. *Endocrinology*. 2009 Jan;150(1):144-52.
55. Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. *Acta Med Scand*. 1978;204(1-2):97-102.
56. Rude RK, Oldham SB, Singer FR, Nicoloff JT. Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol. *N Engl J Med*. 1976 Feb 19;294(8):431-3.
57. Beylot M, Vincent M, Benzoni D, Bodson A, Riou JP, Mornex R. Effects of propranolol and indomethacin upon urinary hydroxyproline in hyperthyroid patients (author's transl). *Nouv Presse Med*. 1982 Mar 20;11(13):989-91.
58. Beber EH, Capelo LP, Fonseca TL, Costa CC, Lotfi CF, Scanlan TS, et al. The thyroid hormone receptor (TR) beta-selective agonist GC-1 inhibits proliferation but induces differentiation and TR beta mRNA expression in mouse and rat osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*. 2009 Apr;84(4):324-33.
59. Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone*. 1999 Dec;25(6):623-9.
60. Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS, Kobilka BK. Targeted inactivation of the gene encoding the mouse alpha 2c-adrenoceptor homolog. *Mol Pharmacol*. 1995 Jul;48(1):48-55.
61. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. Elsevier; 2006.