

**Universidade de São Paulo**  
**Instituto de Ciências Biomédicas III**  
**Pós-graduação Biologia dos Sistemas**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO DO HORMÔNIO  
TIREOIDIANO COM O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO, VIA  
RECEPTORES  $\beta$ 2-ADRENÉRGICOS, NO TECIDO ÓSSEO E  
EM OSTEOLASTOS**

**Bianca Neofiti Papi**

**SÃO PAULO**

**2023**

**Bianca Neofiti Papi**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO DO HORMÔNIO  
TIREOIDIANO COM O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO, VIA  
RECEPTORES  $\beta$ 2-ADRENÉRGICOS, NO TECIDO ÓSSEO E  
EM OSTEÓBLASTOS**

Tese de Doutorado apresentado ao programa de Pós-Graduação Biologia de Sistemas, área de concentração Biologia Morfofuncional, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia

**SÃO PAULO**

**2023**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Neofiti Papi, Bianca

Avaliação In Vitro da Interação do Hormônio Tireoidiano com o Sistema Nervoso Simpático, via receptores Beta2-Adrenérgicos, no Tecido Ósseo e em Osteoblastos / Bianca Neofiti Papi; orientadora Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira. -- São Paulo, 2023.

60 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hormônio Tireoidiano. 2. Sistema Nervoso Simpático. 3. Receptores Beta2-Adrenérgicos. 4. Osteoblastos. 5. Tecido Ósseo. I. Helena de Azevedo Gouveia Ferreira, Cecília, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): BIANCA NEOFITI PAPI

Título da Dissertação/Tese: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO COM O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO, VIA RECEPTORES  $\beta$ 2-ADRENÉRGICOS, NO TECIDO ÓSSEO E EM OSTEÓBLASTOS

Orientador: DRA. CECÍLIA HELENA DE AZEVEDO GOUVEIA FERREIRA

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**                      (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

**CERTIFICADO : EMENDA** v29/08/2018

Certificamos que a EMENDA (versão de 29/08/2018) da proposta intitulada "Avaliação in Vitro da interação do Hormônio Tireoideano com o Sistema Nervoso Simpático, via Receptores Alfa2 Adrenérgico, em Osteoblastos", CEUA nº 2025041217 (ID 012412), sob a responsabilidade de **Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira e equipe; Bianca Neofiti Papi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) em 21/09/2018.

Término previsto: **02/2022** : (48 meses).

Origem: Biotério do Departamento de Anatomia  
Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Machos Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 36  
Linhagem: FVB

Origem: Biotério do Departamento de Anatomia  
Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Fêmeas Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 72  
Linhagem: FVB

Origem: Biotério do Departamento de Anatomia  
Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Machos Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 36  
Linhagem: Beta2 - AR/-

Origem: Biotério do Departamento de Anatomia  
Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Fêmeas Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 72  
Linhagem: Beta2 - AR/-

**ANIMAIS UTILIZADOS**

		Quantidade Aprovada	Quantidade Utilizada
Camundongos isogênicos	Machos	177	0
Camundongos isogênicos	Fêmeas	354	0

São Paulo, 10 de janeiro de 2023



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO IN VITRO DA INTERAÇÃO DO HORMÔNIO TIROIDEANO COM O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO, VIA RECEPTORES BETA 2 ADRENÉRGICOS, NO TECIDO ÓSSEO E EM OSTEOBLASTOS", protocolada sob o CEUA nº 4388031022 (ID 002844), sob a responsabilidade de **Cecilia Helena de Azevedo Gouveia Ferreira e equipe; Bianca Neofiti Papi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 06/12/2022.

We certify that the proposal "IN VITRO EVALUATION OF THE INTERACTION OF THYROID HORMONE WITH THE SYMPATHIC NERVOUS SYSTEM, VIA ADRENERGIC BETA 2 RECEPTORS, IN BONE TISSUE AND IN OSTEOBLASTS", utilizing 190 isogenic mice (males and females), protocol number CEUA 4388031022 (ID 002844), under the responsibility of **Cecilia Helena de Azevedo Gouveia Ferreira and team; Bianca Neofiti Papi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 12/06/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **12/2022 a 08/2024 (20 meses)** Área: **Anatomia**

Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 15
Linhagem:	FVB		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 15
Linhagem:	Beta2 - AR -/-		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 30
Linhagem:	FVB		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Fêmeas	Peso ou idade: 2 a 8 meses N: 30
Linhagem:	Beta2 - AR -/-		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos e Fêmeas	Peso ou idade: 0 a 4 dias N: 50
Linhagem:	FVB		
Origem:	Biotério do Departamento de Anatomia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos e Fêmeas	Peso ou idade: 0 a 4 dias N: 50
Linhagem:	Beta 2 - AR -/-		

São Paulo, 10 de janeiro de 2023



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro, gostaria de agradecer a Deus pela minha vida, e por todas as conquistas, oportunidades e experiências que tive nesses 7 anos de pós-graduação, entre mestrado e doutorado.

A meus pais, Cláudia e Rogério, que são meu exemplo de vida. Que me deram e dão todo apoio, incentivo e amor. Que vibraram comigo em cada momento e que estavam sempre ali para uma palavra de conforto e um abraço. Por acreditarem e sonharem comigo esse sonho, por me ensinarem como a vida pode ser leve mesmo em meio ao caos. Essa conquista é nossa. Sou muito grata e honrada por ser filha de vocês.

Ao meu irmão, Bruno, pelo amor e carinho que temos um pelo outro. Pela nossa parceria e por ser meu amigo. Mesmo com a distância nós sempre estávamos, e estamos perto. Obrigada por cada momento juntos, de muita risada, abraços, brincadeiras. Obrigada por toda ajuda e principalmente por ser o meu irmão. Você é muito importante e especial para mim. A minha cunhada Rafaela por ser uma mulher de luz e por sua alegria contagiante. Obrigada por ser minha família e por momentos tão especiais. Obrigada aos dois pela minha maior riqueza que é a Betânia. A tia/madrinha estará sempre aqui com você e por você.

A todos os meus familiares, em especial a minha tia Silvia, tio Aldemar e Cristiano, que sempre estiveram comigo nessa jornada, por toda torcida, força e parceria. Obrigada pelo amor e carinho que têm por mim, e saibam que é totalmente recíproco. Obrigada por tudo.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cecília Gouveia, por me acolher com carinho e paciência em seu laboratório. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, abraços, amizade e por estar ao meu lado. Que alegria poder dizer que eu faço parte do grupo LMO. Obrigada por me permitir experimentar e vivenciar momentos incríveis na ciência durante esses 7 anos. É um prazer ter você como minha Mestre.

Ao meu amigo Jean, que chegou de mansinho e em pouco tempo já se tornou família. Obrigada pelas nossas conversas, pelas risadas, pela parceria, pelas trocas,

pelos abraços, por todos os momentos compartilhados e vividos, e por ser meu irmão. Eu não tenho palavras que expressam a minha imensa gratidão por tudo que fez por mim e por tudo que significa para mim. Obrigada pela nossa amizade, que é muito especial, e pelo nosso companheirismo. Que sorte a minha viver nessa vida com você.

A minha amiga da vida Marina, ao meu cunhado Diogo e meu afilhado Théo. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pela parceria, por tudo que já passamos juntos até aqui e por estarem ao meu lado. Vocês são muito especiais. Obrigada por serem minha família.

Aos meus amigos do LMO, Lais, Manuela, Gisele e Vitor. Obrigada por toda parceira, paciência, conversas, ensinamentos, risadas, carinho, estudos, ajudas, companhia e pela amizade que levarei para a vida toda. Vocês fizeram muita falta nos meus últimos 2 anos de doutorado, no meu dia a dia de lab. Ainda bem que temos a tecnologia para encurtar essas distâncias, que sorte a nossa.

Aos amigos da pós-graduação Guilherme, Naira, Bárbara, Thais, Ammir, Marcos, Henrique, Wenddy, Danilo, Suellen, Fernanda. Obrigada por todos os momentos compartilhados, pelos vários cafés com bolos e muita risada. Com certeza a pós-graduação foi mais gostosa com a presença de vocês.

As funcionárias do multiusuário do departamento, Marta, Sônia, Marina, Kelly, que sempre me ajudaram, e pelas conversas e risadas boas que compartilhamos durante esses anos.

A todos os funcionários, membros das secretarias, em especial a Patrícia, por toda ajuda e paciência durante minha trajetória.

A Universidade de São Paulo e ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III), que me proporcionaram toda a infraestrutura necessária para a realização desse trabalho, pelo acolhimento.



Gostaria de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo de nº 2018/02323-5), pelo apoio financeiro cedido a este projeto (10/2019 – 11/2022).

Gostaria de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil CAPES, pelo apoio financeiro cedido a este projeto no primeiro ano (09/2018 – 09/2019).

A realização desse projeto só foi possível graças ao auxílio concedido por essas duas instituições.

## RESUMO

Neofiti-Papi B. Avaliação *In Vitro* da interação do Hormônio Tireoidiano com o Sistema Nervoso Simpático, via receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos, no Tecido Ósseo e em Osteoblastos. [Tese (Doutorado em Biologia dos Sistemas, área Biologia Morfofuncional)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2022.

Há evidências de que o sistema nervoso simpático (SNS) regula negativamente a massa óssea, via receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos ( $\beta$ 2-AR) expressos em osteoblastos. Recentemente, observamos que camundongos com inativação do receptor  $\beta$ 2-AR ( $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>) são parcialmente resistentes aos efeitos osteopênicos do excesso de hormônio tiroideano (HT) no esqueleto, sugerindo que há interação entre o HT e SNS para regular a massa óssea, envolvendo a sinalização dos receptores  $\beta$ 2-AR. O objetivo deste estudo foi investigar se o HT interage com a via de sinalização do receptor  $\beta$ 2-AR, localmente no tecido ósseo e em osteoblastos, para regular o remodelamento ósseo e a biologia dos osteoblastos. Para tanto, avaliamos o efeito da triiodotironina (T3;  $10^{-8}$  M); clenbuterol (CLE,  $10^{-4}$  M), um agonista  $\beta$ 2-AR; propranolol (PROP;  $10^{-6}$  M), um antagonista  $\beta$ 2-AR; ou a combinação do T3 com essas drogas (T3+CLE ou T3+PROP) em células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, derivada da calvária de camundongos. Em seguida, avaliamos o efeito do T3 ( $10^{-8}$  M); CLE ( $10^{-4}$  M), ou a combinação de ambos (T3+CLE) em culturas primárias de osteoblastos derivados da calvária de camundongos selvagens (Selv) e  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>. Avaliamos, ainda, o efeito do T3, CLE e T3+CLE em culturas de fêmures e tíbias (culturas de órgãos) derivados de animais Selv e  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>. O T3 e CLE sozinhos limitaram o crescimento celular nas células Selv, mas não nas células  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>. O T3+CLE não alterou o efeito negativo do T3 nesse parâmetro celular. O T3 também limitou o crescimento das células MC3T3-E1, entretanto, esse efeito foi abolido quando o PROP foi combinado com o T3 (T3+PROP). O tratamento com T3 por 21 dias induziu a formação de nódulos de mineralização nas culturas primárias de osteoblastos Selv, o que não foi observado nas culturas  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>. O T3 induziu a expressão da osteocalcina (OC) nas culturas primárias de osteoblastos e nas culturas de órgão Selv, mas o fez de maneira mais branda nas culturas  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>. O T3 induziu a expressão de osteoprotegerina (OPG) nos osteoblastos Selv (culturas primárias), mas não nos osteoblastos  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>. Em conjunto, esses achados sugerem que (i) a integridade da via de sinalização dos receptores  $\beta$ 2 adrenérgicos é necessária para que o T3 promova o seu efeito negativo

no crescimento celular e positivo na diferenciação osteoblástica; e que (ii) há uma interação local, em osteoblastos, entre o HT e o SNS, através da sinalização dos receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, para regular esses processos.

Palavras-chave: Hormônio Tireoidiano, Sistema Nervoso Simpático, Osteoblastos.

## ABSTRACT

Neofiti-Papi B. In Vitro Evaluation of the Interaction of Thyroid Hormone with the Sympathetic Nervous System, via  $\beta$ 2-Adrenergic Receptors, in Bone Tissue and in Osteoblasts. [Thesis (Doctorate in Systems Biology, Morphofunctional Biology area)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2022.

There is evidence that the sympathetic nervous system (SNS) negatively regulates bone mass via  $\beta$ 2-adrenergic receptors ( $\beta$ 2-AR) expressed in osteoblasts. Recently, we observed that mice with  $\beta$ 2-AR receptor inactivation ( $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>) are partially resistant to the osteopenic effects of excess thyroid hormone (TH) in the skeleton, suggesting that there is an interaction between TH and SNS to regulate bone mass, involving the signaling of  $\beta$ 2-AR receptors. The aim of this study was to investigate whether TH interacts with the  $\beta$ 2-AR receptor signaling pathway, locally in bone tissue and in osteoblasts, to regulate bone remodeling and osteoblast biology. Therefore, we evaluated the effect of triiodothyronine (T3;  $10^{-8}$  M); clenbuterol (CLE,  $10^{-4}$  M), a  $\beta$ 2-AR agonist; propranolol (PROP;  $10^{-6}$  M), a  $\beta$ 2-AR antagonist; or the combination of T3 with these drugs (T3+CLE or T3+PROP) in osteoblastic cells of the MC3T3-E1 lineage, derived from mouse calvaria. Next, we evaluated the effect of T3 ( $10^{-8}$  M); CLE ( $10^{-4}$  M), or the combination of both (T3+CLE) in primary cultures of wild-type mouse calvaria-derived osteoblasts (Selv) and  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>. We also evaluated the effect of T3, CLE and T3+CLE in cultures of femurs and tibias (organ cultures) derived from Selv and  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup> animals. T3 and CLE alone limited cell growth in Selv cells, but not in  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup> cells. T3+CLE did not alter the negative effect of T3 on this cellular parameter. T3 also limited the growth of MC3T3-E1 cells, however, this effect was abolished when PROP was combined with T3 (T3+PROP). Treatment with T3 for 21 days induced the formation of mineralization nodules in primary osteoblast Selv cultures, which was not observed in  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup> cultures. T3 induced osteocalcin (OC) expression in primary osteoblast cultures and Selv organ cultures, but more mildly in  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup> cultures. T3 induced osteoprotegerin (OPG) expression in Selv osteoblasts (primary cultures), but not in  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup> osteoblasts. Taken together, these findings suggest that (i) the integrity of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor signaling pathway is necessary for T3 to promote its negative effect on cell growth and its positive effect on osteoblastic differentiation; and that (ii) there is a local interaction, in osteoblasts, between TH and the SNS, through the signaling of  $\beta$ 2 adrenergic receptors, to regulate these processes.

Keywords: Thyroid Hormone, Sympathetic Nervous System, Osteoblasts.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Crescimento de Células Cultivadas em Meio Contendo FBS Tratado com Carvão Ativado (CSS).

**Figura 2.** Contagem de Células MC3T3-E1 com 48 horas de tratamento.

**Figura 3.** Expressão gênica por PCR em tempo real de OC nas células de MC3T3-E1 com 48 horas de tratamento.

**Figura 4.** Efeito do T3, Clenbuterol e/ou Propranolol no Crescimento de Células Osteoblásticas MC3T3-E1.

**Figura 5.** Avaliação por dosagem de AMPc nas células MC3T3-E1.

**Figura 6.** Efeito do Tratamento com T3 e Clenbuterol no Crescimento de Células Osteoblásticas.

**Figura 7.** Efeito do Tratamento com T3 e Clenbuterol na Formação de Nódulos de Mineralização em Células Osteoblásticas.

**Figura 8.** Expressão gênica por PCR em tempo real de OC nas células primárias de OB.

**Figura 9.** Expressão gênica por PCR em tempo real de OPG nas células primárias de OB.

**Figura 10.** Expressão gênica por PCR em tempo real de RANKL nas células primárias de OB.

**Figura 11.** Expressão gênica por PCR em tempo real de COL I nas células primárias de OB.

**Figura 12.** Expressão gênica por PCR em tempo real de OC nas culturas de órgão.

**Figura 13.** Expressão gênica por PCR em tempo real de OPG nas culturas de órgão.

**Figura 14.** Expressão gênica por PCR em tempo real de RANKL nas culturas de órgão.

**Figura 15.** Expressão gênica por PCR em tempo real de RANK nas culturas de órgão.

**Figura 16.** Expressão gênica por PCR em tempo real de SOST nas culturas de órgão.

**Figura 17.** Expressão gênica por PCR em tempo real de TRAP nas culturas de órgão.

**Figura 18.** Expressão gênica por PCR em tempo real de CAT K nas culturas de órgão.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Cronograma das Culturas de Órgão (Fêmures e Tíbias)

**Tabela 2** – Sequências de Primers para PCR em tempo real

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AMO** – Alta Massa Óssea

**AMPc** – 3', 5' – adenosina cíclico

**D1** – Iodotironina Desiodase tipo 1

**D2** – Iodotironina Desiodase tipo 2

**D3** – Iodotironina Desiodase tipo 3

**DbH<sup>-/-</sup>** - Deficiente de Dopamina β-hidroxilase

**DPM** – Desvio Padrão da Média

**EPM** – Erro Padrão da Média

**Fig.** - Figura

**FVB** – Animal selvagem para o Knockout β2-AR

**HT** – Hormônio Tireoidiano

**KO** - Knockout

**NE** – Noradrenalina

**OC** – Osteocalcina

**OPG** - Osteoprotegerina

**rT3** – T3 reverso

**Selv** - Selvagem

**SNA** – Sistema Nervoso Autônomo

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SNP** – Sistema Nervoso Parassimpático

**SNS** – Sistema Nervoso Simpático

**T2** - Diiodotironina

**T3** - Triiodotironina

**T4** – Tetraiodotironina ou Tiroxina

**THRA** – Receptor de Hormônio Tireoidiano A

**THRB** – Receptor de Hormônio Tireoidiano B

**TRs** – Receptor de Hormônio Tireoidiano

**TREs** – Elemento Responsivo do Hormônio Tireoidiano

**TRα1** – Receptor de Hormônio Tireoidiano α1

**TRα2** – Receptor de Hormônio Tireoidiano α2

**TRβ1** – Receptor de Hormônio Tireoidiano β1



**TR $\beta$ 2** – Receptor de Hormônio Tireoidiano  $\beta$ 2

**$\alpha$ 2-AR** – Receptor Adrenérgico  $\alpha$ 2

**$\alpha$ 2A** – Receptor Adrenérgico  $\alpha$ 2A

**$\alpha$ 2B** – Receptor Adrenérgico  $\alpha$ 2B

**$\alpha$ 2C** – Receptor Adrenérgico  $\alpha$ 2C

**$\alpha$ 2A/ $\alpha$ 2C<sup>-/-</sup>** - Deleção de genes dos receptores  $\alpha$ 2A e  $\alpha$ 2C Adrenérgicos

**$\beta$ 2-AR** – Receptor Adrenérgico  $\beta$ 2

**$\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>** - Deleção de genes do receptor  $\beta$ 2 Adrenérgico

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1 O Remodelamento Ósseo: uma breve revisão.....	19
1.2 Hormônio Tireoidiano .....	21
1.3 Hormônio Tireoidiano e Tecido Ósseo.....	22
1.4 Sistema Nervoso Simpático.....	23
1.5 Sistema Nervoso Simpático e Tecido Ósseo .....	24
1.6 Evidências de que o Hormônio Tireoidiano interage com o SNS para regular a Estrutura e Fisiologia Óssea .....	26
2. OBJETIVOS .....	28
2.1 Objetivo Geral .....	28
2.2 Objetivo Específico .....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 Animais e Acasalamento .....	28
3.2 Células MC3T3-E1.....	29
3.2.1 Determinação do Crescimento Celular e Expressão Gênica .....	29
3.2.2 Quantificação do Conteúdo de AMPc nas Células MC3T3-E1.....	30
3.2.3 Tratamento do FBS com Carvão Ativado .....	30
3.3 ESTUDO I – Estudo da Biologia dos Osteoblastos em Culturas Primárias de Osteoblastos..	31
3.3.1 Cultura Primária de Células Osteoblásticas derivadas da Calvária de Camundongos ..	31
3.3.2 Crescimento das Células Osteoblásticas .....	31
3.3.3 Diferenciação Osteoblástica.....	31
3.4 ESTUDO II – Avaliação do Remodelamento Ósseo em Cultura de Órgãos .....	33
3.4.1 Cultura de Órgão (Fêmur e Tíbia).....	33
3.5 Extração de RNA total e Análise da Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real-Time PCR) 34	
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	35
5. RESULTADOS .....	35
5.1 Células MC3T3-E1.....	35
5.1.1 Tratamento do FBS com Carvão Ativado .....	35
5.1.2 Crescimento Celular e Expressão da Osteocalcina nas Células MC3T3-E1 .....	36
5.1.3 Avaliação de AMPc nas Células MC3T3-E1.....	38
5.2 ESTUDO I – Estudo da biologia dos osteoblastos em cultura primária de osteoblastos .....	39

5.2.1	Crescimento das Células Osteoblásticas .....	39
5.2.2	Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização .....	40
5.2.3	Expressão Gênica de Marcadores e Reguladores da Diferenciação Osteoblástica .....	41
5.3	ESTUDO II – Cultura de Órgãos (Fêmur e Tíbia) .....	43
5.3.1	Expressão Gênica na Cultura de Órgão .....	44
6.	DISCUSSÃO .....	47
7.	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O Remodelamento Ósseo: uma breve revisão

O tecido ósseo, apesar da sua rigidez e aparência inerte, é bastante dinâmico [1]. Durante toda a vida, ele é renovado através do processo de remodelamento ósseo, que tem o objetivo de manter a integridade da sua matriz extracelular (MEC), sua capacidade de resistir ao estresse mecânico e evitar o acúmulo de microdanos, mantendo a eficiência das funções esqueléticas. O tecido ósseo é o principal componente dos ossos, que desempenham funções importantes, tais como: (i) suporte e local para fixação dos músculos; (ii) proteção para os órgãos vitais, como medula óssea e cérebro; (iii) atuam como órgãos metabólicos, uma vez que o tecido ósseo é local de reserva de cálcio e fosfato e participa do metabolismo mineral; (iv) atuam como órgãos endócrinos, uma vez que as células ósseas produzem fatores que atuam em outros órgãos ou tecidos, como a osteocalcina e FGF23; além de (v) atuarem na hematopoiese, uma vez que os ossos alojam a medula óssea hematopoiética. O tecido ósseo se organiza na forma de (i) osso compacto ou cortical, que provê função protetora e mecânica aos ossos; e (ii) osso esponjoso ou trabecular, que providencia resistência óssea e, principalmente, função metabólica, pela sua grande área de superfície [2].

O remodelamento ósseo é um processo fisiológico, caracterizado pelo acoplamento e balanço entre as atividades de reabsorção e formação óssea, realizados pelas células osteoclásticas e osteoblásticas, respectivamente [3, 4]. O desbalanço excessivo entre a reabsorção e formação ósseas resulta em doenças ósseas como, por exemplo, a osteoporose, que ocorre quando a reabsorção óssea se sobrepõe à formação óssea, levando à perda de massa óssea e ao aumento do risco de fraturas. Um outro exemplo de doença óssea relacionada ao desbalanço entre formação e reabsorção óssea é a osteopetrose, que acontece quando há algum defeito na reabsorção óssea, fazendo com que a formação óssea se sobreponha à reabsorção, levando ao acúmulo excessivo de massa óssea, a uma MEC menos renovada, e a uma redução da resiliência óssea com aumento do risco de fraturas graves [5].

O remodelamento ósseo segue uma sequência de ações coordenadas das células de revestimento, osteócitos, osteoclastos e osteoblastos, em uma estrutura anatômica temporária conhecida como unidade básica multicelular (BMU) [6]. Essa

sequência de ações determinam as seguintes fases do remodelamento ósseo: fases de ativação, reabsorção, reversa, formação e quiescência. Na fase de ativação, fatores locais (mecânicos ou bioquímicos) ou sistêmicos (por exemplo, hormônios) atuam nas células de revestimento ou nos osteócitos fazendo com que essas células liberem fatores que recrutam precursores de osteoclastos para o sítio ósseo a ser remodelado. Na sequência, ocorre a osteoclastogênese e adesão dos osteoclastos à superfície óssea. Em seguida, ocorre a fase de reabsorção óssea (com duração de aproximadamente 2-4 semanas), onde os osteoclastos basicamente liberam HCl e enzimas proteolíticas (por exemplo, a catepsina K) para um compartimento extracelular fechado entre a superfície osteoclástica e óssea. Esses fatores dissolvem os cristais de hidroxapatita e digerem a matriz orgânica, respectivamente. A próxima fase é a reversa, caracterizada pela saída ou apoptose dos osteoclastos, e pelo recrutamento de células precursoras de osteoblastos para o sítio de remodelamento. Essas células se diferenciam em osteoblastos ativos e se posicionam na lacuna de reabsorção, conhecida como lacuna de Howship [4]. Em seguida, ocorre a fase de formação óssea (com duração de 4-6 meses aproximadamente), quando os osteoblastos sintetizam e secretam os componentes orgânicos da matriz óssea, além de coordenarem a mineralização dessa matriz. Nessa fase, alguns osteoblastos são encarcerados pelo seu próprio produto (a MEC), o que faz com que sofram alterações metabólicas e morfológicas, tornando-se osteócitos. Outros osteoblastos diminuem sobremaneira a sua atividade de síntese e secreção proteica, assumem uma forma achatada e recobrem a superfície óssea recém-formada, passando a serem chamados de células de revestimento ou células de superfície. Uma outra parcela de osteoblastos sofre apoptose [5]. Finalmente, o tecido ósseo entra em uma fase de quiescência, caracterizada por um estado de baixíssima atividade de formação ou reabsorção óssea [7, 9].

Um dos principais eixos envolvidos na ativação do remodelamento ósseo é o eixo RANK/RANKL/OPG [1]. O ativador do receptor do fator nuclear kappa-B (RANK) é um receptor de membrana expresso em células precursoras de osteoclastos e em osteoclastos maduros. O ligante do RANK (RANKL), sintetizado pelos osteoblastos e osteócitos (dentre outras células), ao ligar-se ao RANK, induz a osteoclastogênese e atividade osteoclástica, resultando em um aumento da reabsorção óssea [10, 11]. Já a osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel do RANKL, ao ligar-se a este fator,

limita a interação RANK/RANKL e, conseqüentemente, inibe a diferenciação e atividade dos osteoclastos [12].

## **1.2 Hormônio Tireoidiano**

A tireóide secreta dois hormônios principais, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) [13, 14]. O T4 corresponde à maior produção tireoidiana (60-90% aproximadamente), enquanto a produção de T3 representa 10-40%. A produção de outras iodotironinas inativas biologicamente representa cerca de menos de 1%. O T4 basicamente funciona como um pró-hormônio, ou seja, ele é precursor de T3, e apresenta menor afinidade pelos receptores de hormônio tireoidiano (TRs). Além disso, a concentração de T4 no núcleo celular é 10 vezes menor em relação ao T3, fazendo com que a sua ligação aos TRs seja mínima e a sua atividade biológica, irrelevante [15]. Com isso, é preciso que o T4 seja convertido em T3, através de ações de enzimas celulares, as desidases das iodotironinas, para que o hormônio tireoidiano (HT) ganhe importância fisiológica estando na sua forma biologicamente ativa. Essa conversão ocorre na própria tireoide e, principalmente, nos tecidos alvo do HT, como por exemplo no fígado, rins, coração e nos ossos [13]. Existem três tipos de desidases das iodotironinas, identificados em tecidos de mamíferos, as desidases do tipo I, II e III (D1, D2 e D3, respectivamente). A D1 tem ação ativadora e inativadora dos hormônios tireoidianos por converter T4 em T3, T4 em T3 reverso (rT3) e T3 a T2. Já a D2, converte T4 em T3, tendo T4 como seu principal substrato, tornando-se preferencialmente uma ativadora de T4, além de converter rT3 em T2. A D3 é a principal inativadora dos hormônios tireoidianos, por converter T4 e T3 em rT3 e T2, respectivamente. A deficiência de HT regula positivamente a atividade da D2 e negativamente a atividade de D3, o oposto sendo observado em casos de excesso de HT [16].

A forma de manter os níveis normais de HT no organismo, uma condição conhecida como eutireoidismo, é através do sistema de feedback negativo envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. A região do núcleo paraventricular do hipotálamo é responsável por sintetizar o hormônio liberador de tireotropina (TRH). Este, por sua vez, estimula a síntese e secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH), pela porção anterior da glândula hipófise [17, 18]. Através da interação TSH-TSHR, que são receptores de TSH expressos nas células foliculares da tireoide, o TSH estimula a proliferação dessas células e a síntese e liberação de T4 e T3. Os hormônios

tireoidianos inibem a síntese e a secreção de TRH e TSH, enquanto a redução dos níveis dos HT leva ao aumento da síntese e secreção de TRH e TSH, tendo uma relação inversa [19].

Por muito tempo pensou-se que o HT entrava nas células por difusão passiva. Entretanto, foram identificadas proteínas de membrana que atuam como transportadores de hormônios tireoidianos, uma vez que facilitam a entrada dos HTs nas células alvo. Como exemplos, há o monocarboxilato (MCT) 8 e 10, sendo que o primeiro é amplamente expresso nas células ósseas (osteoblastos, osteoclastos, condrócitos) e apresenta maior afinidade pelos HT. [13, 20, 21, 22].

### **1.3 Hormônio Tireoidiano e Tecido Ósseo**

O HT exerce uma ampla variedade de efeitos no desenvolvimento e metabolismo de praticamente todos os tecidos, sendo essencial para o desenvolvimento e metabolismo ósseos. Durante o desenvolvimento, a deficiência do HT 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, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas [23]. Por outro lado, a tirotoxicose resulta em maturação esquelética acelerada com fechamento prematuro da lâmina epifisial, e com subsequente diminuição do crescimento longitudinal ósseo [24]. Quanto ao metabolismo ósseo, o T3 estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea por regular a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (células que formam e reabsorvem osso, respectivamente). Em condições de excesso de HT, a atividade dessas duas populações celulares está aumentada com predomínio da atividade osteoclástica, levando à diminuição da massa óssea [25, 26]. Por outro lado, no hipotireoidismo, o crescimento e remodelamento ósseos são reduzidos, o que pode resultar em um ligeiro aumento ou inalteração da massa óssea [27]. O HT pode afetar o esqueleto indiretamente, alterando a síntese e/ou secreção de outros hormônios. Um exemplo é o hormônio de crescimento e IGF-I (*insulin-like growth factor-1*), cuja expressão gênica e proteica é regulada pelo HT [28]. Por outro lado, sabe-se que o HT também atua diretamente nas células ósseas, modificando a sua proliferação, e a diferenciação e/ou a expressão de vários genes relacionados ao metabolismo ósseo [22].

As ações diretas do HT no esqueleto são resultado da sua interação com os seus receptores nucleares (TRs), que são fatores de transcrição induzíveis pelo T3. Esses receptores ligam-se a regiões específicas dos genes alvo, os elementos responsivos do hormônio tireoideano (TREs), e modificam a sua expressão, aumentando ou diminuindo a taxa de transcrição gênica. As isoformas clássicas de receptores de hormônio tireoideano são codificados por 2 genes, *THR $\alpha$*  e *THR $\beta$*  [13, 29]. O *THR $\beta$*  codifica três principais produtos de ligação ao T3, que são TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 e TR $\beta$ 3. Já o *THR $\alpha$*  codifica TR $\alpha$ 1 que se liga ao T3, e o TR $\alpha$ 2 que não se liga ao T3, e atua, pelo menos *in vitro*, como um antagonista do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 [13, 30]. O TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 são expressos nas principais células esqueléticas (osteoblastos, osteoclastos e condrócitos) [30, 31] porém, suas contribuições funcionais no que diz respeito ao desenvolvimento e metabolismo ósseos é pouco compreendido. Estudos mostram que, no tecido ósseo, a isoforma predominante é o TR $\alpha$ 1 [32-35], contudo, nós demonstramos através de estudos do nosso grupo, que o TR $\beta$ 1 medeia importantes efeitos do T3 nos osteoblastos de ratos e camundongos [36] principalmente, no esqueleto de ratos em desenvolvimento [37].

Outra forma de ação do HT, além da ação genômica via TR, é a não genômica, por vias extranucleares [38]. São mecanismos que desencadeiam ações rápidas, e essa ação inicia com o HT interagindo com proteínas de membrana plasmática, citoplasma, ou mitocôndria [39, 40] e estão associados a vias de segundo mensageiro, como (a) via de sinalização da fosfolipase C, inositol trifosfato, diacilglicerol, proteína quinase C e Ca<sup>2+</sup> intracelular; (b) a adenilil ciclase, a proteína quinase A e a via da proteína de ligação do elemento de resposta ao cAMP; (c) e a via Ras/Raf1 serina-treonina quinase/MAPK. Essas vias não são afetadas pelos inibidores de transcrição e tradução [21].

#### **1.4 Sistema Nervoso Simpático**

O Sistema Nervoso Central (SNC) capta as informações do meio externo e interno do corpo, enviando sinais por meio de vias eferentes autônomas e motoras somáticas. O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) está localizado de forma estrutural e funcional para garantir a conexão entre meio externo e interno, a homeostase corporal e resposta adaptativa a vários estresses [41]. Ele se divide, anatomicamente, em Sistema Nervoso Simpático (SNS) e Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). A grande maioria das fibras pós-ganglionares simpáticas são adrenérgicas, por



apresentarem a noradrenalina (NE) como neurotransmissor [42]. O sistema adrenérgico é um regulador essencial de funções neurais, endócrinas, cardiovasculares, vegetativas e metabólicas. As catecolaminas endógenas, adrenalina e NE, transmitem seus sinais biológicos via receptores acoplados à proteína G para regular uma variedade de funções celulares [43]. Esses receptores são denominados receptores adrenérgicos, e é através deles que o SNS efetua suas ações sobre os órgãos alvo. A maioria desses receptores está localizada na membrana plasmática de neurônios e em células alvo neurais e não neurais. Nas células alvo desse sistema, há receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e/ou  $\beta$ -adrenérgicos. São conhecidos nove subtipos de receptores adrenérgicos, que são ativados pela adrenalina e NE:  $\alpha 1$  ( $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$  e  $\alpha 1D$ ),  $\alpha 2$  ( $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  e  $\alpha 2C$ ) e  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ ) [43, 44]. Todas as isoformas de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ativam a proteína G estimulatória, que por sua vez estimulam a adenilato ciclase (AC) e, portanto, induzem a síntese de 3',5'-adenosina cíclico (AMPc) [43], que é o segundo mensageiro das ações da NE mediadas pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Por outro lado, os receptores  $\alpha 2$  inibem a AC e, portanto, reduzem a formação de AMPc, antagonizando as ações mediadas pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

### **1.5 Sistema Nervoso Simpático e Tecido Ósseo**

Um achado muito importante das últimas décadas foi que o remodelamento ósseo também está sujeito ao controle do Sistema Nervoso Central (SNC). Demonstrou-se ainda que uma das formas através da qual o SNC regula a massa óssea é ativando o SNS, onde ele age como efetor periférico [45, 46]. Evidências demonstram que o SNS regula negativamente e diretamente a formação óssea, através de receptores  $\beta 2$ -adrenérgicos expressos em osteoblastos; enquanto regula positivamente a reabsorção óssea, de forma indireta, aumentando a produção de RANKL pelos osteoblastos [47, 48, 49]. Assim, é esperado que a diminuição e o aumento do tônus simpático resultem, respectivamente, em alto e baixo fenótipo de massa óssea. O princípio dos estudos da ação do SNS sobre o tecido ósseo começou com a investigação do efeito de um pequeno hormônio polipeptídico, a leptina, no esqueleto. A leptina é secretada principalmente por adipócitos e controla especialmente o peso corporal e a função gonadal através das vias hipotalâmicas [50, 51], além de ser um potente regulador de massa óssea, atuando como inibidor da formação óssea [45]. O efeito antiosteogênico da leptina não é local e sim central [45];

ou seja, não ocorre quando a leptina é superexpressa em osteoblastos de camundongos *in vivo* [18], mas sim quando ela é administrada diretamente no III ventrículo por infusão intracerebroventricular (ICV) [45, 47], ou quando há aumento sérico importante da leptina [48]. Centralmente, a leptina ativa o SNS. A infusão de doses mínimas de leptina no III ventrículo leva a marcantes reduções da massa óssea, tanto em camundongos selvagens quanto deficientes de leptina. Com base em lesões químicas, demonstrou-se que o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) medeia o efeito central da leptina [47]. Além disso, demonstrou-se que esse efeito central é mediado pelo SNS e, mais especificamente, por receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\beta_2$ -AR) [47, 48].

O fenótipo de alta massa óssea (AMO) encontrado em modelos de camundongos com baixa atividade simpática, como em animais Ob/Ob (deficientes de leptina), e em animais deficientes de dopamina  $\beta$ -hidroxilase (DbH<sup>-/-</sup>), a enzima limitante responsável pela síntese de catecolaminas, evidencia o papel do SNS no controle do remodelamento ósseo [23]. Esse fenótipo de AMO observado nos animais Ob/Ob resulta de uma alta renovação óssea com um aumento simultâneo nos marcadores de formação e reabsorção óssea [48, 49]. Esses modelos animais, entretanto, apresentam disfunções endócrinas, incluindo hipercortisolismo, hiperinsulinemia e hipogonadismo, que por si só já interferem nos efeitos do SNS no osso. Análises de animais com inativação gênica (*knockout* = KO) dos receptores  $\beta_2$ -AR, os camundongos  $\beta_2$ -AR<sup>-/-</sup>, que não apresentam anormalidades endócrinas ou metabólicas, evidenciam um papel mais preciso do  $\beta_2$ -AR na massa óssea. Esses animais apresentam peso corporal normal e, um fenótipo de AMO a partir dos 6 meses de idade, que ocorre devido a um aumento da formação e diminuição da reabsorção óssea [48]. Além disso, esses animais são resistentes à perda de massa óssea induzida por ovariectomia. Outra evidência do papel dos receptores  $\beta_2$  na mediação das ações do SNS no tecido ósseo é o fato de que a administração de Isoproterenol, um agonista  $\beta$ -adrenérgico, leva a perda de massa óssea, enquanto a administração de Propranolol, um antagonista  $\beta$ -adrenérgico leva ao ganho de massa óssea [46, 52, 53].

Por outro lado, estudos do nosso grupo vêm demonstrando que os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos também medeiam ações do SNS no esqueleto [54, 55]. Vimos que camundongos com duplo KO dos genes do  $\alpha_2A$ -AR e do  $\alpha_2C$ -AR ( $\alpha_2A/2C$ -AR<sup>-/-</sup>) também apresentam um fenótipo de AMO [54]. Além disso, demonstramos que os

receptores adrenérgicos  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  e  $\alpha 2C$  ( $\alpha 2A$ -AR,  $\alpha 2B$ -AR e  $\alpha 2C$ -AR) são expressos nas principais células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), em condrócitos da lâmina epifisial e dos centros de ossificação secundários e, em condrócitos da cartilagem articular [54]. O fato dos animais  $\alpha 2A/2C$ -AR<sup>-/-</sup> apresentarem fenótipo de AMO, mesmo apresentando uma elevação no tônus simpático e expressão de  $\beta 2$ -AR, demonstra que este último não é o único adrenoceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo, e que o  $\alpha 2A$ -AR e/ou  $\alpha 2C$ -AR apresentam um papel importante na mediação das ações do SNS na regulação da massa óssea.

### **1.6 Evidências de que o Hormônio Tireoidiano interage com o SNS para regular a Estrutura e Fisiologia Óssea**

Uma característica importante do HT, mas ainda pouco entendida, é a sua interação com o SNS. É conhecido que as interações entre as ações do HT e catecolaminas são importantes para a regulação da termogênese, lipólise, glicogenólise, gluconeogênese, frequência cardíaca, dentre vários outros processos [56]. É digno de nota que pacientes com hipertireoidismo geralmente apresentam numerosas manifestações clínicas de aumento da atividade simpática, manifestando palpitações, tremores, sudorese, nervosismo, perda de peso, intolerância ao calor, olhar fixo, taquicardia e aumento da pressão de pulso [57]. Sabe-se que uma das formas efetivas de tratar os sinais e sintomas do hipertireoidismo é com a administração de  $\beta$ -bloqueadores, sugerindo importantes papéis da sinalização  $\beta$ -adrenérgica nas interações HT-SNS no controle de muitos processos fisiológicos [58]. Os mecanismos desse sinergismo ainda não são completamente entendidos e vem sendo investigados nos diferentes sistemas. Sabe-se que o HT não aumenta a concentração de catecolaminas no plasma [59, 60]. Entretanto, observa-se que o HT aumenta a produção de AMPc induzida pelas catecolaminas em diferentes células e tecidos, por exemplo, em células miocárdicas e no tecido adiposo branco e marrom [61, 62, 63]. Pelo menos um mecanismo para esse importante efeito é a ação do HT em aumentar o número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no coração [62]. Considerando-se que o excesso de HT causa perda de massa óssea e que a ativação do SNS também apresenta efeito negativo na massa óssea, levantamos a hipótese de que há uma interação do HT 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 hipertiroideos com propranolol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) corrige a hipercalcemia secundária à tirotoxicose [56]. Além disso, pacientes com hipertiroidismo tratados com propranolol apresentam redução da excreção de hidroxiprolina pela urina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea [57], o que sugere que o aumento da reabsorção óssea no hipertiroidismo possa envolver mecanismos dependentes da sinalização  $\beta$ -adrenérgica.

Recentemente, com o intuito de investigar essa hipótese, o nosso grupo estudou o efeito de 10x e 20x a dose fisiológica de triiodotironina ( $3,5\mu\text{g}$  ou  $7,0\mu\text{g}$  de T3/100g de massa corporal/dia, respectivamente), por 90 dias, na microarquitetura óssea e em parâmetros biomecânicos do fêmur de camundongos  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ , e nos seus respectivos selvagens (Selv), camundongos da linhagem FVB. Vimos que camundongos fêmeas  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$  se mostraram menos sensíveis aos efeitos da tirotoxicose no osso trabecular, o que não foi observado nos camundongos machos. No entanto, com relação ao osso cortical femoral, vimos que o excesso de HT aumentou o perímetro endosteal e a área medular nos animais selvagens machos e fêmeas, mas não nos animais  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ , o que sugere que o T3 promove reabsorção óssea endosteal no osso cortical, através de um mecanismo que depende da via de sinalização do  $\beta 2\text{-AR}$  [65]. Em relação a parâmetros biomecânicos, vimos que o excesso do HT levou a reduções significativas na carga máxima, tenacidade, rigidez e resiliência no fêmur dos camundongos fêmeas Selv, o que não foi afetado nas fêmeas KO, evidenciando, mais uma vez, uma resistência desses animais aos efeitos deletérios da tireotoxicose no tecido ósseo. Por outro lado, os camundongos machos Selv e KO se mostraram resistentes aos efeitos deletérios do tratamento com T3 sobre os parâmetros biomecânicos do fêmur, sugerindo a participação de fatores sexuais na interação do HT com o SNS para regular a morfofisiologia óssea. Em conjunto, esses achados sustentam a hipótese de interações entre o HT e o SNS para modular a estrutura e remodelamento ósseos, e sugerem que o HT interage com o SNS através da via dos receptores  $\beta 2$  adrenérgicos, além da via dos receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos, para regular a massa e estrutura ósseas [65]. Contudo, ainda não é claro se o SNS atua diretamente no esqueleto; se a sua interação com o HT ocorre localmente nas células ósseas; e se uma possível interação local do SNS com o HT envolve a via de sinalização dos adrenoceptores  $\beta 2$ .

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar se o HT interage com a via de sinalização do  $\beta$ 2-AR, localmente, no tecido ósseo e em osteoblastos, para regular o remodelamento ósseo e a biologia dos osteoblastos.

### 2.2 Objetivo Específico

- Modelo 1: células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1:
  - Avaliar a resposta dessas células ao tratamento com T3; Clenbuterol (CLE), um agonista  $\beta$ 2 adrenérgico; propranolol (PROP), um antagonista  $\beta$ 2 adrenérgico; ou do T3 com CLE ou PROP (T3+CLE e T3+PROP) quanto ao(à):
    - Crescimento celular.
    - Expressão gênica da osteocalcina.
    - Avaliar AMPc.
- Modelo 2: cultura primária de osteoblastos derivados das calvárias de camundongos Selv e  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>:
  - Avaliar a resposta dessas células ao tratamento com T3, CLE e a combinação de ambas as drogas (T3+CLE), quanto ao(à):
    - Crescimento celular;
    - Expressão de genes marcadores e reguladores da diferenciação osteoblástica;
    - Formação de nódulos de mineralização.
- Modelo 3: cultura de Órgão – Fêmur e Tíbia derivadas de camundongos Selv e  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>:
  - Avaliar a resposta desses ossos ao tratamento com T3, CLE e T3+CLE quanto ao(à):
    - Expressão genes relacionados à formação, reabsorção e remodelamento ósseos.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais e Acasalamento

Foram estudados camundongos com inativação gênica do  $\beta$ 2-AR (camundongos  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>), gerados pelo grupo do Dr. Brian Kobilka, Universidade de Stanford, California, EUA, em background FVB [66]. Esses animais *knockout* (KO) nos foram cedidos pela Dra. Patrícia C. Brum, Professora Associada da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE), USP. Os camundongos  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup> e os seus respectivos selvagens (Selv) foram mantidos no biotério do Departamento de Anatomia, ICB, USP, em condições controladas de luz e temperatura (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas em temperatura de aproximadamente 25°C), com acesso *ad libitum* à ração e água. Para a produção de animais para o estudo, foram estabelecidos e mantidos 5 trios de acasalamento, compostos por 2 fêmeas e um macho para cada linhagem de camundongos Selv e  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>), perfazendo um total de 10 trios de acasalamento. A cada 7-8 meses, os trios de acasalamento foram renovados, sendo que os animais excluídos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. A fase de acasalamento e gestação foi acompanhada a cada dois dias. Para os experimentos, foram utilizados de 6-8 camundongos neonatos, a partir do dia do nascimento (P0) até o 4º dia pós-parto (P4). Os neonatos foram submetidos a eutanásia por decapitação, com lâminas afiadas, seguida da coleta das suas calvárias, fêmures e tíbias, para os estabelecimentos das culturas primárias de osteoblastos (a partir das calvárias) e culturas de órgãos (fêmures e tíbias).

Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas, USP (CEUA N° 2025041217 e 4388031022).

### **3.2 Células MC3T3-E1**

Foram estabelecidas culturas com a linhagem de células osteoblásticas MC3T3-E1, derivada da calvária de camundongos C57BL/6.

#### **3.2.1 Determinação do Crescimento Celular e Expressão Gênica**

As células MC3T3-E1 foram plaqueadas na densidade de 10<sup>3</sup> células por poço, em placas de 24 poços, em quadruplicatas; e cultivadas em meio  $\alpha$ MEM (Gibco BRL, Paisley, UK) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco), estripado com carvão ativado (detalhado no item 3.2.3). Três dias após o plaqueamento, as células foram tratadas com T3 (10<sup>-8</sup> M); CLE (10<sup>-4</sup> M); T3+CLE; PROP (10<sup>-6</sup> M) ou T3+PROP por 0, 1, 2, 4, 7 e 10 dias. Em cada um desses tempos (*time-points*), as células foram

coletadas, centrifugadas e ressuspendidas em meio de cultivo para a realização da contagem do número de células, utilizando-se uma câmara de Neubauer. A partir da plotagem do número de células para cada *time-point*, determinou-se o crescimento celular. Em seguida, as mesmas amostras usadas para contagem do número de células foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram homogeneizadas em Trizol. As amostras foram, então, armazenadas em freezer -80°C até o momento da extração de RNA total e posterior avaliação de expressão gênica por PCR em tempo real.

### **3.2.2 Quantificação do Conteúdo de AMPc nas Células MC3T3-E1**

Para a dosagem de AMPc intracelular, as células MC3T3-E1 foram plaqueadas na concentração de  $0,5 \times 10^4$  células por poço, em placas de 6 poços, em triplicatas. Três dias após o plaqueamento, as células permaneceram sem tratamento (-) ou foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M) por 72 horas, CLE ( $10^{-4}$  M) por 30 min (últimos 30 minutos das 72 horas) e a combinação de ambos os tratamentos. Ao final do período de tratamento, as células foram dissociadas em HCl 0,1 M, coletadas e transferidas para tubos Eppendorf. As suspensões de células foram homogeneizadas por pipetamento (*up and down*) e, em seguida, centrifugadas em alta velocidade (12.000 rpm) por 10 min. O sobrenadante foi usado para a dosagem do AMPc intracelular, utilizando-se o kit cAMP immunoassay (ab65355; Abcam, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.2.3 Tratamento do FBS com Carvão Ativado**

O FBS foi tratado com carvão ativado para retirar lípidos, esteróides e hormônio tireoideo do soro de acordo com o seguinte protocolo: para cada 100ml de FBS foram adicionados 3,09g de carvão ativado (Merck – KGaA, Germany). A mistura FBS e carvão ativado foram mantidos em mixer magnético (com uso do “peixinho”) por 12 h (*overnight*) à 4°C. Em seguida, a mistura foi centrifugada em ultracentrífuga (16.330rpm) por 1 hora a 4°C e o sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado nas mesmas condições. O processo foi repetido três vezes, sendo que ao final da terceira centrifugação, o sobrenadante foi filtrado e, armazenado em freezer -20°C para uso posterior.

As células MC3T3-E1 foram cultivadas em meio de cultura contendo diferentes porcentagens de FBS tratado com carvão ativado (FBS-TCA) para verificarmos a

condição que não alterasse ou pouco alterasse o crescimento e viabilidade das células.

### **3.3 ESTUDO I – Estudo da Biologia dos Osteoblastos em Culturas Primárias de Osteoblastos**

#### ***3.3.1 Cultura Primária de Células Osteoblásticas derivadas da Calvária de Camundongos***

Células da linhagem osteoblástica foram isoladas da calvária de 6-8 camundongos neonatos (P0-P4)  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$  e Selv, por digestão enzimática sequencial, utilizando-se 1% de tripsina e 1% de colagenase, em meio  $\alpha$ MEM (Gibco BRL, Paisley, UK), como previamente descrito [67]. As células foram então cultivadas em placas de petri de 100 mm (P100), em meio de cultivo (MC) contendo  $\alpha$ MEM (Invitrogen), suplementado com 10% de FBS (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco). Após 72 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e as células cultivadas até atingirem a confluência de 100% (aproximadamente 5-6 dias), sendo o meio trocado a cada 3 dias. Após atingirem confluência, as células foram coletadas e semeadas de acordo com os objetivos de cada experimento.

#### ***3.3.2 Crescimento das Células Osteoblásticas***

As células osteoblásticas foram inicialmente semeadas em uma densidade de  $10^4$  células por poço, em placas de 24 poços e cultivadas em meio de cultivo (MC). Depois de 72 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de diferenciação (MD), que se refere ao MC suplementado com 50  $\mu\text{g/ml}$  de ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO) e 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma). No dia seguinte (considerado o dia 0), foi iniciado o tratamento com T3 ( $10^{-8}\text{M}$ ), CLE ( $10^{-4}\text{M}$ ) e T3+CLE. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. As células foram coletadas no dia 0 (sem tratamento) e no 3º, 6º, 9º, 12º, 15º, 18º e 21º dia de tratamento (T0, T3, T6, T9, T12, T15, T18 e T21 respectivamente), para determinar o número de células por poço, por contagem manual, utilizando uma câmara de Neubauer (Improve Neubaur). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### ***3.3.3 Diferenciação Osteoblástica***

##### ***3.3.3.1 Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização***



Para a quantificação de nódulos de mineralização, que é uma medida da diferenciação osteoblástica, foram usadas placas de 12 poços, onde as células osteoblásticas foram semeadas em uma densidade de  $3 \times 10^4$  célula/poço e cultivadas em MC. Depois de 72 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de diferenciação (MD), que se refere ao MC suplementado com 50  $\mu\text{g/ml}$  de ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO) e 10 mM  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma). Após 24 horas (considerado o dia 0), foi iniciado o tratamento com T3 ( $10^{-8}\text{M}$ ), CLE ( $10^{-4}\text{M}$ ) e T3+CLE. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Em T7, T14 e T21, as culturas foram submetidas à coloração com vermelho de alizarina, como descrito a seguir, para que os nódulos de mineralização fossem corados. Os poços foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 4% a temperatura ambiente por 30 minutos, em agitação. Em seguida, os poços foram lavados 3x com água Milli Q e mantidos com uma solução de vermelho de alizarina 2% [2 g de vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich) em 100 mL de água destilada] por 30 minutos, em agitação. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS de 3 a 4x, até retirar o excesso do corante. O PBS foi retirado por completo das placas, e as mesmas foram deixadas em temperatura ambiente, destampadas para secar. Em seguida, 320  $\mu\text{l}$  de ácido acético a 10%, diluídos no PBS) foram adicionados aos poços, que foram então mantidos em agitação e temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 ml (pré-identificados), e colocadas em banho seco com temperatura de  $85^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e passado para um novo eppendorf, ao qual foi adicionada 80  $\mu\text{l}$  de solução de hidróxido de amônio a 10%. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e distribuídas em triplicatas em uma placa de 96 poços, assim como as amostras para construção da curva padrão e a amostra “branco”, que foi utilizado água milliq. O conteúdo de vermelho de alizarina nas amostras foi aferido através da densidade óptica, determinando-se a absorbância de alíquotas do sobrenadante em comprimento de onda de 405 nm, utilizando o leitor de ELISA (Biotek) [68].

### 3.3.3.2 Avaliação da Expressão de Genes Marcadores e Reguladores da Diferenciação Osteoblástica

Todo o procedimento de plaqueamento e tratamento das células foi o mesmo descrito nos itens 3.3.1 e 3.3.2. Entretanto, para a análise da expressão gênica, as

células foram plaqueadas numa densidade de  $10^5$  célula/poço em placas de 6 poços, em triplicatas. As células foram coletadas em T0, T3, T6, T9, T15 e T21 e homogeneizadas em Trizol. Os homogenatos foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA total, para posterior estudo da expressão gênica da osteocalcina, osteoprotegerina, RANKL, Colágeno tipo I, por PCR em tempo real, como descrito no item 3.5.

### **3.4 ESTUDO II – Avaliação do Remodelamento Ósseo em Cultura de Órgãos**

#### **3.4.1 Cultura de Órgão (Fêmur e Tíbia)**

Logo após a eutanásia, os fêmures e tíbias foram dissecados, utilizando-se um esteriomicroscópio (Leica Microsystems S6E, Heerbrugg, Switzerland), em solução Salina A de Puck (PSA, *Puck's Salina A*), composta por KCL, NaCL,  $\text{NaHCO}_3$  e Glicose. Em seguida, os ossos foram cultivados (cultura de órgão), em meio sem soro (MSS), composto por  $\alpha$ MEM, suplementado com 0.05 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 0.2% BSA (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina e 100  $\mu\text{g}$  de estreptomicina (Gibco). Os ossos foram cultivados individualmente em placas de 24 poços, contendo 1ml de MSS/poço. Após 24 horas do plaqueamento (considerado dia 0), o meio de cultura foi trocado e foi iniciado o tratamento com T3 ( $10^{-8}$  M; Sigma-Aldrich), CLE ( $10^{-4}$  M; Sigma-Aldrich) ou com a combinação de ambos (T3+CLE), adicionados ao meio de cultura. Após 24 horas de tratamento, foi feita uma nova troca de meio, contento as mesmas concentrações de T3 e/ou CLE. Ao final de 72 horas de tratamento, as amostras foram coletadas e armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise posterior. O cronograma da cultura de órgão é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Cronograma das Culturas de Órgão (Fêmures e Tíbias).

<b>DIA -1</b>	<b>DIA 0</b>	<b>DIA 1 (24 h)</b>	<b>DIA 2 (36 h)</b>	<b>DIA 3 (72 h)</b>
Plaqueamento	Troca de meio* + Início do tratamento	Nenhuma ação	Troca de meio*	Coleta

Meio de cultura contendo T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-6}$  M) ou a combinação de ambos (T3+CLE). O meio das culturas controles não continha nenhuma das drogas.

### **3.5 Extração de RNA total e Análise da Expressão Gênica por PCR em Tempo Real (Real-Time PCR)**

Os fêmures e tíbias, provenientes das culturas de órgãos, foram pulverizados utilizando-se um mortar e pistilo de aço (Fisher Scientific International, Inc., Hampton, NH), resultando em um “pó de osso” que foi homogeneizado em Trizol (Gibco, BRL). A partir desse ponto, a extração de RNA total das culturas de órgãos (fêmures e tíbias) e culturas de células (cujos homogenatos em Trizol foram preparados e armazenados imediatamente após a coleta das células) seguiu o mesmo procedimento, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do TRizol.

Tabela 2 – Sequências de Primers para PCR em tempo real

OC	F: 5'-CTCACAGATGCCAAGCCCA-3' R: 5'-CCAAGGTAGCGCCGGAGTCT-3'
OPG	F: 5'-AGTCCGTGAAGCAGGAGTG-3' R: 5'-CCATCTGGACATTTTTTGCAA A-3'
RANK L	F: 5'-GGC CAC AGC GCT TCT CAG-3' R: 5'-GAG TGA CTT TAT GGG AAC CCG AT-3'
COL I	F: 5'-GCGAAGGCAACAGTCGCT-3' R: 5'-CTTGGTGGTTTTGTATTTCGATGAC-3'
TRAP	F: 5'-TGCACAGATTGCATACTCTAAGATCT-3' R: 5'-TTTTGAAGCGCAAACGGTAGT-3'
CAT K	F: 5'-AGGCAGCTAAATGCAGAGGGGTACA-3' R: 5'-AGCTTGCATCGATGGACACAGAGA-3'
RANK	F: 5'-TCTGCAGCTCTTCAATGACACT-3' R: 5'-CGATGAGACTGGGCAGGTAAG-3'
SOST	F: 5'-AAGCCGGTCACCGAGTTGGT-3' R: 5'-GTGAGGCGCTTGCACTTGCA-3'
18s	F: 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' R: 5'-GATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3'

F = Forward primer e R = Reverse primer

O RNA total foi tratado com DNase I (Fermentas, Hanover, MD, USA), segundo indicação do fabricante. Em seguida, a concentração e pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria, medindo-se a absorvância em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, e 1 mM EDTA) a 260 e 280 nm. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se oligo(dT) e transcriptase reversa *ReverAid-H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas, Hanover,

MD, USA), conforme o seguinte protocolo: incubação com o oligo(dt) a 25 °C por 10 min, transcrição reversa a 37 °C por 1 hora e inativação por calor (heatinactivation) da transcriptase reversa a 95 °C por 5 min no termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Os *primers* de oligonucleotídeos, específicos para amplificação por PCR em Tempo Real, cujas sequências são apresentadas na Tabela 2, foram sintetizados pela XXIDT integrated (DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Os valores relativos à amplificação do RNAm de cada gene estudado foram avaliados através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador e detector Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Após padronização da quantidade de cDNA e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 25 µl, com 450 nM de *primers* e *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). O gene 18srRNA foi utilizado como controle interno para corrigir a variabilidade nas amplificações. O cDNA foi amplificado em duplicatas nas seguintes condições: 1 ciclo a 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (anelamento). Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados com o controle interno, e a quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes, calculada de acordo com o método  $\Delta\Delta Ct$ , descrito por Livak [69].

#### **4. ANÁLISE DOS RESULTADOS**

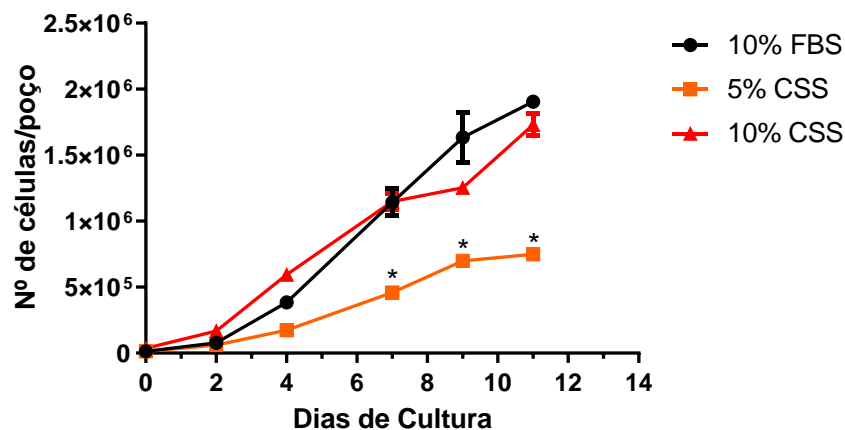
A significância estatística da diferença entre os valores médios dos diferentes tratamentos foi testada por análise de variância (ANOVA) ou pelo teste-t (*Student t-test*). ANOVA foi sempre seguida pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls, para detectar quais tratamentos foram significativamente diferentes entre si. Para todos os testes, foi admitido o limite de 5% para rejeição da hipótese de nulidade. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para a realização dos testes estatísticos e construção de gráficos foi utilizado o *software* Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### **5. RESULTADOS**

##### **5.1 Células MC3T3-E1**

###### **5.1.1 *Tratamento do FBS com Carvão Ativado***

Com o intuito de avaliar se o crescimento das células MC3T3-E1 sofreria frente a diferentes porcentagens de soro tratado com carvão ativado (para extrair o T3 e T4 presentes no soro), as células foram mantidas por 12 dias em meio com 10% de FBS (sem tratamento com carvão ativado), 5% e 10% de CSS (soro tratado com carvão ativado). Como demonstrado na Fig. 1, a porcentagem de 10% CSS foi a que permitiu o crescimento celular mais próximo ao crescimento determinado por meio de cultura contendo 10% FBS. Por outro lado, as células mantidas em meio contendo 5% de CSS cresceram significativamente menos do que as células em meio completo (10% de FBS), mostrando que, nessa condição, as células não têm um suporte adequado para seu desenvolvimento. Com esse teste, optamos por utilizar 10% de CSS nos experimentos seguintes.

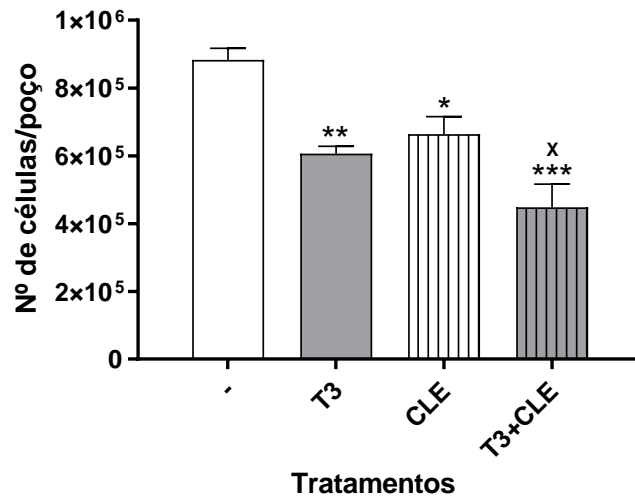


**Fig. 1. Crescimento de Células Cultivadas em Meio Contendo FBS Tratado com Carvão Ativado (CSS).** Células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 foram cultivadas em meio  $\alpha$ MEM suplementado com 10% de FBS ou com 5% ou 10% de CSS. O meio de cultura foi trocado e o número de células por poço foi determinado manualmente, utilizando-se uma câmara de Neubauer, nos dias 2, 4, 7, 9 e 11 de cultura. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,001$  vs. 10% FBS.

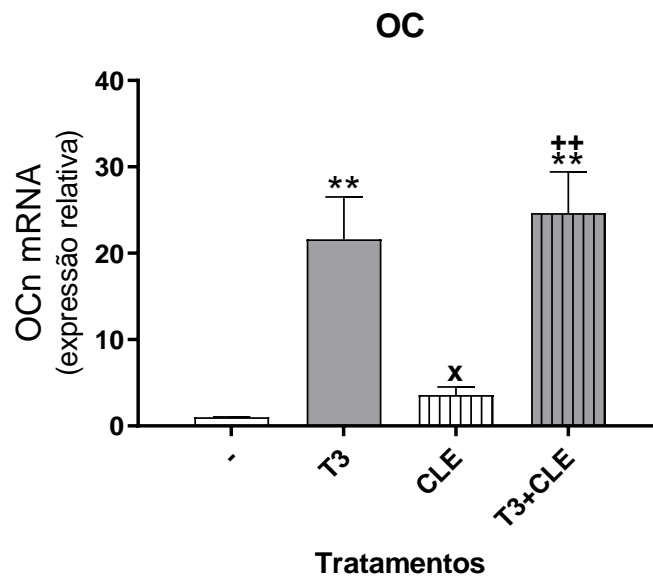
### 5.1.2 Crescimento Celular e Expressão da Osteocalcina nas Células MC3T3-E1

Em um primeiro momento, com o objetivo de avaliar se o HT interage com a via de sinalização do  $\beta$ 2-AR, localmente, em osteoblastos, as células MC3T3-E1 foram tratadas com dose suprafisiológica de T3 ( $10^{-8}$ M); CLE ( $10^{-4}$ M), ou a combinação de ambos, por 48 horas. Como esperado, vimos que o tratamento com T3 causou uma diminuição significativa no número de células em relação às células controle. O CLE também teve um efeito negativo no número de células e a combinação do T3 com o CLE (T3+CLE) reduziu um pouco mais o número de células. Esse estudo mostrou um

efeito aditivo do T3 e CLE na redução do crescimento celular, mas não sinérgico (Fig. 2).



**Fig. 2. Número de Células MC3T3-E1 após 48 horas de tratamento com T3 e/ou clenbuterol (CLE).** As células foram tratadas com dose suprafisiológica de T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M), ou com a combinação de ambos, por 48 horas. O número de células por poço foi determinado manualmente, utilizando-se uma câmara de Neubauer. Todos os valores são expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  vs. sem tratamento (-); e X $p < 0.05$  vs. CLE.

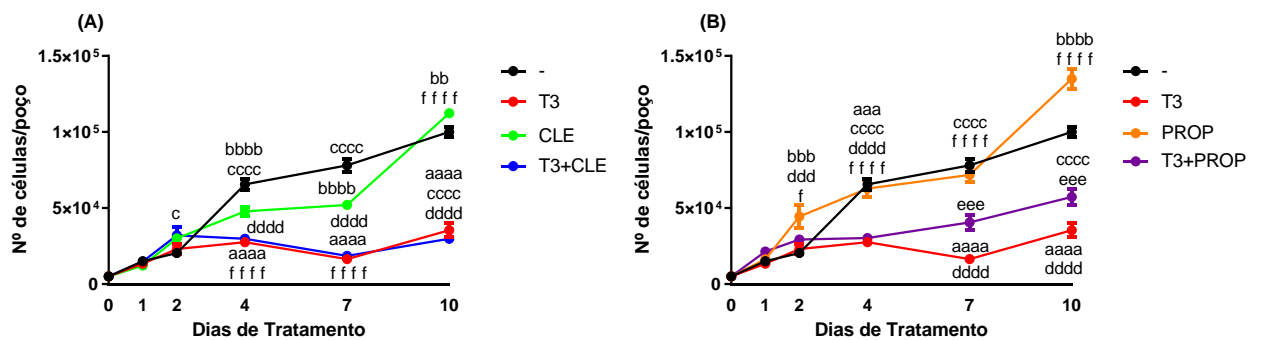


**Fig. 3. Expressão gênica de OC nas células de MC3T3-E1 após 48 horas de tratamento com T3 e/ou clenbuterol (CLE).** As células foram tratadas com dose suprafisiológica de T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M); ou com a combinação de ambos, por 48 horas. A expressão gênica relativa da OC foi determinada por PCR em tempo real. Todos os valores são expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. \*\* $p < 0.01$  vs. sem tratamento (-); \* $p < 0.05$  vs. T3; e \*\* $p < 0.01$  vs. CLE.

Como esperado, a expressão de osteocalcina (OC), um marcador do fenótipo de osteoblastos maduros, mostrou-se significativamente aumentada (22 vezes) após 48 horas de tratamento com T3. Por outro lado, o tratamento com CLE sozinho não alterou a expressão de OC, e não interferiu na ação do T3, sugerindo que a ativação

da via do  $\beta 2$ -AR localmente em osteoblastos não interfere na ação do T3 nessas células (Fig. 3).

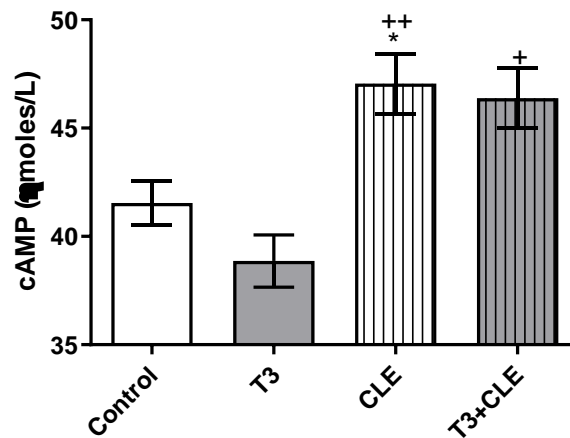
A Fig. 4 mostra que o T3 limitou de forma importante o crescimento das células MC3T3-E1. O CLE também teve um efeito inibitório no crescimento celular, mas menos importante do que o T3. Nota-se ainda que o CLE não alterou o efeito negativo do T3 no crescimento celular. Por outro lado, o bloqueio da via dos receptores  $\beta 2$ -AR com PROP minimizou o efeito deletério de T3 no crescimento das células MC3T3-E1, sugerindo que a integridade da via de sinalização dos receptores  $\beta$  adrenérgicos é necessária para que o T3 promova o seu efeito negativo integral no crescimento celular.



**Fig. 4. Efeito do T3, Clenbuterol (CLE) e/ou Propranolol (PROP) no Crescimento de Células Osteoblásticas MC3T3-E1.** As células foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M); e/ou PROP ( $10^{-6}$  M) por 10 dias. O número de células foi determinado após 1,2,4,7 e 10 dias de tratamento. As células sem tratamento (-) compõem o grupo controle (Cont). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. a=Cont vs. T3; b=Cont vs. CLE ou PROP; c=Cont vs. T3+CLE ou T3+PROP; d=T3 vs. CLE ou PROP; e=T3 vs. T3+CLE ou T3+PROP; f=CLE vs. T3+CLE OU PROP vs. T3+PROP. As significâncias para 1, 2, 3 e 4 letras são  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente.

### 5.1.3 Avaliação de AMPc nas Células MC3T3-E1

Como esperado, o tratamento das células osteoblásticas MC3T3-E1 com CLE promoveu aumento no acúmulo intracelular de cAMP. Por outro lado, o T3 demonstrou uma tendência a reduzir o acúmulo de cAMP, mas não interferiu na ação do CLE, sugerindo, mais uma vez, que a ativação da via  $\beta 2$  adrenérgica não modifica a ação do T3 em células osteoblásticas (Fig. 5).



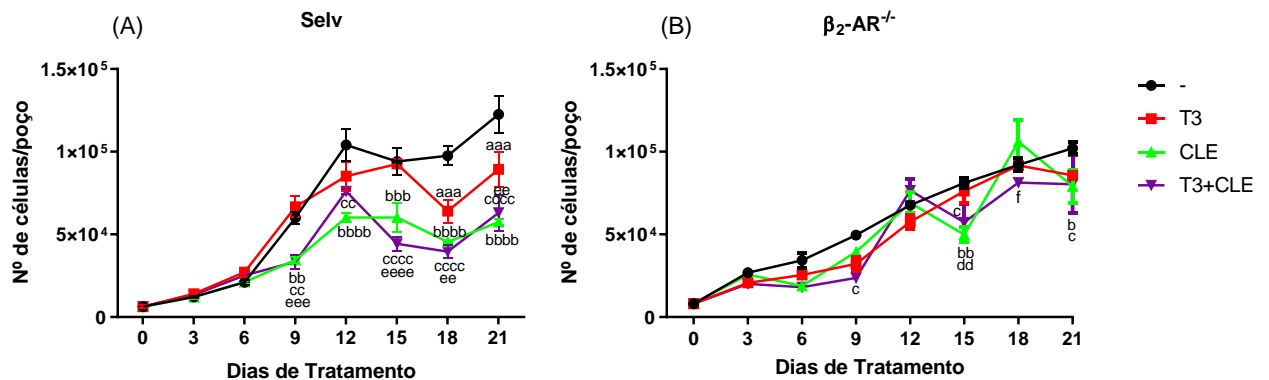
**Fig. 5. Conteúdo de AMPc nas células MC3T3-E1.** As células foram tratadas com dose suprafisiológica de T3 ( $10^{-8}$  M); CLE ( $10^{-4}$  M); ou a combinação de ambos (T3+CLE). O tratamento com T3 durou 72 horas, sendo que o CLE (sozinho ou combinado) foi adicionado nos últimos 30 minutos das culturas, às 71 horas e 30 minutos. A coleta das células foi realizada ao término dos tratamentos e a dosagem do AMPc intracelular foi feita por elisa. Todos os valores são expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$  vs. sem tratamento (-); \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  vs. T3.

## **5.2 ESTUDO I – Estudo da biologia dos osteoblastos em cultura primária de osteoblastos**

### **5.2.1 Crescimento das Células Osteoblásticas**

As culturas primárias de osteoblastos, derivados das calvárias de camundongos Selv e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ , foram expostas aos tratamentos com T3, CLE ou T3+CLE por 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 ou 21 dias. Vimos que o T3 diminuiu o crescimento das células Selv e que o tratamento com CLE não alterou a ação negativa de T3 sobre o crescimento celular. Por outro lado, a ação inibitória do T3 no crescimento celular foi praticamente abolida nas células  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ , indicando que a integridade da via  $\beta 2\text{-AR}$  é importante para que o T3 realize seu efeito negativo no crescimento celular (Fig. 6). O CLE limitou significativamente o crescimento celular a partir do 9º dia de tratamento e, de forma mais intensa que o T3, o que foi significativo estatisticamente no 21º dia de tratamento. Nota-se que o T3 minimizou o efeito negativo do CLE (T3+CLE > CLE) apenas no 12º dia de tratamento. Em todos os outros tempos de tratamento, não há diferença entre os efeitos do CLE sozinho ou em combinação com o T3 (T3+CLE), o que demonstra que o T3 praticamente não altera o efeito negativo do CLE no crescimento celular.



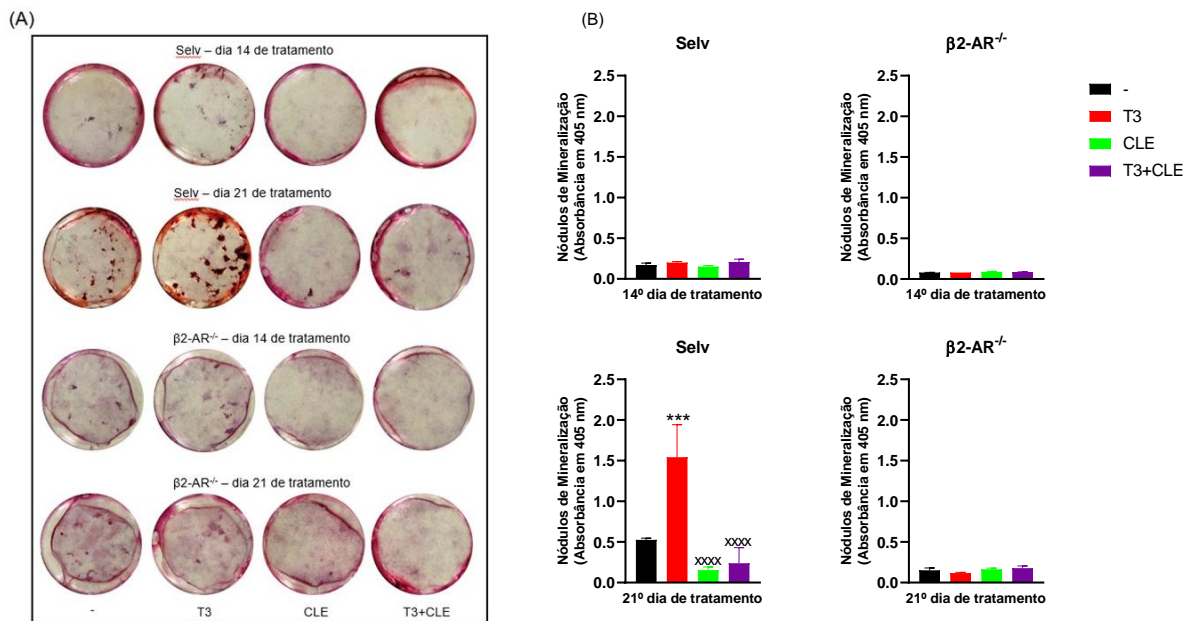


**Fig. 6. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) no Crescimento de Culturas Primárias de Osteoblastos derivadas da Calvária de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta_2\text{-AR}^{-/-}$ .** As células foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M); ou a combinação de ambos (T3+CLE) por 21 dias. As células sem tratamento (-) compõem o grupo controle (Cont). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. a=Cont vs. T3; b=Cont vs. CLE; c=Cont vs. T3+CLE; d=T3 vs. CLE; e=T3 vs. T3+CLE; f=CLE vs. T3+CLE. As significâncias para duas, três ou quatro letras são  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente.

### 5.2.2 Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização

Com o intuito de avaliar a diferenciação osteoblástica, avaliamos a formação de nódulos de mineralização nas culturas primárias de osteoblastos (Fig. 7). Para tanto, utilizamos o método de coloração por vermelho de alizarina com posterior quantificação da impregnação do corante às culturas. No 14<sup>o</sup> dia de cultura, nenhum tratamento promoveu alterações significativas na formação dos nódulos de mineralização, tanto nas culturas Selv quanto KO. Por outro lado, no 21<sup>o</sup> dia, podemos observar que o T3 promoveu aumento significativo (de aproximadamente três vezes), na formação dos nódulos de mineralização em relação às culturas não tratadas (controles). O CLE sozinho apenas tendeu a reduzir a formação dos nódulos de mineralização (vs. controle), mas claramente bloqueou o efeito positivo do T3 sobre a formação dos nódulos de mineralização, quando adicionado às culturas em combinação com o T3 (T3+CLE).

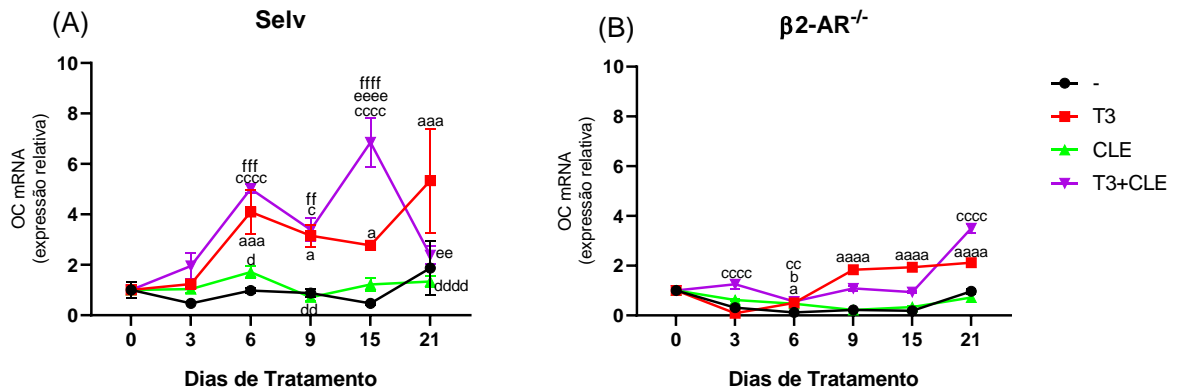
Nas células provenientes dos camundongos  $\beta_2\text{-AR}^{-/-}$ , podemos observar que nenhum tratamento promoveu alteração significativa na formação dos nódulos de mineralização, tanto no 14<sup>o</sup> quanto no 21<sup>o</sup> dia de cultura. Assim sendo, o efeito positivo do T3 observado nas células Selv (21<sup>o</sup> dia) foi totalmente abolido, sugerindo que a via de sinalização do  $\beta_2\text{-AR}$  precisa estar íntegra para que o T3 induza a formação dos nódulos de mineralização.



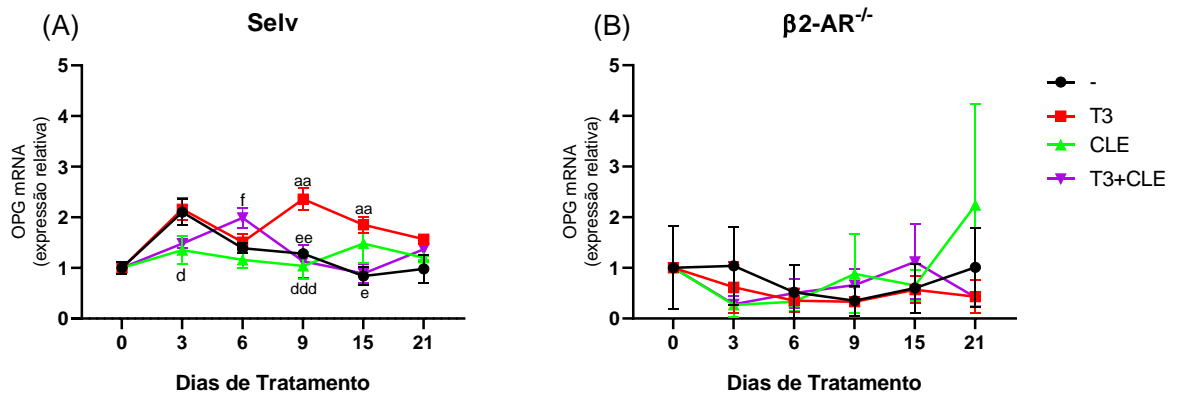
**Fig. 7. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Formação de Nódulos de Mineralização em Culturas Primárias de Osteoblastos derivadas da Calvária de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .** As células foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M), ou a combinação de ambos (T3+CLE) por 7, 14 ou 21 dias. As células sem tratamento (-) compõem o grupo controle (Cont). A quantificação dos nódulos de mineralização foi determinada através da concentração de vermelho de alizarina nas amostras, aferida através da absorvância em comprimento de onda de 405 nm. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0.001$  vs. sem tratamento (-); xxxx $p < 0.0001$  vs. T3; e + $p < 0.05$  vs. CLE. As significâncias para 3 e 4 letras são  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente.

### 5.2.3 Expressão Gênica de Marcadores e Reguladores da Diferenciação Osteoblástica

Como esperado, as células Selv tratadas com T3 apresentaram uma elevação da expressão do gene da OC a partir do 6º dia de tratamento (de 3 a 6 vezes versus células controles), enquanto o CLE sozinho não promoveu alterações significativas. O CLE em combinação com o T3 (T3+CLE) intensificou e bloqueou o efeito positivo do T3 no 15º e 21º dia de tratamento, respectivamente (Fig. 8A). Nas células derivadas de animais  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$  (Fig. 8B), o efeito do T3 sobre a expressão de OC ocorreu apenas a partir do 9º dia de tratamento e foi mais brando do que nas células de Selv, sugerindo a importância da integridade da via de sinalização de  $\beta 2\text{-AR}$  para que o T3 promova seu efeito positivo na expressão de OC. O CLE sozinho não promoveu alterações significativas na expressão da OC (versus controle) nas células KO. Em combinação com o T3 (T3+CLE), o CLE minimizou o efeito positivo do T3 na expressão da OC (dias 9 e 15), mas intensificou este efeito no 21º dia de tratamento nas células KO.



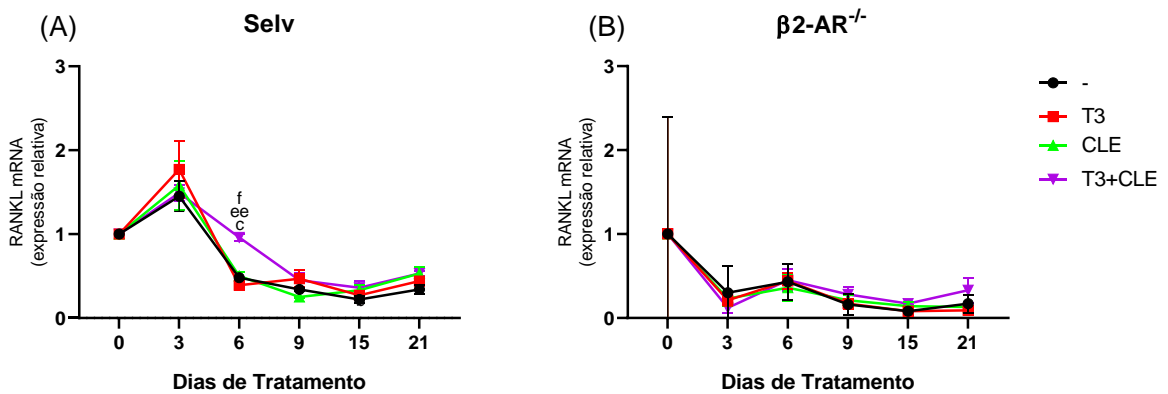
**Fig. 8. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da Osteocalcina (OC) em Culturas Primárias de Osteoblastos derivadas da Calvária de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .** As células foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M); ou a combinação de ambos (T3+CLE) por 21 dias. As células sem tratamento (-) compõem o grupo controle (Cont). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. a=Cont vs. T3; b=Cont vs. CLE; c=Cont vs. T3+CLE; d=T3 vs. CLE; e=T3 vs. T3+CLE; f=CLE vs. T3+CLE. As significâncias para 1, 2, 3 ou 4 letras são  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  e  $p < 0.0001$ , respectivamente.



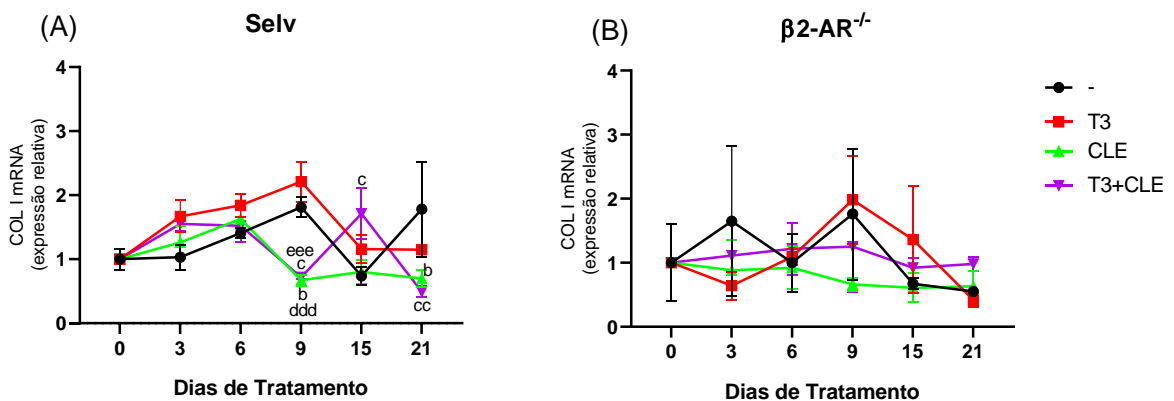
**Fig. 9. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da Osteoprotegerina (OPG) em Culturas Primárias de Osteoblastos derivadas da Calvária de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .** As células foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M); ou a combinação de ambos (T3+CLE) por 21 dias. As células sem tratamento (-) compõem o grupo controle (Cont). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. a=Cont vs. T3; b=Cont vs. CLE; c=Cont vs. T3+CLE; d=T3 vs. CLE; e=T3 vs. T3+CLE; f=CLE vs. T3+CLE. As significâncias para 1, 2, 3 são  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectivamente.

Nas células Selv, o T3 induziu a expressão gênica de OPG nos dias 9 e 15 de tratamento (1,8 e 2,2 vezes, respectivamente). O CLE sozinho não alterou a expressão da OPG, mas bloqueou o efeito do positivo do T3 sobre a OPG no 9º dia de tratamento (T3+CLE). Nas células derivadas de camundongos  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ , nenhum tratamento promoveu alterações significativas na expressão da OPG, sugerindo que a integridade da via do  $\beta 2\text{-AR}$  é importante para o efeito do T3 na expressão da OPG em osteoblastos.

O tratamento com T3 ou CLE sozinhos não alterou a expressão gênica do RANKL, tanto nas células Selv quanto  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$  (Fig. 10). O tratamento com T3 também não causou alteração significativa na expressão de Col I, quando comparado ao controle nas células Selv e KO (Fig. 11). Já o tratamento com CLE reduziu expressão de Col I nas células Selv no 9º dia e 21º dias de tratamento, o que não foi observado nas células  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .



**Fig. 10. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica do RANKL em Culturas Primárias de Osteoblastos derivadas da Calvária de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .** As células foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M); ou a combinação de ambos (T3+CLE) por 21 dias. As células sem tratamento (-) compõem o grupo controle (Cont). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM a=Cont vs. T3; b=Cont vs. CLE; c=Cont vs. T3+CLE; d=T3 vs. CLE; e=T3 vs. T3+CLE; f=CLE vs. T3+CLE. As significâncias para 1, 2, 3 são  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectivamente.



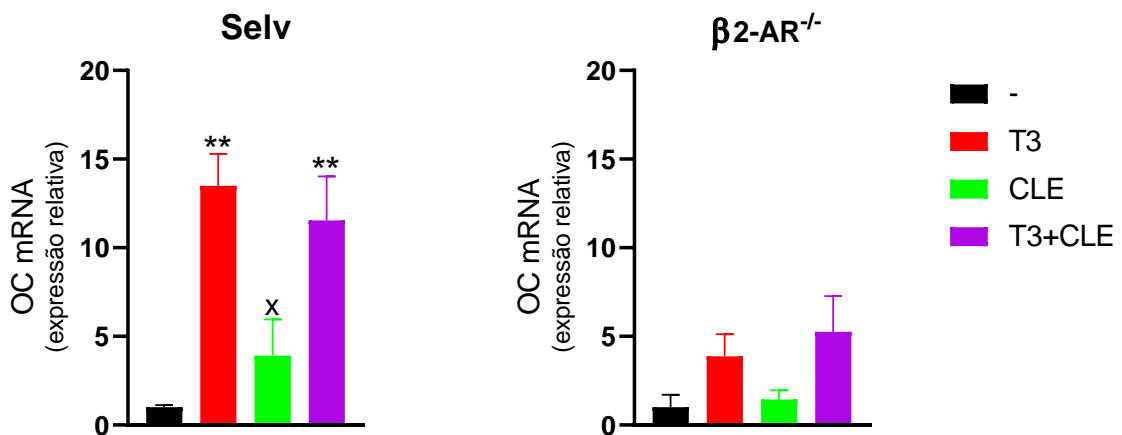
**Fig. 11. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da Col I em Culturas Primárias de Osteoblastos derivadas da Calvária de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .** As células foram tratadas com T3 ( $10^{-8}$  M), CLE ( $10^{-4}$  M); ou a combinação de ambos (T3+CLE) por 21 dias. As células sem tratamento (-) compõem o grupo controle (Cont). Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM a=Cont vs. T3; b=Cont vs. CLE; c=Cont vs. T3+CLE; d=T3 vs. CLE; e=T3 vs. T3+CLE; f=CLE vs. T3+CLE. As significâncias para 1, 2, 3 são  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , respectivamente.

### 5.3 ESTUDO II – Cultura de Órgãos (Fêmur e Tíbia)

### 5.3.1 Expressão Gênica na Cultura de Órgão

Assim como nas culturas primárias, o tratamento com T3 promoveu aumento significativo na expressão da OC (14,4 vezes versus controle) nos fêmures e tíbias de animais Selv mantidos em cultura de órgão (Fig. 12). O CLE não modificou o efeito do T3 (T3+CLE) sobre a expressão da OC, mas induziu a expressão da OC nas culturas Selv (4 vezes versus controle) quando administrado sozinho. Por outro lado, o T3 e/ou CLE não promoveram efeitos significativos na expressão da OC nas culturas de órgão derivadas de animais KO (Fig.12), sugerindo, mais uma vez, a importância da integridade da via de  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$  para que o T3 promova seu efeito positivo na expressão de OC e conseqüentemente na atividade de osteoblastos.

Ao avaliarmos a expressão de OPG (Fig. 13), RANKL (Fig. 14), RANK (Fig. 15), SOST (Fig. 16), TRAP (Fig. 17) e CAT K (Fig. 18), observamos que apesar de haver uma clara tendência a aumento da expressão de alguns desses genes frente ao tratamento com T3, as alterações não foram significativas, tanto nas culturas Selv quanto  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .



**Fig. 12.** Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da OC em Culturas de Órgãos (Fêmures e Tíbias) derivadas de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ . Os ossos foram tratados com T3 ( $10^{-8}$  M) e/ou CLE ( $10^{-4}$  M) por 72 horas. O grupo controle (Cont) refere-se aos ossos sem tratamento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0.01$  vs. sem tratamento (-); \* $p < 0.05$  vs. T3; e  $p < 0.05$  vs. CLE.

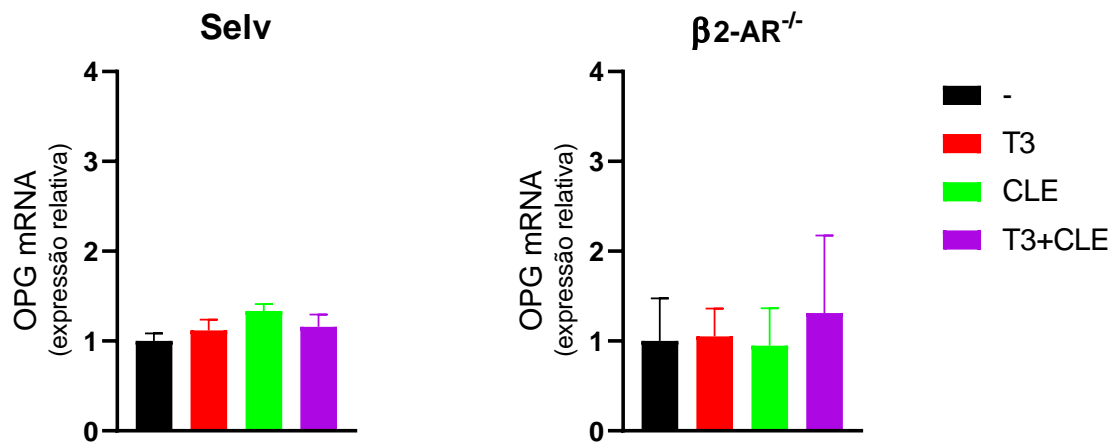


Fig. 13. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da OPG em Culturas de Orgãos (Fêmures e Tibias) derivadas de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ . Os ossos foram tratados com T3 ( $10^{-8}$  M) e/ou CLE ( $10^{-4}$  M) por 72 horas. O grupo controle (Cont) refere-se aos ossos sem tratamento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM.

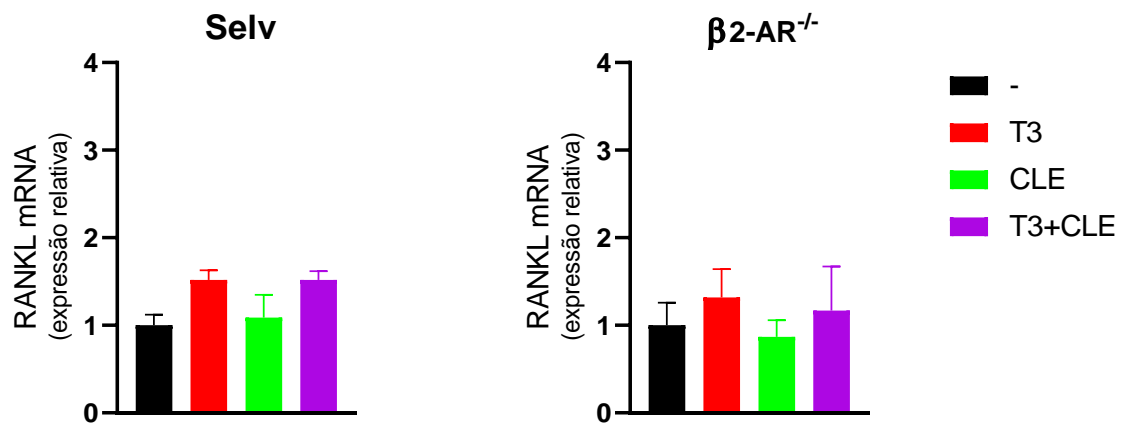
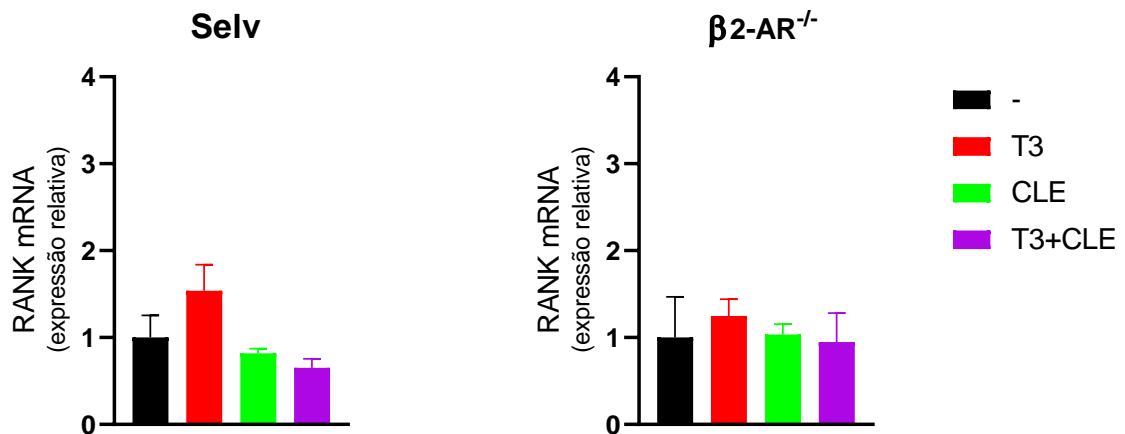
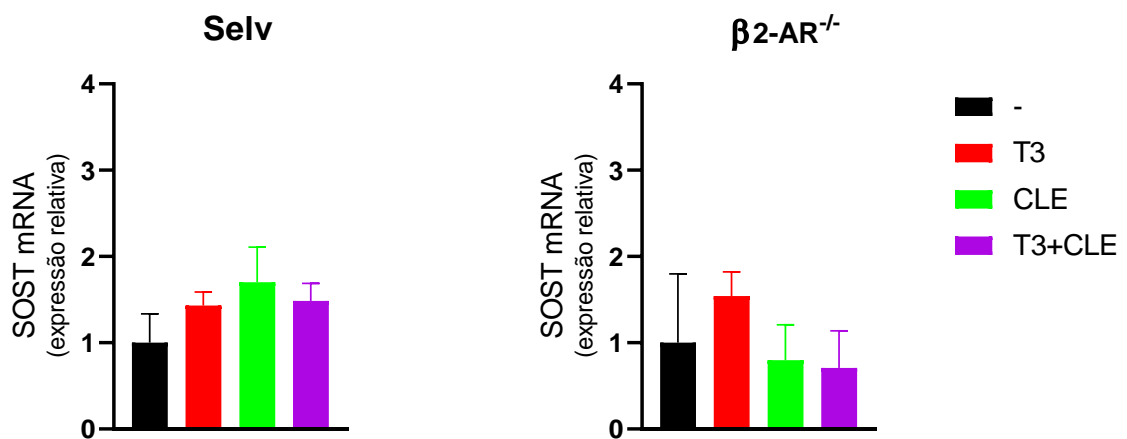


Fig. 14. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da RANKL em Culturas de Orgãos (Fêmures e Tibias) derivadas de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ . Os ossos foram tratados com T3 ( $10^{-8}$  M) e/ou CLE ( $10^{-4}$  M) por 72 horas. O grupo controle (Cont) refere-se aos ossos sem tratamento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM.



**Fig. 15. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da RANK em Culturas de Orgãos (Fêmures e Tibias) derivadas de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .** Os ossos foram tratados com T3 ( $10^{-8}$  M) e/ou CLE ( $10^{-4}$  M) por 72 horas. O grupo controle (Cont) refere-se aos ossos sem tratamento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM.



**Fig. 16. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da SOST em Culturas de Orgãos (Fêmures e Tibias) derivadas de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ .** Os ossos foram tratados com T3 ( $10^{-8}$  M) e/ou CLE ( $10^{-4}$  M) por 72 horas. O grupo controle (Cont) refere-se aos ossos sem tratamento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM.

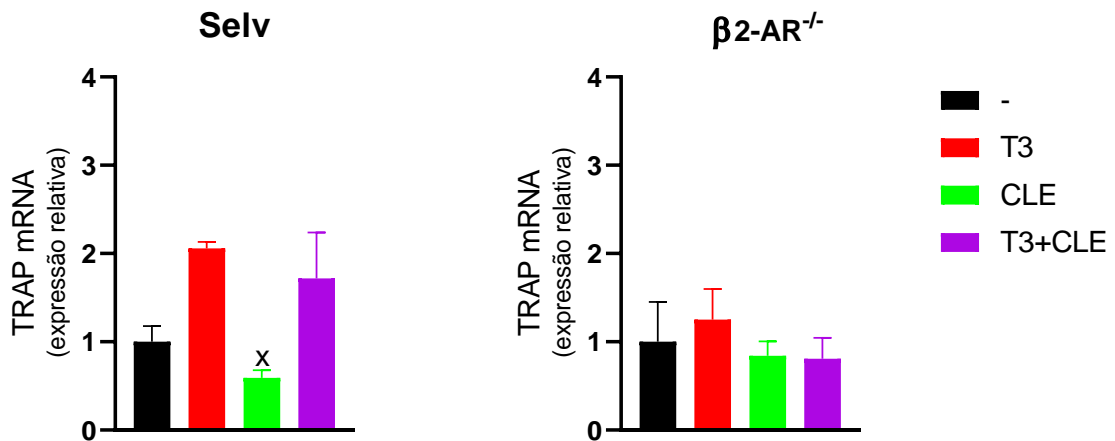


Fig. 17. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da TRAP em Culturas de Orgãos (Fêmures e Tibias) derivadas de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ . Os ossos foram tratados com T3 ( $10^{-8}$  M) e/ou CLE ( $10^{-4}$  M) por 72 horas. O grupo controle (Cont) refere-se aos ossos sem tratamento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  vs. sem tratamento (-); \* $p < 0.05$  vs. T3; e \* $p < 0.05$  vs. CLE.

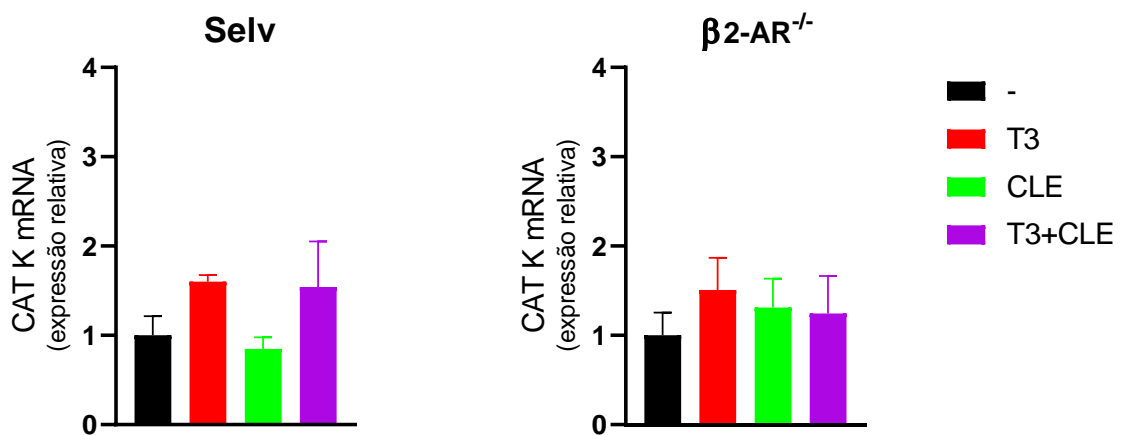


Fig. 18. Efeito do Tratamento com T3 e Clembuterol (CLE) na Expressão Gênica da CAT K em Culturas de Orgãos (Fêmures e Tibias) derivadas de Camundongos Selvagens (Selv) e  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ . Os ossos foram tratados com T3 ( $10^{-8}$  M) e/ou CLE ( $10^{-4}$  M) por 72 horas. O grupo controle (Cont) refere-se aos ossos sem tratamento. Os valores são expressos como média  $\pm$  EPM.

## 6. DISCUSSÃO

Nas duas últimas décadas, uma série de estudos vem mostrando que o SNC regula a massa óssea e remodelamento ósseo através da ativação do SNS, que atua diretamente em osteoblastos via receptor  $\beta 2$ -adrenérgico [45, 47, 48]. Viu-se, ainda, que o SNS inibe a formação óssea e estimula a reabsorção, levando à perda de massa óssea. Por outro lado, sabe-se que o HT também modula o metabolismo ósseo, uma vez que regula a atividade tanto de osteoblastos quanto de osteoclastos. No excesso



de HT, a atividade dessas duas células aumenta, com predomínio da atividade osteoclástica, fazendo com que a reabsorção óssea se sobreponha à formação, o que resulta em perda de massa óssea. Considerando que a ativação do SNS e o excesso do HT têm ações osteopênicas, nós levantamos a hipótese de que há interação entre esses fatores para regular a massa óssea.

Recentemente, em um estudo *in vivo*, observamos que camundongos  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$  são parcialmente resistentes aos efeitos osteopênicos do excesso de HT no esqueleto, sugerindo que há interação entre o HT e SNS para regular a massa óssea, envolvendo a sinalização dos receptores  $\beta 2\text{-AR}$  [65].

No presente estudo, o nosso objetivo foi investigar se há interação entre o HT e SNS, via receptores  $\beta 2\text{-AR}$ , localmente no tecido ósseo, para regular o remodelamento ósseo e a biologia dos osteoblastos. Para tanto, em um primeiro momento, usamos como modelo experimental as células MC3T3-E1, que são uma linhagem de células pré-osteoblásticas provenientes de calvária de camundongos [70]. Em cultura, essas células se diferenciam em osteoblastos maduros e representam um modelo bastante utilizado para o estudo da biologia celular dos osteoblastos [70]. Avaliamos o efeito do T3 sozinho ou em combinação com CLE ou PROP no crescimento das células MC3T3-E1 ao longo de 10 dias. Essas células se mostraram bastante sensíveis ao T3. Vimos que o T3 limitou de forma importante o crescimento celular; que o CLE sozinho também limitou o crescimento celular, mas de forma menos intensa do que o T3; e que a combinação de ambos (T3+CLE) teve um efeito negativo apenas aditivo e não sinérgico no crescimento celular, sugerindo que a ativação da via  $\beta 2$  adrenérgica não interfere na ação do T3 no crescimento celular. Por outro lado, o PROP sozinho teve um efeito positivo brando no crescimento celular das células MC3T3-E1, mas limitou significativamente o efeito negativo do T3 no crescimento celular (T3<T3+PROP). Esse achado indica que a integridade da via de sinalização dos receptores  $\beta$  adrenérgicos é necessária para que o T3 promova o seu efeito negativo integral no crescimento celular, o que corrobora estudos *in vivo* utilizando camundongos com KO do  $\beta 2\text{-AR}$ . Vimos que esses animais são menos sensíveis do que os animais Selv aos efeitos osteopênicos do T3 no osso trabecular e cortical [65]. Em conjunto, os achados *in vivo* e *in vitro* fortalecem a hipótese de uma interação local da via de sinalização do HT com a via de sinalização  $\beta 2$ -adrenérgica em osteoblastos.

Com o objetivo de investigarmos os mecanismos dessa interação local entre HT e sinalização  $\beta$  adrenérgica, dosamos o conteúdo de AMPc, o segundo mensageiro das ações de noradrenalina mediados pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos [42, 44], nas células MC3T3-E1, após tratamento com T3, CLE ou T3+CLE. Vimos que houve uma tendência a redução do conteúdo de AMPc nas células após tratamento com T3, o que não atingiu o limiar de significância. Como esperado, o CLE causou um aumento significativo no conteúdo de AMPc nas células osteoblásticas. Esses achados sugerem, mais uma vez, que a ativação da via  $\beta$ 2 adrenérgica não modifica a ação do T3 em células osteoblásticas, sugerindo que a interação entre T3 e sinalização  $\beta$ 2 adrenérgica não ocorre ao nível da síntese de AMPc.

Em um segundo momento, avaliamos a resposta de células osteoblásticas derivadas das calvárias de animais Selv e  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup> (culturas primárias) ao tratamento com T3 e/ou CLE. Como esperado, vimos que o tratamento com T3 inibiu o crescimento celular nas culturas Selv, o que corrobora estudos anteriores [36]. O CLE sozinho também inibiu significativamente o crescimento celular, e de forma mais intensa do que o T3, mas praticamente não alterou o efeito negativo do T3 nesse parâmetro celular. Por outro lado, nas células derivadas de camundongos  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>, vimos que o T3, CLE e T3+CLE perderam a capacidade de limitar crescimento celular, o que indica que a integridade da via do  $\beta$ 2-AR em osteoblastos é necessária para que o efeito negativo do T3 no crescimento celular ocorra. Esses achados corroboram os estudos com as células MC3T3-E1. Vimos, ainda, que as células Selv, que são derivadas de camundongos FVB, foram menos sensíveis aos efeitos do T3 do que as células MC3T3-E1 (derivadas de camundongos C57BL/6) quanto ao crescimento celular, corroborando com achados in vivo que mostraram que camundongos Selv da linhagem FVB, tratados com doses suprafisiológicas de HT, foram menos sensíveis aos efeitos do T3 em relação aos animais Selv da linhagem C57BL/6 [55, 65]. Esses estudos in vivo e in vitro demonstram que o background genético interfere de maneira importante nas ações do hormônio tireoidiano no tecido ósseo.

Em seguida, analisamos a capacidade de formação de nódulos de mineralização como parâmetro de diferenciação osteoblástica. Os osteoblastos precisam se diferenciar para sintetizar a matriz extracelular e induzir a mineralização dessa matriz. Em cultura, esses processos resultam na formação de nódulos de

mineralização que podem ser identificados e quantificados através da coloração com vermelho de alizarina [68, 71, 72]. Nossos achados mostraram que o T3 aumentou a formação dos nódulos de mineralização nas culturas de osteoblastos provenientes da calvária de camundongos Selv, o que corrobora estudos anteriores que mostraram que o HT promove a diferenciação dos osteoblastos [71, 73, 74]. Por outro lado, esse efeito positivo do T3 sobre a formação dos nódulos de mineralização não foi observado nas culturas provenientes dos camundongos  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ , indicando que a integridade da via de sinalização  $\beta 2\text{-AR}$  localmente nos osteoblastos é necessária para a ação positiva do T3 na diferenciação dessas células. Esse achado é sustentado pelos resultados referentes à expressão da osteocalcina. A OC é a proteína não colágena mais abundante da matriz óssea, sendo que a sua expressão aumenta de forma importante em osteoblastos maduros e durante a mineralização da matriz extracelular [75, 76]. Neste estudo, vimos que o tratamento das culturas primárias de osteoblastos Selv, com dose suprafisiológica de T3, levou ao aumento significativo da expressão da OC (3 a 6 vezes), estando de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o T3 estimula a expressão de OC em células osteoblásticas de roedores [74, 77, 78]. Esse efeito do T3 foi mais tardio e mais brando nas células KO, mostrando que essas células foram mais resistentes ao efeito positivo do T3 na diferenciação osteoblástica do que as células Selv. Esse achado reafirma a importância da integridade da via de sinalização do  $\beta 2\text{-AR}$  nos osteoblastos (local) para o efeito positivo do T3 na diferenciação dos osteoblastos. Nas células MC3T3-E1, o tratamento com T3 por 48 hs aumentou significativamente a expressão gênica da OC, já o CLE sozinho não teve efeito e não alterou o efeito positivo do T3 sobre a expressão da OC. Esses resultados corroboram os resultados obtidos nas culturas primárias e sugerem que a ativação da via  $\beta 2$  adrenérgica não interfere na ação do T3 no crescimento celular e na expressão gênica da OC. Outro gene avaliado nas culturas primárias foi a OPG. Nas células Selv, o T3 induziu a expressão gênica da OPG; enquanto o CLE sozinho não alterou a sua expressão, mas bloqueou o efeito do positivo do T3 sobre a OPG. Nas células  $\beta 2\text{-AR}^{-/-}$ , a expressão da OPG não foi induzida pelo T3 e/ou pelo CLE, sugerindo que a integridade da via do  $\beta 2\text{-AR}$  também é importante para o efeito do T3 na expressão da OPG em osteoblastos.

Finalmente, avaliamos uma possível interação local do HT com o SNS no tecido ósseo, utilizando culturas de órgãos (fêmures e tíbias). Em um primeiro momento,

avaliamos o gene SOST, que é expresso principalmente em osteócitos e codifica a esclerostina. Esta proteína tem como função inibir a diferenciação e atividade osteoblástica, além de aumentar a apoptose dos osteoblastos, o que regula negativamente a formação óssea [82, 83]. Somando-se a isso, a esclerostina estimula a reabsorção óssea, ao estimular a expressão de RANKL nos osteócitos e células de superfície, tendo, portanto, um efeito osteopênico. Vimos, neste estudo, que o CLE reduziu a expressão do SOST nos ossos Selv, mas não nos ossos KO. Por outro lado, a expressão do SOST praticamente não foi alterada pelo tratamento com T3, tanto nos ossos derivados dos animais Selv quanto KO, sugerindo que esse gene não participa da interação entre HT e a via de sinalização do  $\beta$ 2-AR. Ao avaliarmos a expressão da TRAP (fosfatase ácido tartarato resistente), uma enzima liberada pelos osteoclastos relacionada com a reabsorção óssea [87, 88], vimos que, nas culturas de órgãos derivadas de animais Selv, o tratamento com T3 teve uma tendência a aumentar a expressão deste gene. O CLE promoveu uma redução significativa da expressão do TRAP nos ossos Selv em relação aos ossos Selv tratados com T3, o que não foi observado nos ossos KO, demonstrando pouco efeito do T3 e SNS na expressão de TRAP. Com relação à reabsorção óssea, também avaliamos a expressão da Catepsina K (CATK), uma protease secretada pelos osteoclastos, que cliva a principal proteína da matriz óssea, o colágeno tipo I [88, 89]. Pudemos observar que os tratamentos não causaram alterações significativas na expressão de CATK, sugerindo que uma possível interação local entre o HT e SNS não tem como alvo primário a reabsorção óssea.

Ao avaliarmos a expressão dos genes que compõem o eixo RANK/RANKL/OPG nas culturas de órgãos, observamos uma clara tendência a aumento da expressão de alguns desses genes frente ao tratamento com T3, entretanto esses efeitos não foram significativos, tanto nas culturas Selv quanto  $\beta$ 2-AR<sup>-/-</sup>.

Corroborando o que foi visto nas culturas primárias, o tratamento com T3 promoveu aumento significativo na expressão da OC (14,4 vezes versus controle) nos ossos (fêmures e tíbias) derivados de camundongos Selv e mantidos em cultura de órgão. Esses achados estão de acordo com dados na literatura que demonstram que o T3 modula a expressão da OC [74, 77, 78]. Por outro lado, esse efeito positivo e significativo do T3 sobre a expressão da OC não foi observado nas culturas de órgão derivadas de animais KO, o que evidencia, mais uma vez, a relevância da integridade

da via do  $\beta 2$ -AR<sup>-/-</sup> para que o T3 promova seu efeito positivo na expressão de OC e consequentemente na diferenciação e atividade de osteoblastos.

## 7. CONCLUSÕES

Os achados deste estudo demonstram que:

- Há uma interação local entre o HT e o SNS, via receptores  $\beta 2$ -AR, em osteoblastos.
- A integridade da via de sinalização dos receptores  $\beta$  adrenérgicos é necessária para que o T3 promova seu efeito negativo integral no crescimento celular e positivo na expressão da OC.
- A interação local entre o T3 e a sinalização  $\beta 2$  adrenérgica não ocorre ao nível da síntese de AMPc.
- A interação local entre o HT e SNS não tem como alvo primário a reabsorção óssea, mas sim a formação óssea.

## REFERÊNCIAS

1. Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, and Paulo Sérgio Cerri., *Review Article: Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. BioMed Research International, 2015. Article ID 421746.
2. Feng X, McDonald JM. *Disorders of bone remodeling*. Annu Rev Pathol. 2011; 6:121-45. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203.
3. Bianco AC., *Fisiologia do metabolismo osteomineral*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1999. 265p.
4. Eriksen EF., *Cellular mechanisms of bone remodeling*. Rev Endocr Metab Disord. 2010 Dec;11(4):219-27.
5. Katsimbri P. *The biology of normal bone remodelling*. Eur J Cancer Care (Engl). 2017 Nov;26(6). doi: 10.1111/ecc.12740. Epub 2017 Aug 8. PMID: 28786518.
6. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. Biomed Res Int. 2015; 2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746. Epub 2015 Jul 13.

7. Liza J. Raggatt and Nicola C. Partridge., *Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling*. The Journal of Biological Chemistry. 2010; pp. 25103-25108.
8. Takeda, S., F. Elefteriou, R. Levasseur, X. Liu, L. Zhao, K. L. Parker, D. Armstrong, P. Ducy and G. Karsenty., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system*. Cell. 2002. 111(3): 305-317.
9. Jawed A. Siddiqui and Nicola C. Partridge., *Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement*. Physiology. 2016.
10. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, et al., *Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL*. Nature. 2006 Mar 30;440(7084):692-6.
11. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM., *RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease*. Trends Mol Med. 2006 Jan;12(1):17-25.
12. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME., *Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand*. J Biol Chem. 2005 Dec 16;280(50):41155-64.
13. Brent, G.A., *Mechanisms of thyroid hormone action*. J Clin Invest. 2012. 122(9):3035-43.
14. Guyton, *Tratado de Fisiologia Médica*. Vol. 12 edição. 2011.
15. Abdalla, S.M. and A.C. Bianco, *Defending plasma T3 is a biological priority*. Clin Endocrinol (Oxf), 2014. 81(5): p. 633-41.
16. Bianco, A.C., et al., *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases*. Endocr Rev, 2002. 23(1): p. 38-89.
17. Waung JA, Bassett JH, Williams GR., *Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance*. Trends Endocrinol Metab. 2012 Apr;23(4):155-62.
18. Nicholls JJ, Brassill MJ, Williams GR, Bassett JH., *The skeletal consequences of thyrotoxicosis*. J Endocrinol. 2012 Jun;213(3):209-21.

19. Apostolos I. Gogakos, J. H. Duncan Bassett, Graham R. Williams., *Thyroid and Bone. Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010. Elsevier, vol 503 – pages 129-136.
20. Giammanco M, Di Liegro CM, Schiera G, Di Liegro I. *Genomic and Non-Genomic Mechanisms of Action of Thyroid Hormones and Their Catabolite 3,5-Diiodo-L-Thyronine in Mammals*. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 10;21(11):4140. doi: 10.3390/ijms21114140.
21. Cecilia Gouveia, Luciane Capelo, Bianca Neofiti-Papi, Alberta Zallone, *Thyroid and Bone*. *Encyclopedia of Bone Biology*, 2020. Elsevier.
22. Bassett, J.H. and G.R. Williams, *Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance*. *Endocr Rev*, 2016. 37(2): p. 135-87.
23. Wells, D., et al., *Review of slipped capital femoral epiphysis associated with endocrine disease*. *J Pediatr Orthop*, 1993. 13(5): p. 610-4.
24. Ross, D.S., *Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone*. *Thyroid*, 1994. 4(3): p. 319-26.
25. Mosekilde, L. and F. Melsen, *A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism*. *Acta Med Scand*, 1978. 204(1-2): p. 97-102.
26. Mosekilde, L., et al., *Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1977. 85(3): p. 515-25.
27. Mosekilde, L. and F. Melsen, *Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism*. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, 1978. 86(1): p. 56-62.
28. Hervas, F., G. Morreale de Escobar, and F. Escobar Del Rey, *Rapid effects of single small doses of L-thyroxine and triiodo-L-thyronine on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunoassay*. *Endocrinology*, 1975. 97(1): p. 91-101.
29. Arturo Mendoza, Anthony N Hollenberg., *New insights into thyroid hormone action*. *Pharmacol Ther*. 2017. 173:135-145.
30. Tânia M. Ortiga-Carvalho, Aniket R. Sidhaye, and Fredric E. Wondisford., *Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders*. *Nat Rev Endocrinol*. 2014.10(10): 582–591.

31. Mohanad Ahmed, Khalid Hassan, Hind Ahmed., *Case of Resistance to Thyroid Hormones with a Relatively Rare Mutation in Thyroid Hormones Receptor*. Cureus. 2021.13(5): e14911.
32. Gauthier, K., et al., *Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus*. Mol Cell Biol, 2001. 21(14): p. 4748-60.
33. O'Shea, P.J., et al., *A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone*. Mol Endocrinol, 2003. 17(7): p. 1410-24.
34. Stevens, D.A., et al., *Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation*. J Bone Miner Res, 2000. 15(12): p. 2431-42.
35. O'Shea, P.J., et al., *Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormone receptor alpha1 or beta*. Mol Endocrinol, 2005. 19(12): p. 3045-59.
36. Beber, E.H., et al., *The thyroid hormone receptor (TR) beta-selective agonist GC-1 inhibits proliferation but induces differentiation and TR beta mRNA expression in mouse and rat osteoblast-like cells*. Calcif Tissue Int, 2009. 84(4): p. 324-33.
37. Freitas, F.R., et al., *The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats*. J Bone Miner Res, 2005. 20(2): p. 294-304.
38. Elias Taylor, Andreas Heyland., *Evolution of thyroid hormone signaling in animals: Non-genomic and genomic modes of action*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2017.
39. Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. *Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions*. Mol Cell Endocrinol. 2003; 213 :1–11.
40. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ., *Molecular aspects of thyroid hormone actions*. Endocri Rev. 2010; 31 :139–170.
41. Elefteriou F. *Impact of the Autonomic Nervous System on the Skeleton*. Physiol Rev. 2018 Jul 1;98(3):1083-1112. doi: 10.1152/physrev.00014.2017.
42. Ruffolo, R.R., Jr., A.J. Nichols, and J.P. Hieble, *Metabolic regulation by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors*. Life Sci, 1991. 49(3): p. 171-83.
43. Philipp, M. and L. Hein, *Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes*. Pharmacol Ther, 2004. 101(1): p. 65-74.



44. Brum, P.C., et al., *Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 283(5): p. H1838-45.
45. Ducey, P., et al., *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass*. *Cell*, 2000. 100(2): p. 197-207.
46. Togari, A., *Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells*. *Microsc Res Tech*. 2002. 58(2): 77-84.
47. Takeda, S., F. Elefteriou, R. Levasseur, X. Liu, L. Zhao, K. L. Parker, D. Armstrong, P. Ducey and G. Karsenty., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system*. *Cell*. 2002. 111(3): 305-317.
48. Elefteriou, F., J. D. Ahn, S. Takeda, M. Starbuck, X. Yang, X. Liu, H. Kondo, W. G. Richards, T. W. Bannon, M. Noda, K. Clement, C. Vaisse and G. Karsenty (2005). *"Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART."* *Nature* 434(7032): 514-520.
49. Dimitri, P., Rosen, C. *The Central Nervous System and Bone Metabolism: An Evolving Story*. *Calcif Tissue Int* 100, 476–485 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0179-6>.
50. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture*. *Cell*, 1996. 87(3): p. 377-89.
51. Friedman, J.M. and J.L. Halaas, *Leptin and the regulation of body weight in mammals*. *Nature*, 1998. 395(6704): p. 763-70.
52. Bonnet, N., et al., *Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats*. *Bone*, 2005. 37(5): p. 622-33.
53. Martineau, L., et al., *Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men*. *Clin Sci (Lond)*, 1992. 83(5): p. 615-21.
54. Fonseca, T.L., et al., *Double disruption of alpha2A- and alpha2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype*. *J Bone Miner Res*, 2011. 26(3): p. 591-603.
55. Fonseca, T.L., et al., *Thyroid hormone interacts with the sympathetic nervous system to modulate bone mass and structure in young adult mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014. 307(4): p. E408-18.
56. Rude, R.K., et al., *Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol*. *N Engl J Med*, 1976. 294(8): p. 431-3.

57. Beylot, M., et al., [*Effects of propranolol and indomethacin upon urinary hydroxyproline in hyperthyroid patients (author's transl)*]. *Nouv Presse Med*, 1982. 11(13): p. 989-91.
58. John P. Bilezikian, John N. Loeb. *The Influence of Hyperthyroidism and Hypothyroidism on  $\alpha$  and  $\beta$ -Adrenergic Receptor Systems and Adrenergic Responsiveness*. *Endocrine Reviews*, Volume 4, Issue 4, 1 October 1983, Pages 378–388, <https://doi.org/10.1210/edrv-4-4-378>
59. Coulombe, P., et al., *Catecholamines metabolism in thyroid diseases. I. Epinephrine secretion rate in hyperthyroidism and hypothyroidism*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1976. 42(1): p. 125-31.
60. Coulombe, P., J.H. Dussault, and P. Walker, *Plasma catecholamine concentrations in hyperthyroidism and hypothyroidism*. *Metabolism*, 1976. 25(9): p. 973-9.
61. Carvalho-Bianco, S.D., et al., *Chronic cardiac-specific thyrotoxicosis increases myocardial beta-adrenergic responsiveness*. *Mol Endocrinol*, 2004. 18(7): p. 1840-9.
62. Silva, J.E. and S.D. Bianco, *Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications*. *Thyroid*, 2008. 18(2): p. 157-65.
63. Tse, J., et al., *Effects of triiodothyronine pretreatment on beta-adrenergic responses in stunned cardiac myocytes*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2003. 17(4): p. 486-90.
64. Cruz Grecco Teixeira, M.B., et al., *Lack of alpha2C-Adrenoceptor Results in Contrasting Phenotypes of Long Bones and Vertebra and Prevents the Thyrotoxicosis-Induced Osteopenia*. *PLoS One*, 2016. 11(1): p. e0146795.
65. Neofiti-Papi, B., R. P. Albuquerque, M. Miranda-Rodrigues, N. J. N. Goncalves, V. Jorgetti, P. C. Brum, J. C. B. Ferreira, and C. H. Gouveia., *Thyrotoxicosis involves beta2-adrenoceptor signaling to negatively affect microarchitecture and biomechanical properties of the femur*. *Thyroid*. 2019.
66. Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):16694-700. doi: 10.1074/jbc.274.24.16694.
67. Zhong, Z.A., Ethen, N.J., Williams, B.O. (2016). *Use of Primary Calvarial Osteoblasts to Evaluate the Function of Wnt Signaling in Osteogenesis*. In: Barrett, Q., Lum, L. (eds) *Wnt Signaling*. *Methods in Molecular Biology*, vol 1481. Humana Press, New York, NY.

68. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. *Anal Biochem*, 2004. 329(1): p. 77-84.
69. Livak K., *Relative Quantitation of Gene Expression*. Applied Biosystems. User Bulletin #2. p. 1-36. 1997.
70. Sudo, H., H. A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto and S. Kasai., *In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria*. *J Cell Biol*. 1983. 96(1): 191-198.
71. Park, S.H., et al., *Potential of l-thyroxine to differentiate osteoblast-like cells via Angiopoietin1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016. 478(3): p. 1409-15.
72. Aronow, M.A., et al., *Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells*. *J Cell Physiol*, 1990. 143(2): p. 213-21.
73. Kassem, M., L. Mosekilde, and E.F. Eriksen, *Effects of triiodothyronine on DNA synthesis and differentiation markers of normal human osteoblast-like cells in vitro*. *Biochem Mol Biol Int*, 1993. 30(4): p. 779-88.
74. Cray, J.J., Jr., et al., *Effects of thyroxine exposure on osteogenesis in mouse calvarial pre-osteoblasts*. *PLoS One*, 2013. 8(7): p. e69067.
75. Warren, J.T., et al., *Correlating RANK ligand/RANK binding kinetics with osteoclast formation and function*. *J Cell Biochem*, 2015. 116(11): p. 2476-83.
76. Owen, T.A., et al., *Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix*. *J Cell Physiol*, 1990. 143(3): p. 420-30.
77. Varga, F., S. Spitzer, and K. Klaushofer, *Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype*. *Calcif Tissue Int*, 2004. 74(4): p. 382-7.

78. Asai, S., et al., *Thyroid hormone non-genomically suppresses Src thereby stimulating osteocalcin expression in primary mouse calvarial osteoblasts*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 387(1): p. 92-6.
79. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. *Arch Biochem Biophys*, 2008. 473(2): p. 139-46.
80. Boyce BF, X.L., *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. *Arthritis Res Ther*, 2007.
81. Pérez-Sayáns M, S.-M.J., Barros-Angueira F, Rey JM, García-García A, *RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010. 109(5): p. 679-86.
82. de Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Löwik CW, van Bezooijen RL., *A esclerostina derivada de osteócitos inibe a formação óssea: seu papel na proteína morfogenética óssea e na sinalização Wnt*. *J Bone Joint Surg Am*. Fev 2008; 90 1: 31-5.
83. van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Löwik CW., *SOST/esclerostina, um regulador negativo da formação óssea derivado de osteócitos*. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Jun; 16 (3): 319-27.
84. Tsourdi E., Rijntjes E., et al., *Hyperthyroidism and Hypothyroidism in Male Mice and Their Effects on Bone Mass, Bone Turnover, and the Wnt Inhibitors Sclerostin and Dickkopf-1*. *Endocrinology*. 2015.
85. O'Shea PJ, Kim DW, Logan JG, et al., *Advanced Bone Formation in Mice with a Dominant-negative Mutation in the Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  Gene due to Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Protein Signaling*. *J. Biol. Chem*. 2012; 287(21):17812-17822.
86. İlker Sarıtekin, Şerefden Açıkgöz, Taner Bayraktaroğlu, et al. *Sclerostin and bone metabolism markers in hyperthyroidism before treatment and interrelations between them*. *Acta Biochimica Polonica*. 2017; 597-602.
87. Alison R. Hayman., *Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy*. *Autoimmunity*. 2008 Apr; 41 (3):2018-23.
88. Megumi NAKAMURA, Naoki AOYAMA, Satoshi YAMAGUCHI, and Yasuyuki SASANO., *Expression of tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K during*

*osteoclast differentiation in developing mouse mandibles*. Biomedical Research (Tokyo). 2021. 42 (1) 13–21.

89. Wuyang Zhang, Zhiwei Dong, Dengke Li, Bei Li, Yuan Liu, Xueni Zheng, Hui Liu, Hongzhi Zhou, Kaijin Hu, Yang Xue., *Cathepsin K deficiency promotes alveolar bone regeneration by promoting jaw bone marrow mesenchymal stem cells proliferation and differentiation via glycolysis pathway*. Cell Proliferation. 2021;54:e13058.