

Lais Silva Ferreira

Avaliação *in vitro* da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático, via receptores alfa 2 adrenérgicos, no tecido ósseo e em osteoblastos

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

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

SÃO PAULO

2021

Lais Silva Ferreira
Lais Silva Ferreira

Avaliação *in vitro* da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático, via receptores alfa 2 adrenérgicos, no tecido ósseo e em osteoblastos

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

Programa de Fisiopatologia Experimental

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

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de outubro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

SÃO PAULO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Lais Silva

Avaliação in vitro da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático, via receptores alfa 2 adrenérgicos, no tecido ósseo e em osteoblastos / Lais Silva Ferreira. -- São Paulo, 2021.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

Descritores: 1.Hormônio tireoiódeos 2.Sistema nervoso simpático 3.Receptores adrenérgicos alfa 2 4.Tecido ósseo 5.Osteoblastos 6.Metabolismo ósseo

USP/FM/DBD-358/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiaram e com muito amor e paciência enfrentaram essa experiência comigo!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	14
1.1. TECIDO ÓSSEO	14
1.2. HORMÔNIO TIREOIDEANO	16
1.3. HORMÔNIO TIREOIDEANO E SUAS AÇÕES NO TECIDO ÓSSEO	17
1.4. SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO	18
1.5. SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO E SUAS AÇÕES NO TECIDO ÓSSEO: PAPEL DOS ADRENOCEPTORES A2	24
1.6. INTERAÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDEANO COM O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO	26
1.7. EVIDÊNCIAS DA INTERAÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDEANO COM O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO PARA REGULAR A ESTRUTURA E FISIOLOGIA ÓSSEAS, VIA RECEPTORES ALFA 2 ADRENÉRGICOS	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 - OBJETIVOS GERAIS	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. ANIMAIS E ACASALAMENTO	32
3.2. ESTUDO I – AÇÕES DO HT E A2C-AR EM CULTURA DE ÓRGÃOS – OSSOS LONGOS	32
3.2.1. <i>Cultura de Órgãos – Ossos Longos (Fêmur e Tíbia)</i>	33
3.2.2. <i>Expressão gênica por PCR em tempo real (Real-Time PCR)</i>	34
3.3. ESTUDO II – AÇÕES DO HT E A2C-AR EM EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE OSTEOBLASTOS.....	36
3.3.1. <i>Cultura primária de células osteoblásticas derivadas da calvária de camundongos</i>	36
3.3.1.1. Tratamento do FBS com Carvão Ativado (FBS-CA)	37
3.3.1.2. Análise do Crescimento Celular	37
3.3.1.3. Diferenciação Osteoblástica	38
3.3.1.3.1. Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização	38
3.3.1.3.2. Avaliação da Expressão de Genes Relacionados à Diferenciação Osteoblástica e ao Remodelamento Ósseo.	39
4. ANÁLISE DOS RESULTADOS	40
5. RESULTADOS	41
5.1. ESTUDO I – AÇÕES DO HT E A2C-AR EM CULTURA DE ÓRGÃOS (OSSOS LONGOS)	41

5.2. ESTUDO II – AÇÕES DO HT E A2C-AR EM CULTURAS PRIMÁRIAS DE OSTEÓBLASTOS.	42
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEC – Matriz Extracelular

Col I – Colágeno Tipo I

T4 – Tiroxina

T3 – Triiodotironina

T2 – Diiodotironina

rT3 – Triiodotironina Reversa

HT – Hormônio Tireoideano

D1 -Desiodases do tipo I

D2 -Desiodases do tipo II

D3 -Desiodases do tipo III

TRs – Receptores Nucleares

TREs - Elementos Responsivos do Hormônio Tireoideano

TR α 1 – Receptor de Hormônio Tireoideano α 1

TR α 2 – Receptor de Hormônio Tireoideano α 2

TR β 1 – Receptor de Hormônio Tireoideano β 1

TR β 2 – Receptor de Hormônio Tireoideano β 2

LE - Lâmina Epifisial

CP - Condrócitos Proliferativos

CH - Condrócitos Hipertróficos

IGF-I - *Insulin-like growth factor-1*

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Parassimpático

SNS - Sistema Nervoso Simpático

NA – Noradrenalina

AC – Adenilatociclase

AMPc - 3',5'-adenosina cíclico

α 2-AR – Receptor Adrenérgico α 2

α 1-AR – Receptor Adrenérgico α 1

AMO – Alta Massa Óssea

β 2-AR - Receptor Adrenérgico β 2

DbH^{-/-} - Animais Deficientes de Dopamina β -hidroxilase
KO – *Knockout*
 β 2-AR^{-/-} - Deleção de genes do Receptor β 2 Adrenérgico
 α 2A-AR – Receptor Adrenérgico α 2A
 α 2B-AR – Receptor Adrenérgico α 2B
 α 2C-AR – Receptor Adrenérgico α 2C
 α 2A/ α 2C-AR^{-/-} - Deleção de genes dos Receptores α 2A e α 2C Adrenérgicos
C57BL/6J – Linhagem de camundongos considerados selvagens
OPG – Osteoprotegerina
 α 2C-AR^{-/-} - Deleção de genes do Receptor α 2C Adrenérgico
 α 2A-AR^{-/-} - Deleção de genes do Receptor α 2A Adrenérgicos
Selv – Animais selvagens da linhagem C57BL/6J
EEFE - Escola de Educação Física e Esporte da USP
E0 – Dia do coito, dia zero da vida embrionária
PN0 - Primeiro dia de vida pós-natal
PN4 – Quarto dia de vida pós-natal
CO₂ - Dióxido de Carbono
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
PSA - Solução de *Puck Saline A*
KCl – Cloreto de Potássio
NaCl – Cloreto de Sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio
MSS – Meio de cultura sem Soro
BSA – *Bovine Serum Albumin*
DNAc – DNA Complementar
FBS – Soro Fetal Bovino
FBS-CA – Soro Fetal Bovino com Carvão Ativado
CSS – *Charcoal Stripped Serum*
MD – Meio de Diferenciação
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
IR - Receptores de Imidazolina (IR)
RANK - Receptor Ativador do Fator Nuclear *kappa B*
RANKL-L - Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear *kappa B*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação, Mineralização e Quiescência Óssea.....	15
Figura 2 - Subdivisões do Sistema Nervoso.....	19
Figura 3 – Vias do Sistema Simpático e Parassimpático.....	21
Figura 4 – Hiperatividade Simpática.....	23
Figura 5 - Representação esquemática do plaqueamento da cultura de órgãos.....	33
Figura 6 - Demonstração ilustrativa do modo de dissecção da calvária de camundongos neonatos (PN0-PN4)	36
Figura 7 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteocalcina (Ocn) em Cultura de Órgão.....	41
Figura 8 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteoprotegerina (OPG) em Cultura de Órgão.....	42
Figura 9 - Crescimento de Células Osteoblásticas Cultivadas em Meio Contendo FBS Tratado com Carvão Ativado (FBS-CA)	43
Figura 10 - Crescimento de Células Osteoblásticas Cultivadas em Meio Contendo FBS em Diferentes Concentrações.....	44
Figura 11 - Efeito da Deleção do $\alpha 2C$ -AR no Crescimento de Células Osteoblásticas	45
Figura 12 - Efeito do Tratamento com T3 e UK no Crescimento de Células Osteoblásticas em Cultura Primária.....	46
Figura 13 – Imagem Representativa do Efeito Apresentado pelo Tratamento com T3 e UK na Formação de Nódulos de Mineralização em Culturas Primárias de Osteoblastos derivados da Calvária de Camundongos.....	47
Figura 14 - Quantificação do Efeito do Tratamento com T3 e UK na Formação de Nódulos de Mineralização em Culturas Primárias de Osteoblastos derivados da Calvária de Camundongos.....	48
Figura 15 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteocalcina (Ocn) em Cultura Primária de Osteoblasto.....	49
Figura 16 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteoprotegerina (OPG) em Cultura Primária de Osteoblasto.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Representação esquemática dos dias para troca de meios e tratamentos das culturas de órgãos..... 34

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados na realização do PCR em tempo real..... 35

RESUMO

Ferreira LS. *Avaliação in vitro da interação do hormônio tireoideano com o sistema nervoso simpático, via receptores alfa 2 adrenérgicos, no tecido ósseo e em osteoblastos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Estudos prévios do nosso grupo revelaram que há uma interação entre o hormônio tireoideano (HT) e o sistema nervoso simpático (SNS) para regular a massa óssea de camundongos, envolvendo a via dos adrenoceptores $\alpha 2$. O objetivo deste estudo foi avaliar se o adrenoceptor $\alpha 2C$ ($\alpha 2C$ -AR) medeia ações diretas do SNS no tecido ósseo e, mais especificamente, em osteoblastos; além de avaliar se o HT interage com a via de sinalização do $\alpha 2C$ -AR localmente no osso e nos osteoblastos para regular o crescimento, diferenciação e atividade dessas células. Para tanto, realizamos estudos in vitro utilizando culturas de órgãos de tíbia e fêmur e culturas primárias de osteoblastos derivados de camundongos selvagens (Selv) e com knockout do $\alpha 2C$ -AR ($\alpha 2C$ -AR^{-/-}). As culturas foram tratadas com UK (10^{-5} M), um agonista $\alpha 2$ adrenérgico; com T3, em dose supra fisiológica (10^{-8} M); ou com a combinação de ambos (T3+UK). Nos fêmures e tíbias (culturas de órgãos) provenientes de camundongos Selv e KO, o T3 promoveu aumentos significativos na expressão gênica da osteocalcina (Ocn), a proteína não colágena mais abundante da matriz óssea e um importante marcador da diferenciação osteoblástica. Entretanto, esse efeito não foi observado nas culturas tratadas com T3+UK, indicando que a ativação dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos pelo UK bloqueou o efeito positivo do T3 sobre a expressão da Ocn. O T3 tendeu a reduzir a expressão da osteoprotegerina (OPG), um potente agente anti-osteoclastogênico, nas culturas de órgãos Selv, enquanto que reduziu significativamente a expressão da OPG nas culturas KO. O UK reduziu significativamente a expressão da OPG nos ossos Selv e $\alpha 2C$ -AR^{-/-}, sendo que esse efeito foi mais relevante nos ossos KO. Nas culturas primárias de osteoblastos, o T3 diminuiu o crescimento das células Selv e KO, sendo de maneira mais intensa nestas últimas. O UK também diminuiu o crescimento celular nos osteoblastos Selv e KO, entretanto, o seu efeito também foi mais potente nas células $\alpha 2C$ -AR^{-/-}. O efeito inibitório do UK sobre o crescimento celular foi mais relevante do que o do T3, especialmente nas culturas $\alpha 2C$ -AR^{-/-}. Além disso, o T3 intensificou o efeito negativo do UK e vice-versa sobre o crescimento das células $\alpha 2C$ -AR^{-/-}. Nas culturas primárias de osteoblastos Selv e KO, o T3 induziu e o UK inibiu a formação de nódulos de mineralização. Além disso, o UK bloqueou o efeito positivo do T3 sobre a formação desses nódulos. Corroborando o que foi observado nas culturas de órgãos, o T3 estimulou a expressão da Ocn, enquanto que o UK bloqueou esse efeito positivo do T3 nas

culturas primárias de osteoblastos Selv e KO. O T3 ou UK reduziu a expressão da OPG nas células Selv e KO. Em conjunto, esses achados sugerem que o SNS tem ações diretas e osteopênicas no tecido ósseo e, mais especificamente, nos osteoblastos, mediadas por receptores $\alpha 2$ adrenérgicos. Além disso, esses achados suportam a hipótese de que há uma interação entre a via de sinalização dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos com a via de sinalização do T3 em osteoblastos para regular o crescimento celular e diferenciação dessas células.

Descritores: Hormônio tireiódicos; Sistema nervoso simpático; Receptores adrenérgicos alfa 2; Tecido ósseo; Osteoblastos; Metabolismo ósseo.

ABSTRACT

Ferreira LS. *In vitro* evaluation of the interaction of thyroid hormone with the sympathetic nervous system, via alpha 2 adrenergic receptors in bone tissue and osteoblasts [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Previous studies from our group revealed that there is an interaction between thyroid hormone (TH) and the sympathetic nervous system (SNS) to regulate mouse bone mass, involving the $\alpha 2$ adrenoceptor pathway. The aim of this study was to evaluate whether the $\alpha 2C$ adrenoceptor ($\alpha 2C$ -AR) mediates direct actions of the SNS in the bone tissue and, more specifically, in osteoblasts; as well as to assess whether TH interacts with the $\alpha 2C$ -AR signaling pathway locally in bone and osteoblasts to regulate the growth, differentiation, and activity of these cells. To this end, we performed *in vitro* studies using tibia and femur organ cultures and primary cultures of osteoblasts derived from wild-type (WT) and $\alpha 2C$ -AR knockout ($\alpha 2C$ -AR^{-/-}) mice. The cultures were treated with UK (10^{-5} M), an $\alpha 2$ adrenergic agonist; with T3, in supraphysiological dose (10^{-8} M); or with a combination of both (T3+UK). In femurs and tibias (organ cultures) derived from WT and KO mice, T3 promoted significant increases in gene expression of osteocalcin (Ocn), the most abundant non-collagenous protein of the bone matrix and an important marker of osteoblast differentiation. However, this effect was not observed in T3+UK-treated cultures, indicating that activation of $\alpha 2$ adrenergic receptors by UK blocked the positive effect of T3 on Ocn expression. T3 tended to reduce the expression of osteoprotegerin (OPG), a potent anti-osteoclastogenic agent, in WT organ cultures, while it significantly reduced OPG expression in KO cultures. UK significantly reduced OPG expression in WT and $\alpha 2C$ -AR^{-/-} bones, and this effect was more relevant in KO bones. In primary cultures of osteoblasts, T3 decreased growth in WT and KO cells, and more intensely in the latter. UK also decreased cell growth in WT and KO osteoblasts, however, its effect was also more potent in $\alpha 2C$ -AR^{-/-} cells. The inhibitory effect of UK on cell growth was more relevant than that of T3, especially in $\alpha 2C$ -AR^{-/-} cultures. Moreover, T3 intensified the negative effect of UK and vice versa on cell growth in $\alpha 2C$ -AR^{-/-} cultures. In primary WT and KO osteoblast cultures, T3 induced and UK inhibited the formation of mineralization nodules. Furthermore, UK blocked the positive effect of T3 on the formation of these nodules. Corroborating what was observed in organ cultures, T3 stimulated Ocn expression, whereas UK blocked this positive effect of T3 in primary WT and KO osteoblast cultures. T3 or UK reduced OPG expression in WT and KO cells. Taken together, these findings suggest that the SNS has direct and osteopenic actions on bone tissue and, more specifically, on

osteoblasts, mediated by α_2 adrenergic receptors. Furthermore, these findings support the hypothesis that there is an interaction between the α_2 adrenergic receptor signaling pathway and the T3 signaling pathway in osteoblasts to regulate cell growth and differentiation of these cells.

Descriptors: Thyroid hormones; Sympathetic nervous system;
Receptors adrenergics alpha 2; Bone tissue; Osteoblasts; Bone metabolism.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo mineralizado, composto por uma ampla matriz extracelular (MEC), constituída por uma porção orgânica (35%) e outra inorgânica (65%). A maior porcentagem da matriz orgânica (90%) é composta por colágeno tipo I (Col I) e o restante (10%), por proteínas não colágenas, mucopolissacarídeos ácidos e lípidos. A matriz inorgânica é composta principalmente por cálcio e fósforo, que se organizam em nanocristais de hidroxiapatita. Tal composição proporciona rigidez e elasticidade ao tecido ósseo, conferindo-lhe grande capacidade para suportar as demandas mecânicas e resistir a fraturas ósseas [1].

A porção celular representa de 1% a 2% do tecido ósseo, sendo que as principais células que compõem esse tecido são: (a) as células osteoprogenitoras, derivadas de células mesênquimais, dão origem aos osteoblastos; (b) os osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea, sintetizam os principais componentes orgânicos da MEC (colágeno e várias proteínas não colágenas); (c) os osteócitos, as células mais abundantes do tecido ósseo, têm várias funções, dentre elas a detecção do estado químico e mecânico da MEC, e o controle do remodelamento ósseo; (d) as células de revestimento ou de superfície, consideradas osteoblastos quiescentes, são responsáveis pela proteção das superfícies ósseas, além de atuarem no controle do remodelamento ósseo; e, finalmente, (e) os osteoclastos, derivados de células tronco hematopoiéticas, são responsáveis pela reabsorção óssea (Fig. 1) [2, 3].

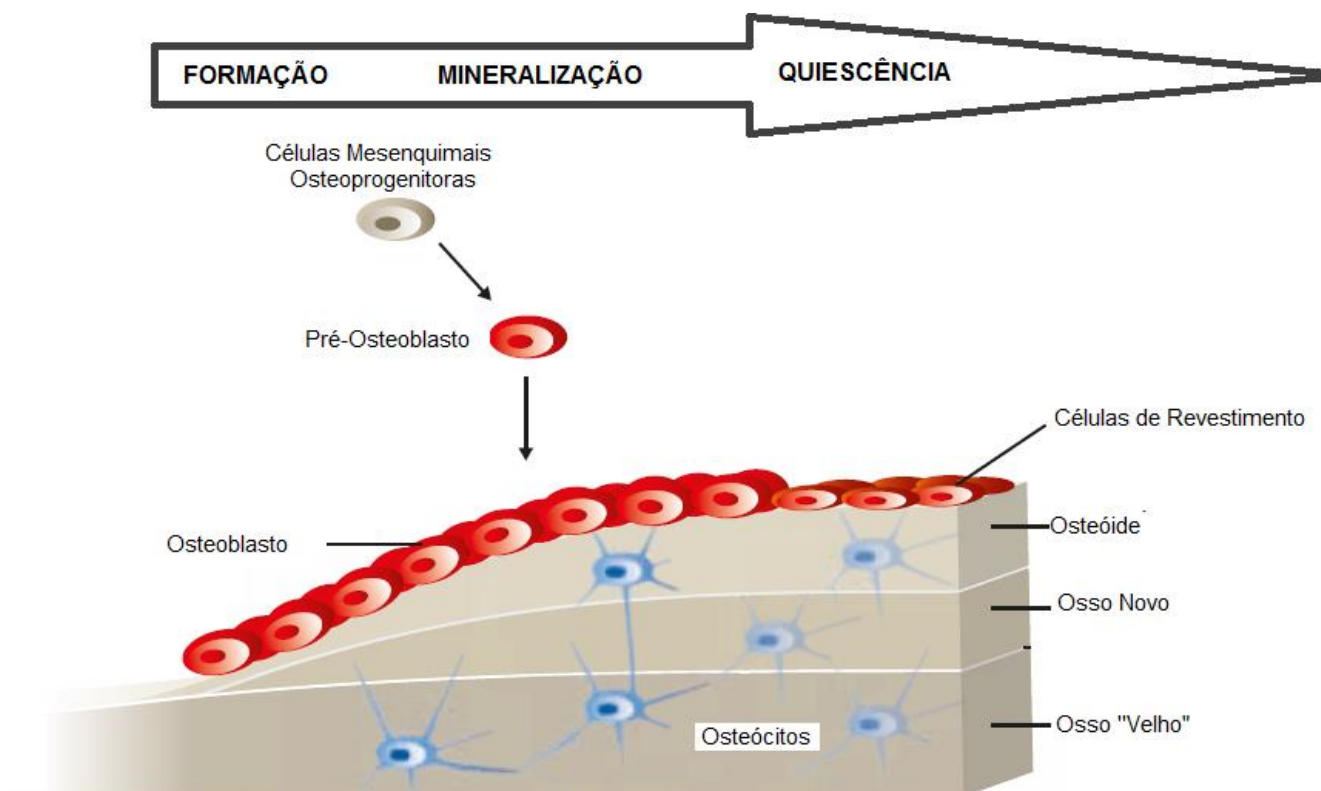


Figura 1 – Formação, Mineralização e Quiescência Óssea. (Fonte - Application Note - Osteoblast Differentiation and Mineralization - PromoCell GmbH - Adaptado).

É digno de nota que os osteócitos e células de revestimento derivam dos osteoblastos e, portanto, pertencem à mesma linhagem celular. Todo osteócito um dia foi um osteoblasto que se tornou encarcerado pelo seu próprio produto, a MEC. Esse encarceramento promove mudanças morfofuncionais nessas células, tornando-as representantes do estágio final de diferenciação osteoblástica. Por outro lado, as células de revestimento são osteoblastos em estado de quiescência, ou seja, osteoblastos que não estão sintetizando os componentes da MEC de forma importante [4].

Ao longo da vida, o tecido ósseo é continuamente remodelado, sendo, portanto, um tecido dinâmico. A remodelação óssea contínua é necessária para a manutenção da matriz óssea, para o reparo de fraturas ósseas, para a adaptação do esqueleto ao estresse mecânico e para o metabolismo mineral [3].

O remodelamento ósseo é um processo complexo, onde as atividades dos osteoclastos (reabsorção óssea) e osteoblastos (formação óssea) devem estar acopladas e balanceadas. Nesse processo, os osteoclastos reabsorvem

matriz óssea (“osso velho”) e, em seguida, os osteoblastos repõem a mesma quantidade de matriz reabsorvida (“osso novo”), quando o indivíduo é jovem. Dessa forma, o tecido ósseo vai sendo renovado e a sua massa e integridade são mantidas. Quando há um desbalanço positivo no remodelamento ósseo, ou seja, quando a formação é maior do que a reabsorção, ocorre ganho de massa óssea. O contrário ocorre em um desequilíbrio negativo (reabsorção maior do que formação), levando à perda de massa óssea [5].

O desequilíbrio positivo e negativo podem ser patológicos, caracterizando doenças como a osteopetrose e osteoporose, respectivamente [5]. O desequilíbrio negativo é comumente observado durante o processo de envelhecimento, especialmente em mulheres que se encontram na pós-menopausa, o que pode levar a uma menor resistência óssea e ao aumento do risco de fraturas ósseas [6].

1.2. Hormônio Tireoideano

A glândula tireoide, localizada ântero-lateralmente à traqueia e à parte distal da laringe, tem como principais produtos a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) [7]. Estes são compostos resultantes da ligação de duas moléculas de tirosina iodadas.

Nos mamíferos, o T4 corresponde a cerca de 60-90 % da produção tireoidiana e o T3, a 10-40 %, sendo que outras iodotironinas inativas biologicamente, como a diiodotironina (T2) e T3 reverso (rT3), correspondem a 1%. O T4 basicamente funciona como um pró-hormônio, sendo convertido à forma ativa dos hormônios tireoideanos (HT), o T3, por ação de enzimas celulares, as desidases das iodotironinas. Essa conversão ocorre na própria tireoide e, principalmente, em tecidos alvo do HT [8, 9].

Três tipos de desidases das iodotironinas foram identificados em tecidos de mamíferos, as desidases do tipo I, II e III (D1, D2 e D3, respectivamente). A D1 converte T4 a T3, T4 a rT3 e T3 a T2, sendo, portanto, ativadora e inativadora dos HTs. A D2 converte T4 a T3 e rT3 a T2. O T4 é o principal substrato da D2, o que faz dela uma enzima prioritariamente ativadora do T4. A D3 é a principal inativadora dos HTs, convertendo T4 a rT3, e T3 a T2.

O hipotireoidismo regula positivamente a atividade da D2 e negativamente a atividade da D3, sendo o oposto observado em casos de tireotoxicose [9].

As ações do HT nos tecidos são primariamente resultado da sua interação com os seus receptores nucleares (TRs), que são fatores de transcrição induzíveis pelo HT. Esses ligam-se aos elementos responsivos do hormônio tireoideano (TREs), que são regiões específicas dos genes alvo. A interação TR-TRE modifica expressão gênica, aumentando ou diminuindo a taxa de transcrição gênica, o que envolve o recrutamento de coativadores ou correpressores. Há quatro isoformas clássicas de TRs codificadas por dois genes [10], o TR α e TR β , localizados nos cromossomos 17 e 3 em humanos, respectivamente. O TR β codifica o TR β 1 e TR β 2, enquanto o TR α codifica o TR α 1 e TR α 2. Essa última isoforma não se liga ao T3 e pode funcionar como um antagonista do TR α 1 e TR β 1 [11].

O HT é requerido para o metabolismo normal da maioria dos tecidos. Além disso, o HT tem ações críticas na diferenciação e crescimento dos tecidos, incluindo o tecido ósseo [12, 13].

1.3. Hormônio Tireoideano e suas ações no Tecido Ósseo

O HT é essencial para o desenvolvimento e metabolismo ósseos [12-14]. Durante o desenvolvimento, a deficiência do HT causa atraso generalizado na ossificação intramembranosa e endocondral, somando-se a importantes alterações na lâmina epifisial (LE), tais como redução da sua espessura, desorganização das colunas de condrócitos e prejuízo na diferenciação de condrócitos proliferativos (CP) em condrócitos hipertróficos (CH), resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas [15]. Por outro lado, o excesso de HT resulta em maturação esquelética acelerada com fechamento prematuro da LE e subsequente diminuição do crescimento longitudinal ósseo [16].

Quanto ao metabolismo ósseo, o HT estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea, uma vez que regula a atividade dos osteoblastos e osteoclastos [17, 18]. 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. Por outro lado, no hipotireoidismo, a atividade dos osteoblastos e osteoclastos encontra-se reduzida, levando à desaceleração do remodelamento ósseo, o que pode resultar em um ligeiro aumento da massa óssea [16].

O HT pode afetar o esqueleto indiretamente, alterando a síntese e/ou secreção de outros hormônios. Exemplos são o hormônio de crescimento e IGF-I (*insulin-like growth factor-1*), cuja expressão gênica e proteica são reguladas pelo HT. Por outro lado, há evidências de que o HT também age diretamente no esqueleto, alterando a expressão de vários genes relacionados ao desenvolvimento e metabolismo ósseos [19, 20].

As ações diretas do HT no esqueleto são primariamente resultado da sua interação com os TRs. O TR α 1, TR α 2 e TR β 1 são expressos nas principais células esqueléticas, os osteoblastos, osteoclastos e condrócitos [21, 22], entretanto, a participação funcional de cada uma dessas isoformas no desenvolvimento e metabolismo ósseos ainda não foi completamente esclarecida. Sabe-se que o TR α 1 é a isoforma predominante no tecido ósseo [23-26], entretanto, estudos do nosso grupo mostram que o TR β 1 medeia importantes efeitos do T3 em células osteoblásticas de ratos e camundongos [20] e, especialmente, no esqueleto de ratos em desenvolvimento [27].

Uma série de estudos mostra ações diretas do HT em osteoblastos [28-30], por outro lado, ainda não há um consenso se a ação do HT nos osteoclastos é direta ou se atua indiretamente através dos osteoblastos [13, 28, 30, 31]. Até o presente momento, não há relatos sobre ações diretas do HT em osteócitos [13].

Apesar das reconhecidas ações do HT no esqueleto, os mecanismos de ação do hormônio tireoideano no tecido ósseo ainda são pouco conhecidos.

1.4. Sistema Nervoso Simpático

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA), juntamente com o Sistema Nervoso Somático (visceral), constitui o componente eferente do Sistema Nervoso Central (SNC) que controla a maioria das funções viscerais do organismo, tendo como alvo o músculo cardíaco, o músculo liso, as glândulas e

parte do tecido adiposo marrom (multilocular). O SNA recebe esta denominação em função das suas ações ocorrerem de forma autônoma, não atingindo o nível de consciência, ou seja, são ações automáticas que independem da nossa vontade. O controle autônomo garante a homeostase do meio interno, diante das perturbações exercidas pelos ambientes externo e interno [32, 33]. Para tanto, esse sistema controla, por exemplo, a pressão arterial, a frequência cardíaca, a sudorese, a temperatura corporal, a glicemia e muitas outras funções.

O SNA é ativado por sinais provenientes da medula espinal, tronco cerebral e hipotálamo, sendo que sinais provenientes do córtex cerebral também podem influenciar o controle autônomo. Os neurônios autônômicos atuam nos diferentes órgãos do corpo através de duas subdivisões, o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) e Sistema Nervoso Simpático (SNS) [32] (Fig. 2). Nesses dois sistemas, a inervação dos tecidos alvo ocorre através de uma via de dois neurônios autônômicos dispostos em série. O primeiro, denominado neurônio pré-ganglionar, está localizado no SNC e o seu axônio (mielínico) projeta-se para um gânglio autônomo, localizado fora do SNC, onde faz sinapse com um neurônio pós-ganglionar, cujo axônio (amielínico) inerva o efector (músculo liso e cardíaco ou glândula).

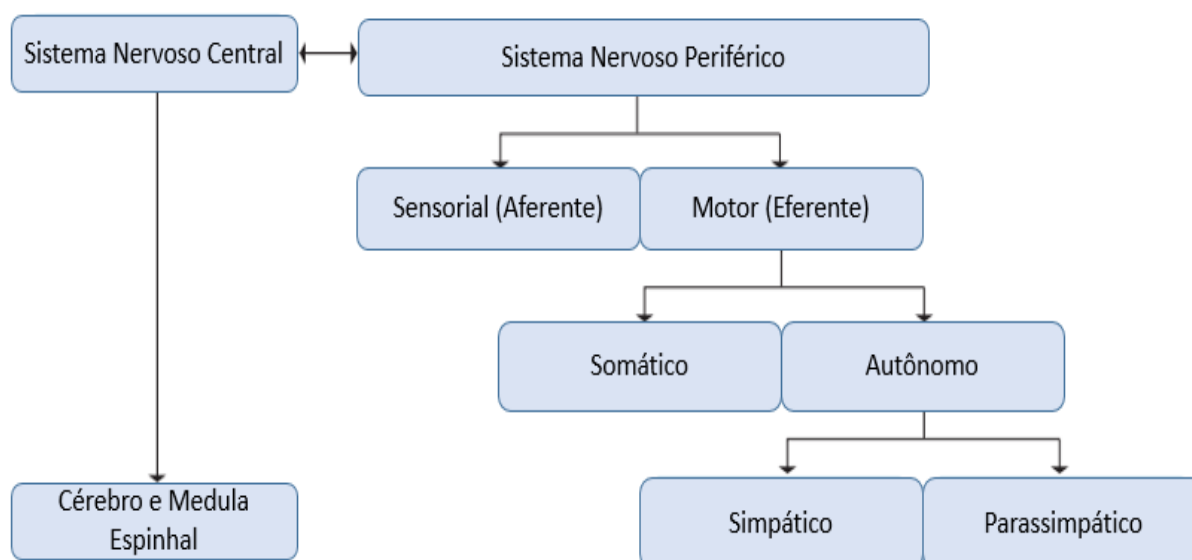


Figura 2 - Subdivisões do Sistema Nervoso. (Fonte - Farley, A., Johnstone, C., Hendry, C., & McLafferty, E. (2014). Nervous system: part 1. Nursing Standard, 28(31), 46–51. doi:10.7748/ns2014.04.28.31.46.e7004 - Adaptado).

É digno de nota que os tecidos e órgãos alvos (efetores) do SNA normalmente apresentam atividade espontânea e independente da inervação autonômica. Entretanto, o SNA, através do SNS e SNP, modula esta atividade espontânea, ativando-a ou inibindo-a. A maioria dos efetores tem inervação dupla, ou seja, simpática e parassimpática, sendo que os dois sistemas normalmente têm ações modulatórias antagônicas sobre eles [34].

A maioria das ações simpáticas resultam na intensificação das atividades metabólicas e da vigília, preparando o corpo para situações de emergência, o que faz com que o SNS seja chamado de sistema de “fuga-ou-luta”. Exemplos de respostas simpáticas são o aumento da frequência cardíaca e respiratória, dilatação das pupilas, aumento da sudorese, boca seca, dilatação dos vasos sanguíneos dos órgãos que atuam em situação de estresse (por ex., coração e músculo esquelético) e constrição dos vasos sanguíneos dos órgãos não envolvidos em situação de estresse (por ex., o trato gastrointestinal e rins) [35]. Por outro lado, o SNP é frequentemente referido como sistema de “repouso-e-digestão”, uma vez que as suas ações favorecem a conservação e reestabelecimento de energia corporal [7].

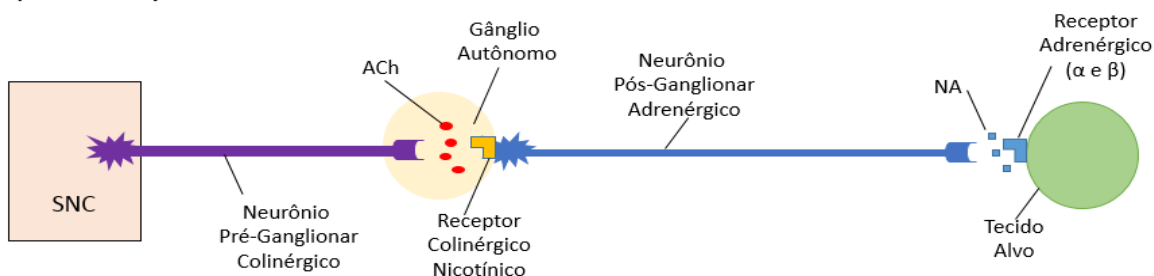
Além de diferenças funcionais entre os dois sistemas autonômicos (SNS e SNP), há também diferenças anatômicas. A seguir, será feita uma breve descrição da organização anatômica do SNS.

No SNS, os neurônios pré-ganglionares estão situados na substância cinzenta da medula espinal, principalmente no corno lateral, entre os segmentos T1 a L2 (parte toracolombar do SNA). Os axônios desses neurônios (fibras mielínicas) emergem da medula espinal pela raiz ventral dos nervos espinais, juntamente com os axônios dos motoneurônios espinais, e logo compõem um feixe (que emerge do ramo ventral do nervo espinal), o ramo comunicante branco, para se projetarem para os gânglios simpáticos, localizados próximo à coluna vertebral (compondo o tronco simpático ou cadeia simpática paravertebral – uma de cada lado da coluna vertebral). Já o axônio pós-ganglionar (amielínico) se direciona para o ramo anterior de um nervo espinal, através do ramo comunicante cinzento, para se projetar e suprir os órgãos e tecidos efetores, situados longe dos gânglios simpáticos. Dessa forma, as fibras pré-ganglionares são curtas e as fibras pós-ganglionares são

longas. Vale ainda dizer que uma fibra pré-ganglionar simpática tem muitos ramos colaterais axônios, podendo fazer sinapse com 20 ou mais neurônios pós-ganglionares, permitindo que respostas simpáticas afetem simultaneamente quase todo o corpo [36].

Os principais neurotransmissores das fibras pré e pós-ganglionares simpáticas são, respectivamente, a acetilcolina e a noradrenalina (NA). Assim sendo, as fibras simpáticas pré-ganglionares são colinérgicas e as pós-ganglionares são adrenérgicas [37]. (Fig.3)

- A) Via Simpática



- B) Via Parassimpática

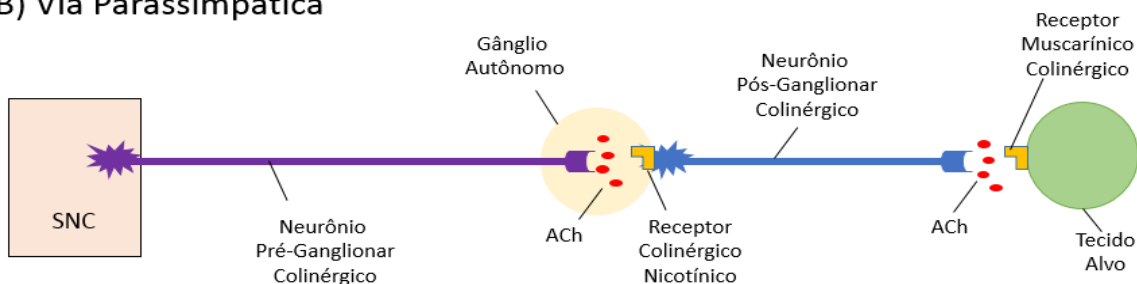


Figura 3 – Vias dos Sistemas Simpático e Parassimpático. (A) As vias simpáticas são distinguidas por gânglios dispostos muito próximos do SNC. Elas usam a noradrenalina (NA) como o neurotransmissor pós-ganglionar. (B) As vias parassimpáticas geralmente possuem os seus gânglios próximos ao tecido alvo e usam a acetilcolina (ACh) como neurotransmissor pós-ganglionar. (Fonte: Criação próprio autor)

Um grupo de fibras simpáticas pré-ganglionares também se projeta até a medula das glândulas supra-renais, onde inerva as células cromafins e estimula a liberação de uma mistura de hormônios conhecidos como catecolaminas, sendo um deles a adrenalina, NA e dopamina. A adrenalina e NA representam, aproximadamente e respectivamente, 80% e 20% da

secreção hormonal da medula. As catecolaminas, derivadas da medula da supra-renal, circulam pelo corpo e intensificam as respostas estimuladas pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos (adrenérgicos) [7].

As catecolaminas transmitem seus sinais biológicos nas células alvo através de receptores de membrana acoplados à proteína G, os receptores adrenérgicos [38-40]. São conhecidos nove subtipos de receptores adrenérgicos, os quais se subdividem em: $\alpha 1$ ($\alpha 1A$, $\alpha 1B$ e $\alpha 1C$) [41], $\alpha 2$ ($\alpha 2A$, $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$) e β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) [42]. Todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos são ativados pela adrenalina e NA. Todas as isoformas de receptores β adrenérgicos (β -AR) estimulam a adenilatociclase (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 β -AR. Por outro lado, os receptores $\alpha 2$ inibem a AC e, portanto, diminuem a formação de AMPC, antagonizando as ações mediadas pelos receptores β -ARs [42, 43].

Os receptores adrenérgicos $\alpha 2$ ($\alpha 2$ -ARs) estão localizados em membranas pré-sinápticas de terminações simpáticas e em neurônios adrenérgicos do SNC, onde atuam como autorreceptores (Fig.4). Este tipo de receptor modula a liberação de neurotransmissores pelo próprio neurônio. Assim sendo, os autorreceptores $\alpha 2$ -ARs modulam a liberação de catecolaminas, regulando negativamente a sua liberação. Os $\alpha 2$ -ARs também estão localizados em neurônios não adrenérgicos, onde atuam como heteroreceptores, modulando a liberação de outros neurotransmissores [42, 44].

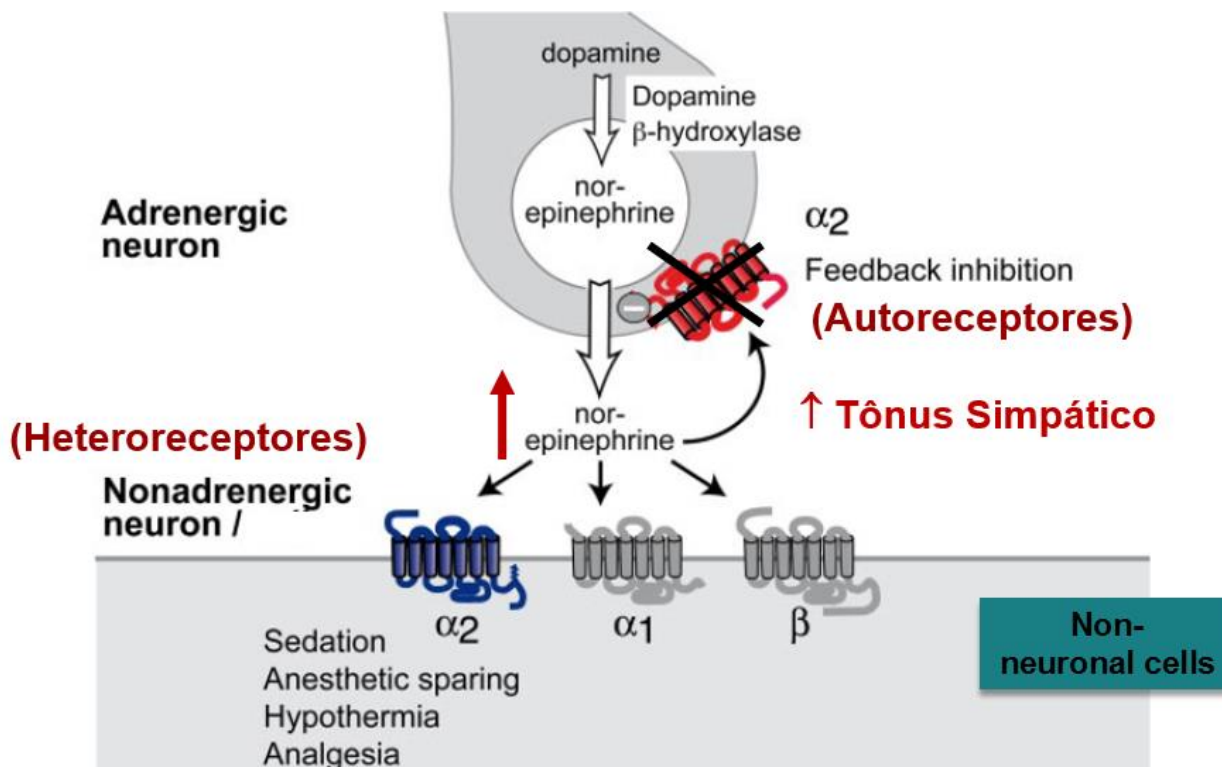


Figura 4 – Receptores α_2 adrenérgicos (α_2 -AR) como Autorreceptores e Heteroreceptores. Os α_2 -ARs estão localizados em membranas pré-sinápticas de terminações simpáticas e em neurônios adrenérgicos do SNC, onde atuam como autorreceptores, modulando negativamente a liberação de catecolaminas. Na ausência dos autorreceptores α_2 , há aumento da liberação de catecolaminas com aumento do tônus simpático. Os α_2 -ARs também estão localizados em neurônios não adrenérgicos, onde atuam como heteroreceptores, modulando a liberação de outros neurotransmissores. Como heteroreceptores atuam no processo de analgesia, sedação e termogênese, dentre outras ações. (Fonte - Gilsbach R, Hein L. Are the pharmacology and physiology of α_2 adrenoceptors determined by α_2 -heteroreceptors and autoreceptors respectively? Br J Pharmacol. 2012 Jan;165(1):90-102. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01533.x. PMID: 21658028; PMCID: PMC3252969 - Adaptado)

Há evidências de que, como heteroreceptores, os α_2 -ARs atuam no processo de analgesia e sedação, e na modulação do comportamento e dor [45]. Esses receptores vêm sendo detectados em uma série de tecidos e estruturas não nervosas, incluindo vasos, veias, miométrio e ilhotas pancreáticas [41], onde atuam, por exemplo, na regulação da pressão arterial e na modulação da liberação de insulina.

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

nasal, bexiga, uretra, corpo cavernoso próstata e também nos vasos e veias de diversos tecidos [41, 45].

1.5. Sistema Nervoso Simpático e suas ações no Tecido Ósseo: Papel dos Adrenoceptores α_2

Evidências sugerem que o SNS regula o remodelamento ósseo através da via dos receptores β_2 adrenérgicos, expressos em osteoblastos [46, 47]. Demonstrou-se que a ativação β_2 adrenérgica no tecido ósseo resulta em redução da formação óssea e em aumento da reabsorção óssea. Assim sendo, espera-se que a diminuição e o aumento da ativação simpática resultem em fenótipo de alta e baixa massa óssea respectivamente [46].

O papel do SNS no controle do remodelamento ósseo foi corroborado pelo fenótipo de alta massa óssea (AMO) observado em modelos de animais com baixa atividade simpática, como os camundongos Ob/Ob, que são obesos e deficientes de leptina, um hormônio que ativa o SNS quando administrado centralmente (no III Ventrículo) [46, 48]. Um outro modelo de baixa atividade simpática e AMO é o camundongo deficiente da dopamina β -hidroxilase (DbH^{-/-}), uma importante enzima, responsável pela síntese de catecolaminas [49]. Esses dois modelos animais (camundongos Ob/Ob e DbH^{-/-}), entretanto, apresentam disfunções endócrinas (hipercortisolismo, hiperinsulinemia e hipogonadismo) que podem afetar o metabolismo ósseo e interferir nos efeitos do SNS no osso.

Uma evidência mais clara do papel dos receptores β_2 adrenérgicos na mediação das ações do SNS no tecido ósseo é a observação de que a administração de agonistas e antagonistas β -adrenérgicos levam, respectivamente, à perda e ao ganho de massa óssea [45, 49, 50]. Uma outra importante comprovação da ação negativa da ativação simpática no remodelamento ósseo se deu através do estudo de animais com inativação gênica (*knockout* = KO) desses receptores, os camundongos β_2 -AR^{-/-}. Esses animais não apresentam anormalidades endócrinas ou metabólicas, mas apresentam um fenótipo de AMO a partir dos 6 meses de idade, decorrente do aumento da formação e diminuição da reabsorção óssea. Além disso, esses

camundongos são resistentes à perda de massa óssea induzida por ovariectomia, o que chama a atenção para a relevância das ações do SNS no remodelamento ósseo [47].

Diante desses achados, o nosso grupo investigou se os receptores $\alpha 2$ adrenérgicos ($\alpha 2$ -AR) também medeiam ações do SNS no esqueleto. Demonstramos que os adrenoceptores $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ e $\alpha 2C$ ($\alpha 2A$ -AR, $\alpha 2B$ -AR e $\alpha 2C$ -AR) são expressos nas principais células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e em condrócitos da LE, dos centros de ossificação secundários, e da cartilagem articular. Pudemos observar, ainda, que camundongos com duplo KO dos genes do $\alpha 2A$ -AR e do $\alpha 2C$ -AR ($\alpha 2A/\alpha 2C$ -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo AMO [41]. Esse achado foi surpreendente uma vez que esses camundongos apresentam níveis séricos elevados de catecolaminas e expressam os adrenoceptores $\beta 2$ [51], que medeiam ações negativas do simpático no osso [46, 47, 52]. Como descrito anteriormente, os adrenoceptores $\alpha 2$ atuam como autorreceptores, inibindo a liberação das catecolaminas. Assim sendo, na ausência desses receptores, há aumento da liberação de NE, com consequente aumento do tônus simpático [51]. Considerando-se o fenótipo de alta atividade simpática dos camundongos $\alpha 2A/\alpha 2C$ -AR^{-/-}, esperava-se que apresentassem um fenótipo de baixa massa óssea (BMO). Em contraste, o fenótipo de AMO sugeriu que o $\beta 2$ -AR não é o único adrenoceptor envolvido no controle do metabolismo ósseo, além de sugerir que o $\alpha 2A$ -AR e/ou $\alpha 2C$ -AR pudessem mediar ações catabólicas do SNS no tecido ósseo.

Para desvendar os papéis específicos dos diferentes subtipos dos adrenoceptores $\alpha 2$, vimos que camundongos com inativação isolada do $\alpha 2C$ -AR ($\alpha 2C$ -AR^{-/-}) apresentam baixa massa óssea no fêmur e alta massa óssea nas vértebras lombares, sugerindo que as ações do SNS ocorrem de maneira dependente do sítio do esqueleto e que esse receptor provavelmente medeia ações catabólicas do SNS nas vértebras e anabólicas no fêmur [53].

Uma outra hipótese seria a de que o $\alpha 2A$ -AR tivesse um papel predominantemente osteopênico no fêmur. Entretanto, vimos que o fenótipo esquelético de animais com inativação isolada desse receptor, os camundongos $\alpha 2A$ -AR^{-/-}, apresentam fenótipo esquelético praticamente normal,

tanto no fêmur como na coluna vertebral [54]. Esses achados demonstram que o α 2A-AR não tem um papel essencial na mediação das ações do SNS no esqueleto e sugerem, ainda, que possa haver um balanço e compensações entre as ações dos diferentes adrenoceptores na regulação da massa óssea, o que adiciona grande complexidade às ações do SNS no esqueleto.

1.6. Interação do Hormônio Tireoideano com o Sistema Nervoso Simpático

O SNS interage com o HT para regular vários sistemas e funções fisiológicas, como, por exemplo, a frequência cardíaca, pressão arterial, termogênese, lipogênese, lipólise, glicogênese e glicogenólise, dentre outras funções. Evidências sugerem que a interação entre o SNS e HT é coordenada e, na maioria das vezes, sinérgica [55]. Uma evidência disso é o fato do hipertireoidismo normalmente ser acompanhado por manifestações clínicas que caracterizam um estado de hiperatividade simpática, tais como intolerância ao calor, palpitações, taquicardia e nervosismo, dentre outras. Assim sendo, respostas exageradas às catecolaminas dominam as manifestações da tireotoxicose. Por outro lado, o hipotireoidismo é caracterizado por uma redução de respostas simpáticas, como intolerância ao frio, respostas metabólicas reduzidas ao exercício e frio, e redução da reserva hemodinâmica [55, 56].

Apesar da reconhecida interação entre SNS e HT, os mecanismos desse *cross-talk* ainda são pouco compreendidos e vêm sendo investigados em diferentes sistemas [57]. Sabe-se que o HT não aumenta a concentração de catecolaminas no plasma, sendo que pacientes tiorotóxicos apresentam níveis séricos e urinários de NA normais ou diminuídos, enquanto que níveis elevados de catecolaminas podem ser observados em pacientes hipotiroideos [58, 59]. Assim sendo, as características simpatomiméticas do hipertireoidismo não podem ser explicadas pelo aumento da síntese e secreção de catecolaminas, mas sim por outros mecanismos que permitam uma resposta exagerada das células às catecolaminas, caracterizada, por exemplo, pelo aumento excessivo da produção de AMPc em resposta à adrenalina e NA. De fato, níveis

plasmáticos de AMPc mostram-se elevados em pacientes hipertiroideos e reduzidos em pacientes hipotiroideos [60, 61].

Um dos mecanismos para essa resposta simpática exagerada na tireotoxicose é o aumento do número de receptores β adrenérgicos induzido pelo T3 [62]. Entretanto, este mecanismo não é observado em todos os tecidos e, normalmente, não é suficiente para explicar a magnitude de amplificação da resposta adrenérgica induzida pelo HT, o que sugere que o T3 regule outros efetores da via dos receptores adrenérgicos, ou seja, efetores pós-receptor (*downstream effectors*) [55].

Demonstrou-se, por exemplo, que o HT aumenta a atividade da adenilato ciclase na gordura epididimal [63] e no tecido adiposo marron [64] de roedores. Detectou-se, também, que o HT afeta a expressão de diferentes isoformas de adenilato ciclase [65, 66]. Por outro lado, acredita-se que o principal mecanismo pós-receptor através do qual o HT aumenta as respostas simpáticas seja regulando a expressão de subunidades da proteína G. Vários estudos demonstraram que o T3 inibe a expressão de algumas espécies de subunidades G α 1 e G β [67-69], que são proteínas que participam da regulação da atividade da adenilato ciclase. Estudos sugerem, ainda, que o HT aumenta os níveis celulares de AMPc por limitar a sua degradação, inibindo algumas fosfodiesterases no tecido adiposo [70].

Além das manifestações simpatomiméticas da tireotoxicose, uma outra implicação clínica da interação do HT com o SNS é o reconhecimento de que o bloqueio da atividade simpática, através do uso de beta bloqueadores, é benéfico para vários pacientes hipertiroideos, uma vez que minimiza as referidas manifestações clínicas. Entretanto, é importante assinalar que o bloqueio simpático não substitui o tratamento do hipertiroidismo, uma vez que não afeta os efeitos diretos do HT nos tecidos [55].

1.7. Evidências da interação do Hormônio Tireoideano com o Sistema Nervoso Simpático para regular a estrutura e fisiologia ósseas, via receptores Alfa 2 Adrenérgicos

Diante da reconhecida interação do HT com o SNS para regular várias funções fisiológicas, e do conhecimento das ações do HT e do SNS na regulação do remodelamento ósseo, o nosso grupo levantou a hipótese de uma possível interação entre o HT e o SNS para regular o metabolismo ósseo e, conseqüentemente, a massa óssea. Uma evidência dessa possível interação é a correção da hipercalcemia secundária à tireotoxicose em pacientes hipertiroideos tratados com propranolol, um antagonista β -adrenérgico [57]. Além disso, pacientes hipertiroideos tratados com propranolol apresentaram redução da excreção urinária de hidroxiprolina, um marcador bioquímico de reabsorção óssea [57], o que sugere que o aumento da reabsorção óssea no hipertiroidismo possa envolver mecanismos dependentes da sinalização β -adrenérgica.

Para investigar uma possível interação da sinalização β -adrenérgica com o HT para regular a massa óssea, um estudo recente do nosso grupo analisou o efeito de doses suprafisiológicas de T3, por 90 dias, na microarquitetura óssea e em parâmetros biomecânicos do fêmur de camundongos com inativação gênica do β 2-AR (β 2-AR^{-/-}). Observou-se que as fêmeas β 2-AR^{-/-} são mais resistentes aos efeitos osteopênicos da tireotoxicose do que os animais selvagens (Selv), especialmente quanto ao osso cortical. Esses achados fortalecem a hipótese de uma interação entre o HT e o SNS para regular a massa óssea, além de sugerir que essa interação envolve a sinalização β 2 adrenérgica [71]. Por outro lado, uma série de estudos do nosso grupo vêm demonstrando que a interação entre o HT com o SNS para regular o metabolismo ósseo também pode ocorrer via receptores α 2-AR.

Em um primeiro estudo, avaliamos o efeito da tireotoxicose no esqueleto de camundongos fêmeas α 2A/2C-AR^{-/-}. Considerando-se que esses animais apresentam hiperatividade simpática, a nossa hipótese era de que o efeito osteopênico do HT fosse mais marcante nos animais duplo KO. Porém, surpreendentemente, observou-se que os animais α 2A/2C-AR^{-/-} são resistentes

aos efeitos deletérios da tireotoxicose na massa óssea, na microarquitetura do osso cortical e trabecular, e na resistência a fraturas [72]. Os dados deste estudo demonstraram que o T3 inibe a expressão do $\alpha 2$ C-AR no osso de camundongos Selv e que o T3 reduziu significativamente a expressão da osteoprotegerina (OPG), uma proteína que limita a osteoclastogênese e atividade osteoclástica, nos animais Selv, mas não nos animais KOs [72]. Em conjunto, esses achados sugerem fortemente que o HT interage com o SNS para regular a massa óssea, através de mecanismos que envolvem a sinalização $\alpha 2$ -adrenérgica.

Posteriormente, avaliamos o efeito da tireotoxicose no esqueleto de camundongos fêmeas com inativação gênica isolada do $\alpha 2$ C-AR ($\alpha 2$ C-AR^{-/-}), com o objetivo de discriminar o papel das diferentes isoformas dos adrenoceptores $\alpha 2$ na possível interação entre o HT e SNS para regular a massa óssea. Vimos que os animais $\alpha 2$ C-AR^{-/-} também se mostraram resistentes aos efeitos osteopênicos da tireotoxicose, tanto no osso trabecular femoral quanto vertebral [53]. Esses achados sugerem que a sinalização do $\alpha 2$ C-AR é necessária para que a tireotoxicose promova os seus efeitos osteopênicos.

Ainda com o objetivo de discriminar os papéis das diferentes isoformas de adrenoceptores $\alpha 2$ na interação HT-SNS, investigamos o efeito da tiroxicose no esqueleto de camundongos fêmeas com inativação isolada do $\alpha 2$ A-AR ($\alpha 2$ A-AR^{-/-}). Em contraste ao que foi observado nos camundongos $\alpha 2$ C-AR^{-/-}, a tireotoxicose se mostrou mais deletéria ao osso trabecular do fêmur em camundongos $\alpha 2$ A-AR^{-/-} do que nos camundongos Selv [54], reforçando a hipótese de que a sinalização do $\alpha 2$ C-AR medeia efeitos deletérios do SNS no esqueleto, e que participa da interação entre o HT e o SNS para regular a massa óssea.

Apesar das evidências de que há um *crosstalk* entre o SNS e o HT para regular a morfofisiologia óssea, os mecanismos dessa interação são totalmente desconhecidos. Um primeiro questionamento a ser feito é se essa interação é local, central ou sistêmica, ou seja, se ocorre no tecido ósseo (local), no SNC (central) ou em outros tecidos ou órgãos que afetem o tecido ósseo (sistêmica). Outra questão importante é se uma possível interação local envolve a via de

sinalização dos adrenoceptores α_2 e, mais especificamente, a via do α_2C -AR. No presente estudo, levantamos a hipótese de que há interação entre o SNS e HT no tecido ósseo (ou seja, interação local), envolvendo o α_2C -AR. Para investigar essa questão, realizamos estudos *in vitro* utilizando culturas de órgãos de tíbia e fêmur e culturas primárias de osteoblastos.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivos Gerais

- Investigar se o receptor adrenérgico Alfa2C (α 2C-AR) tem ação direta, ou seja, local (esquelética) no tecido ósseo e, mais especificamente, em osteoblastos.
- Investigar se o HT interage com a via de sinalização do α 2C-AR, localmente, no tecido ósseo e em osteoblastos, para regular o remodelamento ósseo e a biologia dos osteoblastos.

2.2. Objetivos Específicos

- Em cultura de órgão de fêmur e tíbia, provenientes de camundongos selvagens (Selv) e com inativação isolada do α 2C-AR (camundongos α 2C-AR^{-/-}), investigar se o UK, um agonista dos adrenoceptores α 2; o T3 em dose suprafisiológica e a combinação de ambos os tratamentos alteram diretamente a expressão de genes relacionados ao remodelamento ósseo.
- Em culturas primárias de osteoblastos, provenientes de camundongos Selv e α 2C-AR^{-/-}, investigar se o UK; o T3 (em dose suprafisiológica) e a combinação de ambos os tratamentos, altera diretamente o crescimento (aumento do número de células) e a diferenciação osteoblástica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e Acasalamento

Foram estudados camundongos da linhagem C57BL/6J (Selv) e camundongos com inativação gênica do receptor $\alpha 2C$ (camundongos $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$), que nos foram cedidos pela Dra. Patrícia C. Brum, Professora Associada da Escola de Educação Física e Esporte (EEFE), Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura (ciclos alternados de claro/escuro de 12 horas em temperatura de aproximadamente 25°C), com acesso *ad libitum* à ração e água.

Para o acasalamento, duas fêmeas e um macho foram colocados em uma gaiola por 12 horas. Ao final desse período, é avaliada a presença de rolha vaginal, que é utilizada para a comprovação de coito. O dia do coito foi considerado o dia 0 (zero) de vida embrionária (E0). A gestação foi acompanhada de perto e o dia do nascimento foi considerado o primeiro dia de vida pós-natal (PN0). Os animais utilizados para os experimentos descritos abaixo tinham entre 0 e 4 dias e sofreram eutanásia por decapitação com lâminas afiadas.

Foram mantidos 5 casais (entendendo-se que os “casais” são compostos por duas fêmeas e um macho) para cada linhagem de camundongos (Selv e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$), perfazendo um total de 10 casais para manutenção da espécie. A cada 7-8 meses, houve a troca dos casais. Os casais excluídos do estudo foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂). Os procedimentos experimentais envolvendo os animais foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas e da FMUSP- CEUA nº 2025041217.

3.2. Estudo I – Ações do HT e $\alpha 2C\text{-AR}$ em Cultura de Órgãos – Ossos Longos

3.2.1. Cultura de Órgãos – Ossos Longos (Fêmur e Tíbia)

Para a investigação de possíveis ações do HT e $\alpha 2$ C-AR no tecido ósseo, foram estabelecidas culturas de órgãos, ou seja, culturas de ossos longos (fêmur e tíbia). Imediatamente após a eutanásia dos animais com idade entre 0 e 4 dias, os fêmures e tíbias foram dissecados retirando as epífises, utilizando-se um esteriomicroscópio (Leica Microsystems S6E, Heerbrugg, Switzerland), em solução de Puck Saline A (PSA), composta por cloreto de potássio (KCL), cloreto de sódio (NaCL), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e Glicose. Em seguida, os ossos foram cultivados (cultura de órgão), em meio sem soro (MSS), composto por α MEM, suplementado com 0.05 mg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 0.2% BSA (Sigma-Aldrich), 100U/ml de penicilina e 100 μ g de estreptomicina (Gibco) [73]. Os ossos foram cultivados individualmente em placas de 24 poços, contendo 1ml de MSS/poço e foram tratadas com T3 (3,3',5-Triiodo-L-Thyronine Sodium Salt-Sigma-Aldrich) a 10^{-8} M, e/ou com UK 14, 304 (Sigma-Aldrich), um agonista $\alpha 2$ adrenérgico, a 10^{-5} M e ao final foi feito um "pool" de amostras, colocando no mesmo tubo de armazenamento um fêmur e uma tíbia do mesmo animal e da mesma lateralidade (Fig.5).

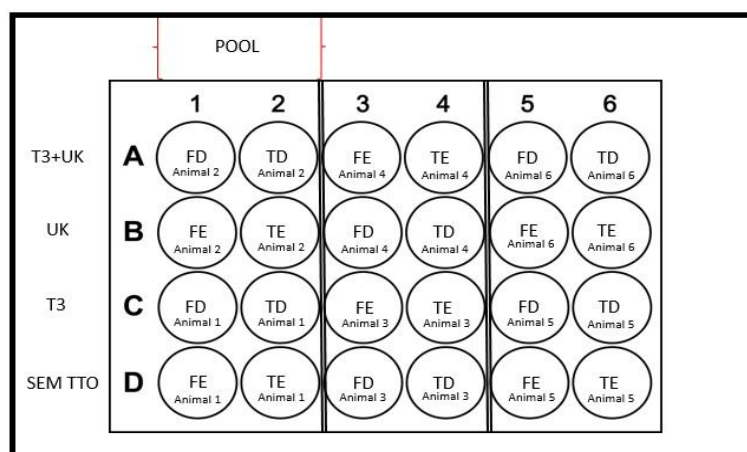


Figura 5 – Representação esquemática do plaqueamento da cultura de órgãos: FD: Fêmur Direito; FE: Fêmur Esquerdo; TD: Tíbia Direita; TE: Tíbia Esquerda.

As culturas foram mantidas por 72 horas, contando a partir do dia 0 (P0) que foi quando se iniciou o tratamento com T3 e/ou UK e o meio foi trocado como indica a Tabela 1.

DIA -1	DIA 0 (P0)	DIA 1 (24HRS)	DIA 2 (48HRS)	DIA 3 (72HRS)
Plaqueamento (sem tratamento)	Troca de meio + Início tratamento	/	Troca de meio + Tratamento	Coleta

Tabela 1 – Representação esquemática dos dias para troca de meios e tratamentos das culturas de órgãos

3.2.2. Expressão gênica por PCR em tempo real (Real-Time PCR)

Os fêmures e tíbias mantidos em cultura foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80 °C. Para a extração do RNAm, os ossos foram pulverizados, na presença de nitrogênio líquido, em um *mortar* e pistilo de aço (Fisher Scientific International, Inc, Hampton, NH, USA) previamente resfriados em gelo seco. Ao "pó" de cartilagem, foi adicionado Trizol (Gibco, BRL). A mistura de pó de osso mais Trizol foi homogeneizada com um polytron PT10-35 (Brinkmann Instruments, Inc, NY, USA). O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do TRizol e tratado com DNase I (Fermentas, Hanover, MD, USA), segundo indicação do fabricante. A concentração e pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria medindo-se a absorbância em tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0, e 1mM EDTA) a 260 e 280nm. O DNA complementar (DNAC) foi sintetizado a partir do RNA total extraído (1,0µg), 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 (heat inactivation) da transcriptase reversa a 95°C por 5 min no termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Os *primers* de oligonucleotídeos para amplificação por PCR estão apresentados na Tabela 2.

Ocn	F: CTC ACA GAT GCC AAG CCC A R: CCA AGG TAG CGC CGG AGT CT
Beta-Actina	F: GCA CCA CAC CTT CTA CAA TG R: TGC TTG CTG ATC CAC ATC TG
OPG	F: AGT CCG TGA AGC AGG AGT G R: CCA TCT GGA CAT TTT TTG CAA A

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados na realização do PCR em tempo real:

F = Forward , R = Reverse

Os valores relativos à amplificação do RNAm referentes a cada gene estudado foram avaliados através da mensuração da fluorescência, quantificada por um termociclador e detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), comparando todas as amostras e o controle em duplicatas. Após padronização da quantidade de DNAc e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 25µl, com 450nM de *primers* e *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). O gene Beta-Actina foi utilizado como controle interno para corrigir a variabilidade nas amplificações. O DNAc foi amplificado em duplicatas nas seguintes condições: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento). Os valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos foram normalizados com o controle interno e a quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método do $\Delta\Delta Ct$ como previamente descrito por Mullah [74].

3.3. Estudo II – Ações do HT e $\alpha 2C$ -AR em em culturas primárias de osteoblastos.

3.3.1. Cultura primária de células osteoblásticas derivadas da calvária de camundongos

Para a investigação de possíveis ações diretas do HT e $\alpha 2C$ -AR em osteoblastos, foram estabelecidas culturas primárias de osteoblastos derivadas da calvária de camundongos neonatos (PN0-PN4) Selv e $\alpha 2C$ -AR^{-/-}. As calvarias foram dissecadas (Fig. 6) e as células da linhagem osteoblástica foram isoladas por digestão enzimática sequencial, utilizando-se meio de digestão com 1% de tripsina e 1% de collagenase, em meio α -MEM (Gibco BRL, Paisley, UK), como descrito por Zhong, Z.A. et al. [75].

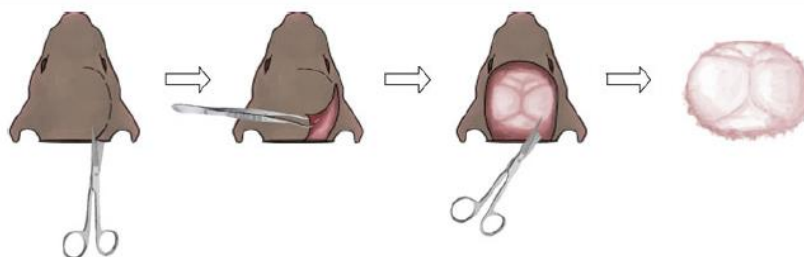


Figura 6 – Demonstração ilustrativa do modo de dissecção da calvária de camundongos neonatos (PN0-PN4). Calvária exposta e retirada inteira para posterior digestão; (Fonte: Zhendong A. Zhong et al. Use of Primary Calvarial Osteoblasts to Evaluate the Function of Wnt Signaling in Osteogenesis).

As células foram cultivadas em placas de petri de 100mm (P100), em meio de cultivo contendo α -MEM (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (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 7 dias), sendo que o meio foi trocado a cada 2 dias. Após atingirem confluência, as células foram coletadas e semeadas de acordo com os objetivos de cada experimento.

3.3.1.1. Tratamento do FBS com Carvão Ativado (FBS-CA)

O tratamento do soro com carvão ativado [*charcoal stripped serum* (CSS)] é utilizado basicamente para retirar lípidos, esteróides e HT do soro. Para tanto, foram adicionados 6,5g de carvão ativado para cada 100ml de FBS. Essa mistura foi mantida em um agitador magnético por 12 horas, a 4°C. Após esse período, o soro foi centrifugado em uma ultra-centrifuga (SORVALL Ultra pro 80, Kendro Laboratoty Products – Newtown, Connecticut- USA) por 1 hora, a 48000G, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo e centrifugado novamente. Esse procedimento foi repetido três vezes. Ao final de todas as centrifugações, o sobrenadante, ou seja, o FBS-CA, foi retirado e filtrado.

3.3.1.2. Análise do Crescimento Celular

As células osteoblásticas foram semeadas inicialmente em uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células por poço, em placas de 24 poços e cultivadas em meio de cultivo. Depois de 72 horas do plaqueamento (considerado o dia 0), o meio de cultura foi substituído por meio de diferenciação (MD), que se refere ao meio de cultivo suplementado com 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO) e 10mM β-glicerofosfato (Sigma).

No dia seguinte, D0, foi iniciado o tratamento com T3 (10^{-8} M), UK (10^{-5} M), a combinação de ambos (T3+UK) e mantendo o controle com nenhum tratamento (Cont). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Células foram coletadas no dia 0 (sem serem tratadas); e no 3º, 6º, 9º e 12º dia de tratamento (T0, T3, T6, T9 e T12 respectivamente), para determinar o número de células. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Para realizar a contagem, primeiramente as células foram lavadas com PBS, em seguida foi adicionada Tripsina-EDTA 0,5% e a placa foi deixada por 5 minutos na estufa de CO₂ para que as células se soltem. Após os 5 minutos, foi adicionado meio de crescimento para interromper a ação da tripsina e este meio total foi coletado em tudo de 1,5ml e levado à centrífuga por 5 minutos.

Depois o sobrenadante foi retirado e as células são ressuspensas em uma quantidade de meio de crescimento adequado à sua concentração.

A contagem celular foi realizada utilizando a câmara de Neubauer, que foi levada ao microscópio, permitindo a visualização da malha e dos quadrantes. A contagem foi realizada em duplicata, são contadas as células dos 4 quadrantes dos cantos e o quadrante do meio, não contando apenas as células que estiverem sobre as linhas da direita e inferior. Ao final, o valor da primeira contagem foi somado ao da segunda e depois dividido por 10 (número de quadrantes contados no total).

3.3.1.3. Diferenciação Osteoblástica

3.3.1.3.1. Avaliação da Formação de Nódulos de Mineralização

As células foram plaqueadas, em triplicatas para cada grupo, numa densidade de 4×10^4 células/poço, em placas de 12 poços. Após 72 horas do plaqueamento, as células receberam o MD, que como citado acima se refere ao meio de cultivo suplementado com 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico (Sigma, St. Louis, MO) e 10mM β -glicerofosfato (Sigma). No dia seguinte, D0, foi iniciado o tratamento com T3 (10^{-8} M), UK (10^{-5} M), a combinação de ambos (T3+UK) e mantendo o controle com nenhum tratamento (Cont). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. A quantificação dos nódulos de mineralização, que é uma medida da diferenciação osteoblástica, foi feita no 21^o dia de tratamento (T21). Para tanto, as culturas de células foram coradas com vermelho de alizarina como descrito a seguir.

Inicialmente, o meio de cultivo foi retirado e as culturas foram lavadas com PBS e em seguida fixadas com etanol 70% a temperatura ambiente por 30 minutos. Após o tempo estabelecido, as culturas foram lavadas 3x com água MilliQ e depois deixadas numa solução de vermelho de alizarina 0,2% [0,2 g de Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich) em 100mL de PBS] por 30 minutos. Ao final, as culturas foram lavadas novamente com PBS e seu o excesso foi retirado das amostras para que as mesmas sequem destampadas em temperatura ambiente [29].

Para a análise quantitativa do acúmulo de cálcio nas amostras, foi utilizado o método descrito por Gregory et al. (2004), adaptado [76]. Com a adição, em cada poço, de 320ul de ácido acético a 10%, as placas de cultura foram submetidas à agitação suave de 80rpm por 30 minutos. A camada de células foi raspada e a solução transferida para tubos de 1,5ml para, em seguida, serem aquecidas a 85°C por 10 minutos e depois centrifugadas a 13.000rpm durante 15 minutos. Foi coletado o sobrenadante de cada tubo e colocado em novos tubos, também de 1,5ml, e em cada um deles foi adicionado 80ul de hidróxido de amônio a 10%. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex. Por fim, a absorbância de cada amostra foi determinada em um espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 405nm.

3.3.1.3.2. Avaliação da Expressão de Genes Relacionados à Diferenciação Osteoblástica e ao Remodelamento Ósseo.

Todo o procedimento de plaqueamento e tratamento das células foi o mesmo descrito no item 3.3.1.2. Entretanto, para a extração do RNA, as células foram plaqueadas numa densidade de 10^5 célula/poço em placas de 6 poços, em duplicatas. As células foram coletadas e processadas para a extração de RNA total, em T0, T3, T6, T9 e T15, para posterior estudo da expressão gênica de genes marcadores da diferenciação osteoblástica (Ocn) e de genes relacionados ao remodelamento ósseo (OPG). A extração do RNA total foi feita utilizando-se Trizol Reagent, de acordo com as orientações do fabricante. O processamento do RNA e a análise da expressão gênica foram feitos de acordo com o item 3.2.2.

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. Estudo I – Ações do HT e $\alpha 2C$ -AR em Cultura de Órgãos (Ossos Longos)

Em um primeiro momento, foram investigadas as possíveis ações diretas do HT e $\alpha 2C$ -AR no tecido ósseo, avaliando a expressão gênica da Ocn e OPG em fêmures e tíbias isolados em cultura (culturas de órgãos).

Observamos que o tratamento com T3 por 72 horas promoveu um aumento de 4 e 6 vezes na expressão gênica da Ocn nas culturas de órgãos de animais Selv e $\alpha 2C$ -AR^{-/-}, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles (Cont) – culturas não tratadas (Fig. 7). Em contraste, o UK (agonista $\alpha 2$ adrenérgico) tendeu a reduzir a expressão gênica da Ocn (versus Cont), porém, essa redução não atingiu o limiar de significância. Entretanto, foi possível observar que o UK claramente bloqueou o efeito positivo do T3 (T3+UK) sobre a expressão gênica da Ocn, tanto nos animais Selv quanto KO.

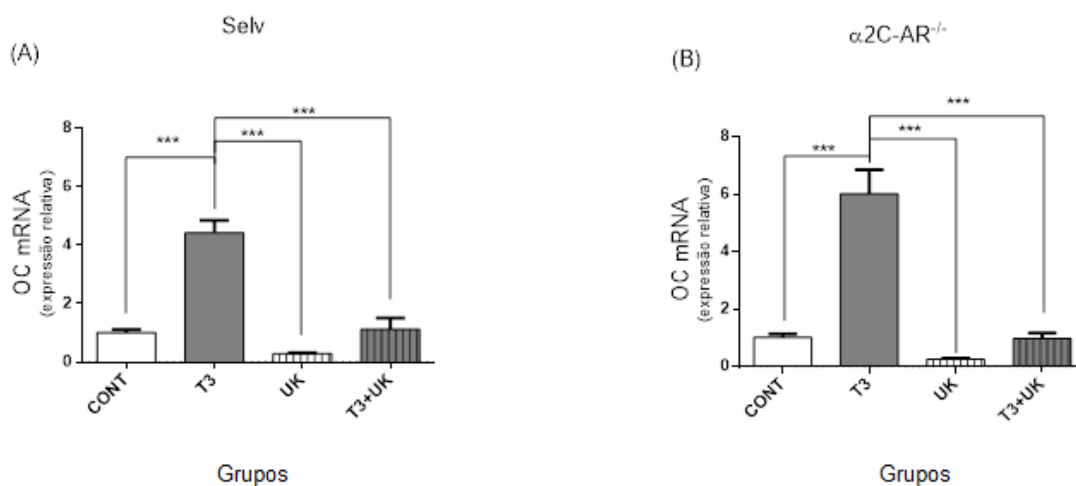


Figura 7 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteocalcina (Ocn) em Cultura de Órgão. (A e B) Culturas de órgãos (fêmur e tíbia) derivados de camundongos selvagens (Selv) e $\alpha 2C$ -AR^{-/-} tratadas com T3 (10^{-8} M) e/ou UK (10^{-5} M) por 72 horas. A expressão gênica relativa da Ocn foi determinada por PCR em tempo real. O controle (Cont) refere-se às culturas que permaneceram sem tratamento. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p > 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com relação à expressão da OPG (Fig.8), foi observado que o T3 reduziu a expressão desse gene em 22% e 56% nas culturas de órgãos dos animais Selv e KO em relação às células não tratadas (células Cont), respectivamente, sendo que esse efeito foi significativo estatisticamente nos ossos derivados de animais $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ (Fig. 8A). O UK sozinho afetou a expressão da OPG, de forma importante e significativa, nos ossos Selv e KO, onde reduziu a expressão da OPG em 52% e 83%, respectivamente (Fig. 8B). Aparentemente, o UK não interferiu na ação do T3 sobre a OPG, tanto, nos ossos Selv quanto KO.

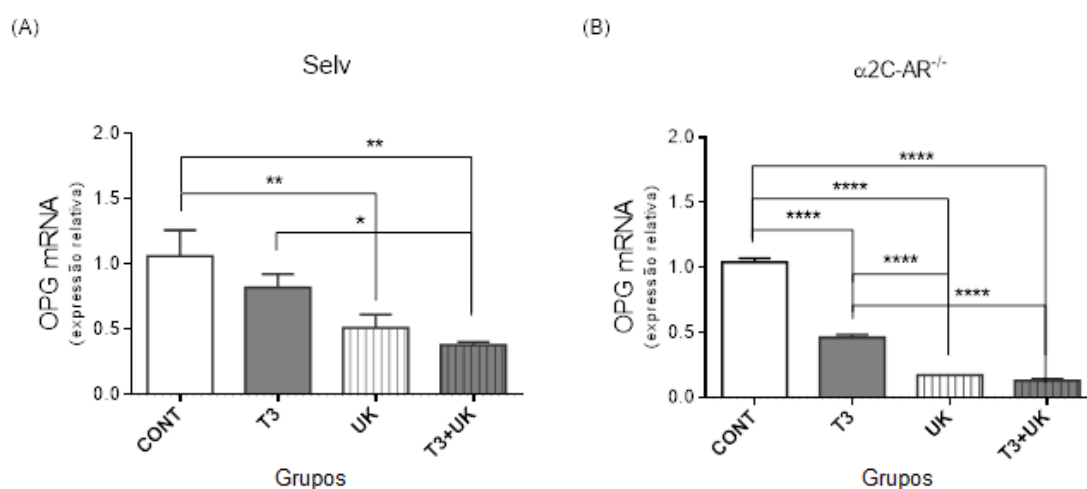


Figura 8 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteoprotegerina (OPG) em Cultura de Órgão. Culturas de órgãos (fêmur e tibia) derivados de camundongos selvagens (Selv) e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ tratadas com T3 (10^{-8} M) e/ou UK (10^{-5} M) por 72 horas. (A e B) A expressão gênica relativa da OPG foi determinada por PCR em tempo real. O controle (Cont) refere-se às culturas que permaneceram sem tratamento. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,001$.

5.2. Estudo II – Ações do HT e $\alpha 2C\text{-AR}$ em culturas primárias de osteoblastos.

Para os experimentos envolvendo culturas primárias de osteoblastos (Estudo II), inicialmente testamos o comportamento das células em meio de cultura (α MEM) contendo FBS previamente tratado com carvão ativado (CSS). Este método foi utilizado basicamente para retirar os hormônios tireoideanos do

soro, e para, assim, minimizar a interferência do T3 proveniente do FBS nos experimentos.

Em um primeiro experimento, células derivadas da calvária de camundongos selvagens (Selv) da linhagem C57BL/6J foram plaqueadas e cultivadas em meio completo (MC), ou seja, meio α MEM contendo 10% de FBS. Depois de 72 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi substituído por meio de diferenciação (MD), que se refere ao MC suplementado com ácido ascórbico e α -glicerofosfato. No dia seguinte (considerado o dia 0), as células foram mantidas em meio contendo 10% de FBS, 10% de CSS ou 5% de CSS. O crescimento dessas células foi determinado a cada 3 dias por 15 dias (Fig. 9). Nota-se claramente que o CSS em 5% e 10% foi prejudicial às células, bloqueando o crescimento celular. Esse experimento inicial demonstrou que o tratamento com carvão ativado retira componentes do FBS necessários para o crescimento das células, o que impossibilitou o uso do CSS nas culturas primárias.

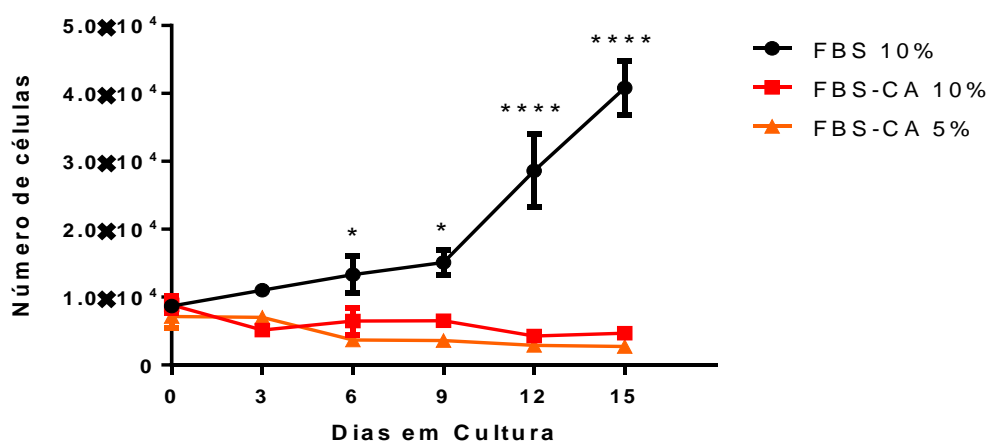


Figura 9 - Crescimento de Células Osteoblásticas Cultivadas em Meio Contendo FBS Tratado com Carvão Ativado (FBS-CA). Células osteoblásticas derivadas da calvária de camundongos selvagens (C57BL/6J) cultivadas em meio α MEM contendo 10% de FBS ou 10% e 5% de FBS-CA. Os valores são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e **** $p < 0.0001$ para FBS 10% vs. FBS-CA 5% e 10%.

Num segundo experimento, testamos o comportamento das células, também quanto ao crescimento celular, frente a meio de cultura contendo diferentes concentrações de FBS (10%, 5% e 2.5%). Em paralelo, testamos, no mesmo experimento, a meia troca de meio de cultura, ou seja, a retirada de

apenas metade do meio de cultura e a adição da mesma quantidade de meio de cultura fresco às células. A meia troca teve como objetivo minimizar a exposição das células ao HT proveniente do FBS e manter fatores de crescimento produzidos pelas próprias células no meio de cultura. Nota-se que o crescimento celular foi bloqueado quando as células foram cultivadas em meio contendo 5% e 2.5% de FBS (Fig. 10), demonstrando que essas células são bastante sensíveis a componentes presentes no FBS.

Esse experimento demonstrou que é necessário manter a concentração de 10% de FBS no meio de cultura para permitir o crescimento celular, o que, então, foi utilizado nos experimentos deste estudo. A meia troca foi bastante satisfatória até o 12º dia da cultura, entretanto, a partir desse ponto, esse procedimento prejudicou o crescimento celular. Assim sendo, nos experimentos seguintes, utilizamos a meia troca até o 9º dia de cultura.

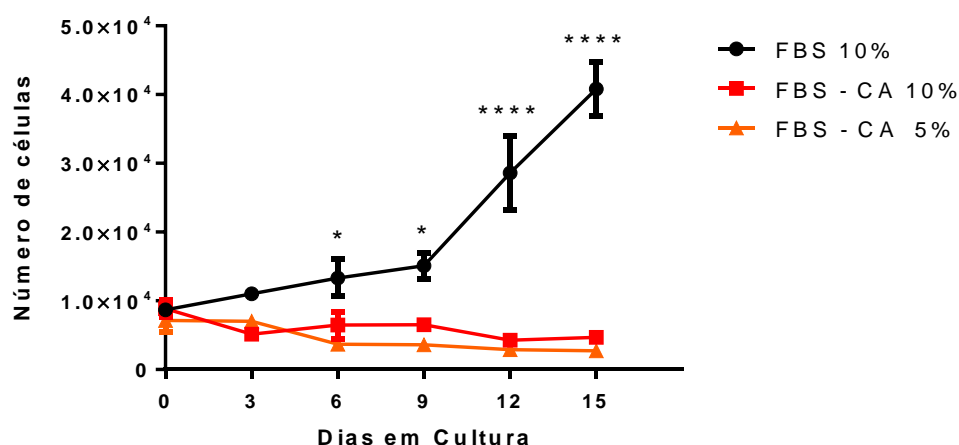


Figura 10 - Crescimento de Células Osteoblásticas Cultivadas em Meio Contendo FBS em Diferentes Concentrações. Células osteoblásticas derivadas da calvária de camundongos selvagens (C57BL/6J) cultivadas em meio α MEM contendo 10%, 5% e 2.5% de FBS. Os valores são expressos como média \pm EPM. +p<0.05 e +++p<0.001 para FBS 10% vs. FBS 10% meia troca; ***p<0.001 e ****p<0.0001 para FBS 10% vs. FBS 5% e FBS 2.5%.

Após a padronização dos meios de cultura, iniciamos o estudo do efeito do T3 e UK (agonista dos adrenocetores α 2), no crescimento de células osteoblásticas derivadas da calvária de camundongos Selv e α 2C-AR^{-/-}. Em uma primeira avaliação, observamos que não há diferença entre os

osteoblastos Selv e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ quanto ao crescimento celular, havendo apenas uma tendência a um menor crescimento nas células KO (Fig.11).

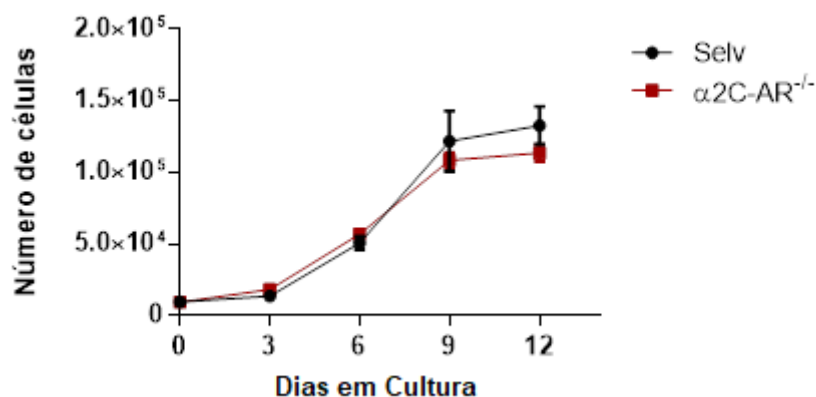


Figura 11 - Efeito da Deleção do $\alpha 2C\text{-AR}$ no Crescimento de Células Osteoblásticas. Células osteoblásticas derivadas da calvária de camundongos selvagens (Selv) e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ foram cultivadas em meio α MEM contendo 10% de FBS. Os valores são expressos como média \pm EPM.

Posteriormente, observamos que o T3 em dose suprafisiológica (10^{-8} M) diminuiu o crescimento celular a partir do 9º dia de tratamento, tanto nas células Selv quanto KO, entretanto, a redução foi mais significativa nas células KO (Fig. 12). Assim como o T3, o UK reduziu o crescimento celular nas células de animais Selv a partir do 9º dia de tratamento, porém, o efeito do UK foi significativamente maior do que o do T3 no 12º dia de tratamento. Nota-se, ainda, que o T3 não modificou o efeito do UK, e vice-versa, quanto ao crescimento das células de animais Selv (Fig. 12A). As células $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ se mostraram mais sensíveis ao efeito negativo do UK sobre o crescimento celular, sendo que o UK reduziu o crescimento celular significativamente já a partir do 6º dia de tratamento nas células KO (Fig. 12B), sugerindo que a ativação do $\alpha 2A\text{-AR}$ e/ou $\alpha 2B\text{-AR}$ é importante para esse efeito.

Observa-se, também, que o T3 intensificou o efeito negativo do UK, e vice-versa, sobre o crescimento das células de animais $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ no 9º e 12º dias de tratamento, sugerindo um *crossstalk* entre a via de sinalização do $\alpha 2A\text{-AR}$ e/ou $\alpha 2B\text{-AR}$ com a via de sinalização do T3.

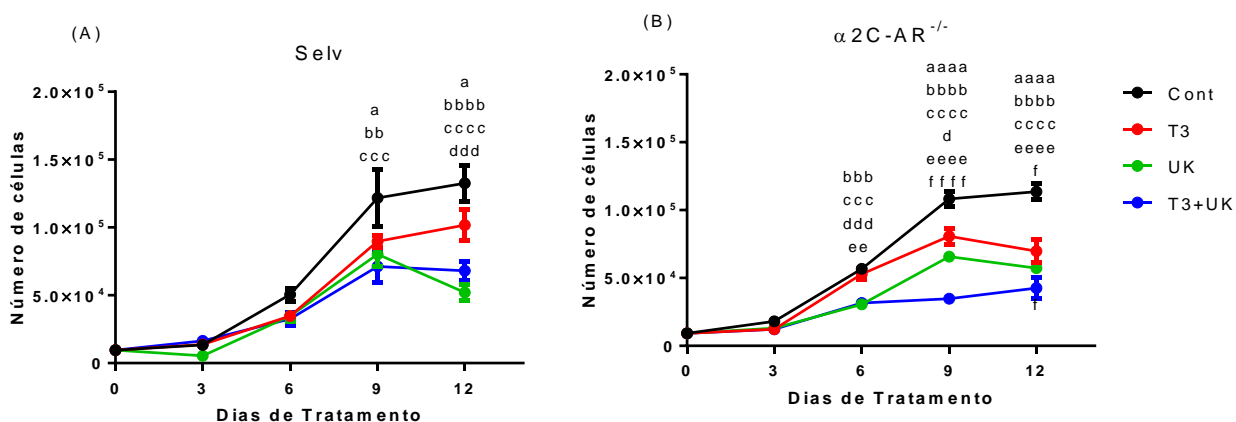


Figura 12 - Efeito do Tratamento com T3 e UK no Crescimento Celular em Culturas Primárias de Osteoblastos. (A e B) Número de células em culturas primárias de osteoblastos derivados da calvária de camundongos selvagens (Selv) e $\alpha 2C-AR^{-/-}$ tratadas com T3 (10^{-8} M) e/ou UK (10^{-5} M). Os valores são expressos como média \pm EPM. a=Cont vs. T3; b=Cont vs. UK; c=Cont vs. T3+UK; d=T3 vs. UK; e=T3 vs. T3+UK; f=UK vs. T3+UK. As significâncias para 1, 2, 3 ou 4 letras são $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ e $p < 0.0001$, respectivamente.

Como parâmetro de diferenciação osteoblástica (Fig.13), analisamos a formação de nódulos de mineralização nas culturas primárias de osteoblastos provenientes da calvária de animais selvagens (Fig. 13A) e $\alpha 2C-AR^{-/-}$ (Fig. 13B) que estão expostas através de imagens realizadas diretamente das placas de petri na qual foram feitas as culturas e colorações.

Através destas imagens, qualitativamente, podemos observar que o T3 teve um efeito positivo na formação de nódulos de mineralização no 21º dia de tratamento, tanto nas células provenientes de animais Selv quanto KO. É possível observar, ainda, que o tratamento com UK limitou a formação dos nódulos de mineralização e que o UK bloqueou o efeito positivo do T3 (T3+UK) neste parâmetro nas células Selv e $\alpha 2C-AR^{-/-}$. Além disso, nota-se que a formação de nódulos de mineralização foi maior nas culturas provenientes das calvárias de animais KO em relação àquelas provenientes de animais selvagens, em todas as condições de tratamento, sugerindo um efeito inibitório do $\alpha 2C-AR$ na diferenciação osteoblástica.

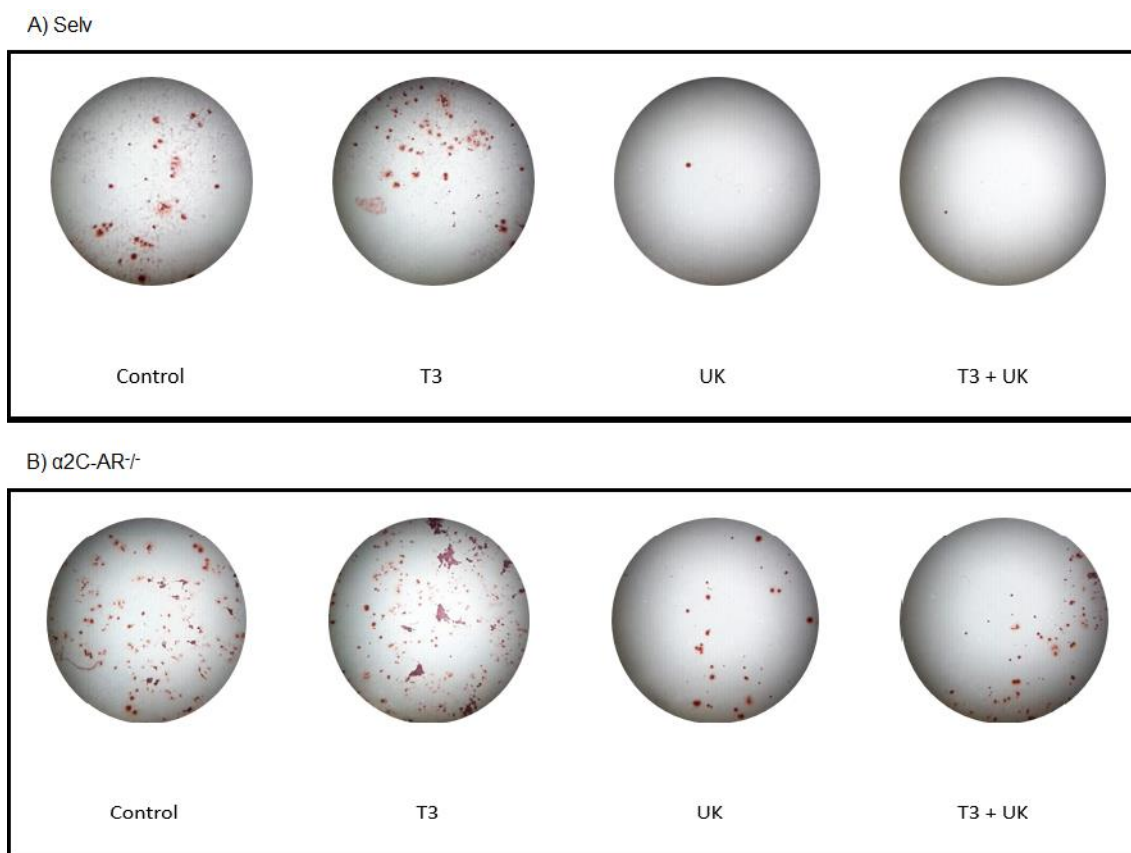


Figura 13 – Imagem Representativa do Efeito Apresentado pelo Tratamento com T3 e UK na Formação de Nódulos de Mineralização em Culturas Primárias de Osteoblastos derivados da Calvária de Camundongos.

A avaliação quantitativa das culturas de células $\alpha 2C-AR^{-/-}$ confirmou: (i) o efeito positivo do T3 sobre a formação dos nódulos de mineralização, (ii) o efeito negativo do UK sobre a formação dos nódulos, e (iii), finalmente, a ação bloqueadora do UK sobre a indução da formação dos nódulos de mineralização pelo T3 (Fig. 14)

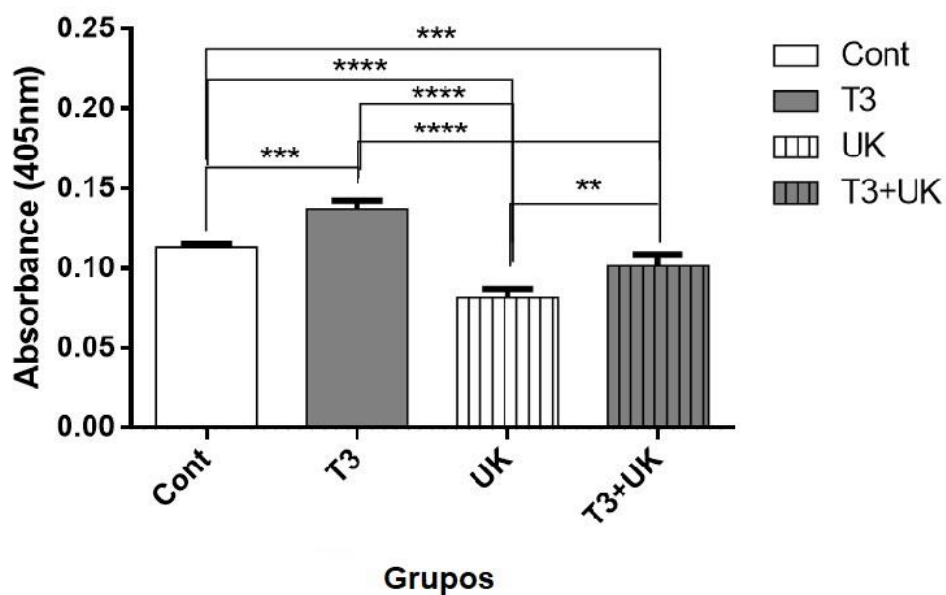


Figura 14 – Quantificação do Efeito do Tratamento com T3 e UK na Formação de Nódulos de Mineralização em Culturas Primárias de Osteoblastos derivados da Calvária de Camundongos. Quantificação da mineralização nas culturas de células $\alpha 2C-AR^{-/-}$, determinando-se a densidade óptica (absorbância) das amostras por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda de 405 nm. Os valores são expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Em seguida, avaliamos a expressão gênica da Ocn nas culturas primárias de osteoblastos provenientes da calvária de camundongos Selv e KO (Fig.15). Nas células Selv (Fig.15A), o T3 em dose suprafisiológica (10^{-8} M) promoveu um aumento significativo na expressão da Ocn no 9º e 15º dia de tratamento, aproximadamente 26x e 117x, respectivamente, em relação ao dia 0. Por outro lado, o UK bloqueou significativamente o aumento da expressão gênica da Ocn observado nas células controles no 15º dia de cultura. A partir do 9º dia, é possível observar que o UK também limitou o efeito positivo do T3 (T3+UK) sobre a expressão gênica da Ocn. Nas células de animais $\alpha 2C-AR^{-/-}$ (Fig.15B), observamos que o tratamento com T3 causou um aumento significativo na expressão da Ocn apenas no 15º dia, 35x em relação ao dia 0. O tratamento combinado das células KO (T3+UK) mostrou que o UK também limitou significativamente o efeito positivo do T3 sobre a expressão de Ocn.

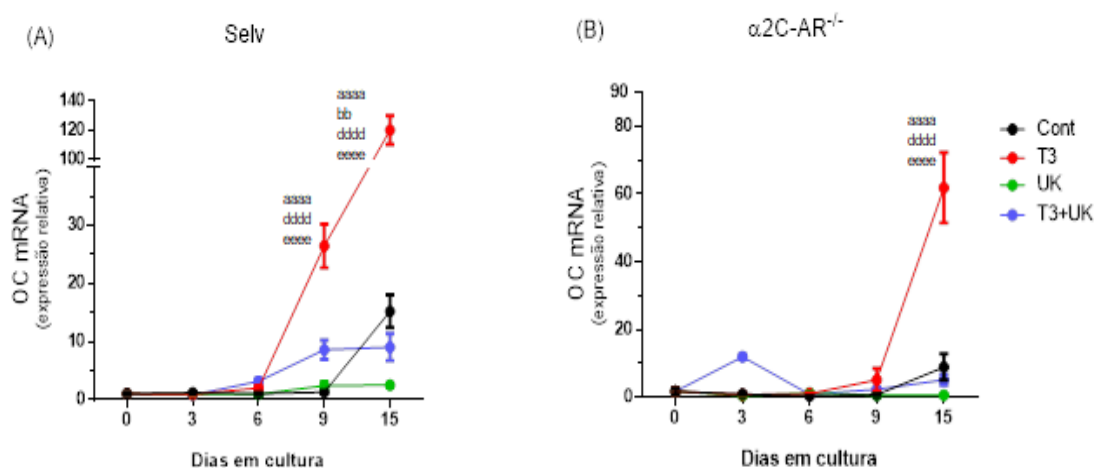
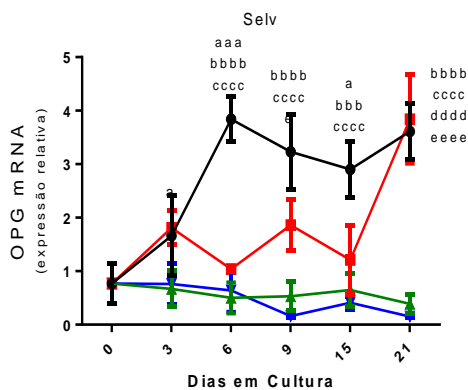


Figura 15 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteocalcina (Ocn) em Cultura Primária de Osteoblasto. Culturas primárias de osteoblastos derivados da calvária de camundongos selvagens (Selv) e $\alpha 2C-AR^{-/-}$ tratadas com T3 (10^{-8} M) e/ou UK (10^{-5} M). (A e B) Expressão gênica relativa da Ocn determinada por PCR em tempo real. O grupo controle (Cont) refere-se a células sem tratamento. Os valores são expressos como média \pm EPM. a=Cont vs. T3; b=Cont vs. UK; c=Cont vs. T3+UK; d=T3 vs. UK; e=T3 vs. T3+UK; f=UK vs. T3+UK. As significâncias para 1, 2, 3 ou 4 letras são $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ e $p < 0.0001$, respectivamente.

Também foi avaliada a expressão da OPG nas culturas primárias de osteoblastos provenientes da calvária de camundongos Selv e $\alpha 2C-AR^{-/-}$ (Fig.16). Nas culturas derivadas de animais Selv (Fig.16A), as células controle apresentaram um aumento gradativo na expressão da OPG ao longo dos dias em cultura. O tratamento com dose suprafisiológica de T3 (10^{-8} M) limitou significativamente o aumento da expressão da OPG do 6º ao 15º dia de cultura. Entretanto, no 21º dia de tratamento, a expressão da OPG nas células controle e tratadas com T3 se iguala, revelando um efeito limitante, mas transitório do T3 sobre a expressão do Ocn. O UK bloqueou completamente o aumento da expressão da OPG ao longo dos dias em cultura. O tratamento simultâneo do T3 com o UK (T3+UK) mostrou que o T3 não alterou (intensificou ou minimizou) o efeito inibitório do UK sobre a expressão gênica da OPG. Nas células $\alpha 2C-AR^{-/-}$ (Fig.16B), observamos que o tratamento com T3 também gerou uma limitação significativa e transitória na expressão de OPG, que ocorreu já no 3º dia de tratamento (enquanto que nas células Selv,

ocorreu a partir do 6º dia de tratamento) e permaneceu até o 9º dia de tratamento. Assim como nas células Selv, o tratamento com UK bloqueou completamente o aumento da expressão da OPG ao longo dos dias de cultivo celular. Não houve diferença entre os efeitos do tratamento com UK e T3+UK na expressão da OPG.

(A)



(B)

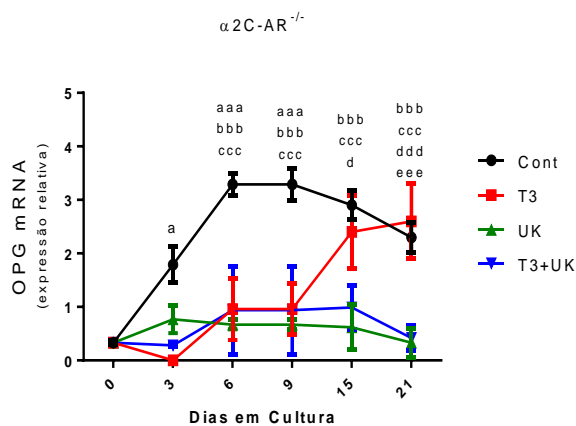


Figura 16 - Efeito do Tratamento com T3 e UK na Expressão Gênica da Osteoprotegerina (OPG) em Cultura Primária de Osteoblasto. Culturas primárias de osteoblastos derivados da calvária de camundongos selvagens (Selv) e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ tratadas com T3 (10^{-8} M) e/ou UK (10^{-5} M). O grupo controle (Cont) refere-se a células sem tratamento. (A e B) Expressão gênica relativa da OPG determinada por PCR em tempo real. Os valores são expressos como média \pm EPM. a=Cont vs. T3; b=Cont vs. UK; c=Cont vs. T3+UK; d=T3 vs. UK; e=T3 vs. T3+UK; f=UK vs. T3+UK. As significâncias para 1, 2, 3 ou 4 letras são $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ e $p < 0.0001$, respectivamente.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que animais com duplo KO do $\alpha 2A$ -AR e $\alpha 2C$ -AR (camundongos $\alpha 2A/\alpha 2C$ -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo generalizado de alta massa óssea, apesar de apresentarem níveis plasmáticos elevados de noradrenalina e sinalização $\beta 2$ adrenérgica [41]. Esse mesmo trabalho demonstrou a presença das diferentes isoformas de $\alpha 2$ -AR em osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e condrócitos de camundongos [41]. Em conjunto, esses achados sugerem que não somente os receptores $\beta 2$ adrenérgicos estão envolvidos no efeito deletério da ativação simpática no esqueleto, mas que as isoformas $\alpha 2$ -AR também podem estar envolvidas nesse processo.

Em outro estudo, observamos que camundongos com deleção isolada do $\alpha 2C$ -AR ($\alpha 2C$ -AR^{-/-}) apresentam um fenótipo ósseo heterogêneo, com redução da massa óssea no fêmur e aumento na coluna vertebral, em relação a camundongos selvagens. Esse achado reforça a hipótese de que o SNS regula a estrutura e a fisiologia ósseas, via receptores $\alpha 2$ -AR, além de sugerir que as ações do SNS no esqueleto são sítio dependentes, ou seja, tem ações diferentes em diferentes locais [38]. Por outro lado, vimos que o fenótipo esquelético de camundongos com deleção isolada do adrenoceptor $\alpha 2A$ ($\alpha 2A$ -AR^{-/-}) é praticamente normal, sugerindo que o $\alpha 2A$ -AR não medeia ações do SNS no esqueleto, ou que possíveis ações desse receptor possam ser compensadas pelo $\alpha 2B$ -AR e/ou $\alpha 2C$ -AR, ou por outros adrenoceptores [54].

Além disso, observamos que os camundongos $\alpha 2A/2C$ -AR^{-/-} e $\alpha 2C$ -AR^{-/-} apresentam certa resistência à osteopenia induzida pela tireotoxicose (tanto no fêmur quanto na coluna vertebral), fortalecendo a hipótese de que o HT interage com o SNS para regular a morfofisiologia óssea [53, 72]. Esses achados sugerem, ainda, que essa interação entre o HT e SNS envolve a sinalização $\alpha 2$ adrenérgica. Por outro lado, vimos também que camundongos com deleção isolada do $\alpha 2A$ -AR apresentam maior sensibilidade aos efeitos osteopênicos da tireotoxicose no osso trabecular, enquanto que o osso cortical mostrou-se resistente aos efeitos negativos do excesso de HT [54]. Essa maior sensibilidade do osso trabecular aos efeitos deletérios da tireotoxicose

contrastam com a menor sensibilidade observada nos camundongos $\alpha 2A/\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ [72] e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ [53], o que sugere a participação da sinalização $\alpha 2C\text{-AR}$ no mecanismo de ação através do qual o HT promove os seus efeitos osteopênicos no osso trabecular. Por outro lado, algum grau de resistência à tireotoxicose foi observado no osso cortical dos camundongos $\alpha 2A/\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ [72], $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$ [53] e $\alpha 2A\text{-AR}^{-/-}$ [54], indicando que a sinalização dos adrenoceptores $\alpha 2A$ e $\alpha 2C$ contribuem para ações do HT no osso cortical.

Apesar dessas evidências sugerirem um *cross-talk* entre o hormônio tireoideano e os receptores $\alpha 2$ adrenérgicos nos mecanismos através do qual a tireotoxicose promove os seus efeitos deletérios no tecido ósseo, não se sabe se essa interação ocorre centralmente (SNC) ou localmente no tecido ósseo. Havendo, ainda, a possibilidade dessa interação ocorrer e/ou afetar outros órgãos ou tecidos, cujas alterações possam influenciar o tecido ósseo, caracterizando um efeito sistêmico e indireto.

No presente estudo, tivemos como objetivo investigar a hipótese de que a interação entre o HT e sinalização $\alpha 2$ adrenérgica ocorre localmente no tecido ósseo e, mais especificamente, nos osteoblastos. Para tanto, realizamos experimentos *in vitro*, utilizando culturas de órgãos, ou seja, fêmures e tíbias provenientes de camundongos Selv e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$. Em paralelo, realizamos experimentos com culturas primárias de osteoblastos derivados da calvária de neonatos Selv e $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$. As culturas de órgãos e células foram tratadas com UK (10^{-5} M), um agonista $\alpha 2$ adrenérgico; com dose suprafisiológica de T3 (10^{-8} M); ou com a combinação de ambos (T3+UK).

O UK (UK-14,304) é um potente agonista dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos [77-79] e possui vantagem se comparado à clonidina, um conhecido agonista $\alpha 2$ adrenérgico. Enquanto o UK é específico para os receptores $\alpha 2$ adrenérgicos, a clonidina é um agonista parcial dos adrenoceptores $\alpha 2$, uma vez que tem alguma afinidade pelos adrenoceptores $\alpha 1$ e pelos receptores de imidazolina (IR), que são, portanto, receptores não adrenérgicos. Os IRs são sítios de ligação da imidazolina ou de estruturas químicas de oxazolina. A estimulação desses receptores medeia ações centrais hipotensivas e anti-arrítmicas do coração. Assim sendo, alguns efeitos da clonidina são mediados pelos IR e não pelos receptores $\alpha 2$ [80].

No presente estudo, os experimentos com cultura de órgãos (fêmur e tibia) mostraram que o tratamento com T3 promoveu aumentos expressivos na expressão gênica da Ocn, tanto nas culturas provenientes de animais Selv quanto de animais KO. A Ocn é a proteína não colágena mais abundante da matriz óssea, sendo sintetizada e secretada por osteoblastos maduros durante a fase de formação óssea no processo de remodelamento ósseo. Parte da Ocn produzida pelos osteoblastos não é incorporada à matriz óssea e atinge a corrente sanguínea, onde pode ser quantificada e utilizada como um marcador bioquímico de formação óssea [81, 82]. Apesar da sua abundância na MEC do tecido ósseo, as funções da Ocn ainda não são claras. Ducy et al [83] observaram que camundongos com KO da Ocn ($Ocn^{-/-}$) apresentam um fenótipo de alta massa óssea, o que sugere que ela atue como inibidora da formação óssea. Entretanto, este dado não foi reproduzido por outros [84, 85]. Estudos do grupo do Dr. Karsenty demonstraram que a Ocn seria um hormônio que regula a secreção de insulina pelo pâncreas, a síntese de testosterona pelos testículos e a massa muscular [86-88]. Entretanto, esses achados também não foram reproduzidos em outros estudos [84, 85, 89]. Mais recentemente, viu-se que a Ocn regula a qualidade óssea ao alinhar os cristais de hidroxiapatita paralelamente às fibras de colágeno, o que contribui para a resistência óssea dos ossos longos ao estresse mecânico [85, 90]. Independentemente da função da Ocn, sabe-se que o HT estimula a sua expressão, tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional [91-93]. Assim sendo, o efeito positivo do T3 sobre a expressão gênica da Ocn nas culturas de órgãos corrobora estudos anteriores. Um achado bastante interessante foi o de que a ativação dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos pelo UK bloqueou o efeito positivo do T3 sobre a expressão da Ocn, tanto nas culturas Selv quanto KO, sugerindo que há um *crosstalk* entre a via de sinalização dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos com a via de sinalização do T3 localmente no osso. O fato do UK bloquear o efeito positivo da Ocn também nas culturas $\alpha 2C-AR^{-/-}$ sugere que a ativação do $\alpha 2A-AR$ e/ou $\alpha 2B-AR$ mediarão esse processo.

Nós também avaliamos expressão gênica da OPG, que é um potente agente anti-osteoclastogênico [94]. A OPG compõe, juntamente com o RANK (*receptor activator of nuclear factor-kappa B*) e o seu ligante RANKL, o eixo

RANK/RANKL/OPG. Essas três proteínas são importantes fatores de acoplamento entre osteoblastos e osteoclastos. O RANKL é sintetizado por várias células, incluindo células da medula óssea e células da linhagem osteoblástica (osteoblastos, células de superfície e osteócitos). A interação do RANKL com o seu receptor, o RANK, presente na membrana das células precursoras de osteoclastos e nos osteoclastos maduros, induz, respectivamente, a osteoclastogênese e a atividade osteoclástica, o que resulta em aumento da reabsorção óssea [94, 95]. A OPG, também sintetizada pelas células da linhagem osteoblástica, é um receptor solúvel do RANKL. A ligação da OPG ao RANKL diminui a disponibilidade deste último para interagir com o RANK e, dessa forma, inibe a reabsorção óssea, pois limita a osteoclastogênese e atividade osteoclástica [94, 96]. Os dados do presente estudo mostraram que o T3 tendeu a reduzir a expressão da OPG nas culturas de órgãos dos animais Selv, enquanto que o T3 reduziu significativamente (em aproximadamente 60%) a expressão da OPG nas culturas provenientes dos animais KO. Esses achados parcialmente corroboram um estudo in vivo do nosso grupo, onde vimos que doses suprafisiológicas de T3 reduziram a expressão gênica de OPG no fêmur de animais selvagens [38]. Entretanto, nesse mesmo estudo in vivo, vimos que o T3 não foi capaz de reduzir a expressão da OPG no fêmur de camundongos com duplo KO do $\alpha 2A$ -AR e $\alpha 2C$ -AR, os camundongos $\alpha 2A/\alpha 2C$ -AR^{-/-}, os quais mostraram-se resistentes à osteopenia induzida pela tireotoxicose [38]. Em outro estudo in vivo, observamos que doses suprafisiológicas de T3 por 30 dias reduziram a OPG no fêmur de camundongos Selv, mas não no fêmur de camundongos $\alpha 2C$ -AR^{-/-}. Entretanto, após 90 dias de tratamento, o T3 reduziu a OPG nos animais Selv e $\alpha 2C$ -AR^{-/-}.

No presente estudo, observamos, ainda, que o UK reduziu significativamente a expressão da OPG nas culturas de órgãos Selv e $\alpha 2C$ -AR^{-/-}, e que esse efeito foi mais importante nas culturas KO, sugerindo a participação do $\alpha 2A$ -AR e/ou $\alpha 2B$ -AR nesse processo. Além disso, vimos que houve um efeito aditivo do UK e T3 quanto à inibição da OPG. Em conjunto, esses achados sugerem que a tireotoxicose e a estimulação do SNS podem promover aumento de reabsorção óssea através da inibição da expressão da

OPG. Nas culturas primárias de osteoblastos, observamos que o tratamento com T3 em dose suprafisiológica (10^{-8} M) diminuiu o crescimento celular nas culturas provenientes de camundongos Selv, o que corrobora estudos *in vitro* anteriores que demonstraram que o T3 diminui a proliferação osteoblástica, ao mesmo tempo em que promove a diferenciação dessas células [19, 20, 97]. Este efeito também foi observado nas células KO, porém de maneira mais intensa do que nas células Selv. O UK também diminuiu o crescimento celular nas culturas Selv e KO, entretanto, o seu efeito também foi mais potente nas células $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$. Esses achados sugerem que não só o $\alpha 2C\text{-AR}$, mas que também o $\alpha 2A\text{-AR}$ e/ou $\alpha 2B\text{-AR}$ medeiam o efeito negativo do UK no crescimento celular. Além disso, o efeito inibitório do UK sobre o crescimento celular foi mais importante do que o do T3, especialmente nas culturas $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$, que sugere que a ação local do SNS seja relevante e mediada por receptores $\alpha 2$.

Vimos, ainda, que o T3 intensificou o efeito negativo do UK e vice-versa nas células $\alpha 2C\text{-AR}^{-/-}$, o que sugere, mais uma vez, um *crosstalk* local entre a via de sinalização do $\alpha 2A\text{-AR}$ e/ou $\alpha 2B\text{-AR}$ com a via de sinalização do T3. A ação negativa do UK, limitando o crescimento osteoblástico, em ambas as linhagens sugere que a ativação da via de sinalização $\alpha 2\text{-AR}$ é anti-anabólica. Esses achados vão de encontro com o estudo de Limonard et al. [98], que demonstra que a clonidina (agonista $\alpha 2$ adrenérgico) causa um desbalanço ósseo em humanos, com predomínio da reabsorção óssea.

A diferenciação osteoblástica é um processo biológico complexo e fundamental. A medida em que os osteoblastos se diferenciam, eles sintetizam a matriz óssea e comandam a sua mineralização. Esse processo pode ser observado em culturas de células da linhagem osteoblástica, cultivadas em meio de diferenciação celular (com ácido ascórbico e β -glicerolfosfato), através da identificação de nódulos de mineralização por coloração com vermelho de alizarina [76, 93, 99]. A avaliação qualitativa e quantitativa desses nódulos em células de animais KO mostrou um efeito positivo do T3 na formação dos nódulos de mineralização no 21º dia de cultura (e tratamento), o que corrobora estudos anteriores que mostram que o HT promove a diferenciação osteoblástica [93, 100, 101]. Por outro lado, o tratamento com UK inibiu a

formação dos nódulos de mineralização. Além disso, o UK visivelmente bloqueou o efeito positivo do T3 na formação dos nódulos de mineralização e, portanto, na diferenciação osteoblástica. Esses achados evidenciam que há uma interação local nos osteoblastos, entre o T3 e a via de sinalização dos adrenoceptores α_2 para regular a diferenciação dos osteoblastos.

Nas culturas primárias de osteoblastos, o efeito do T3 e UK sobre a expressão da Ocn praticamente reproduziu o que foi observado nas culturas de órgãos. Assim sendo, o T3 estimulou a expressão da Ocn, enquanto que o UK bloqueou esse efeito positivo do T3. Esse achado reforça a hipótese de que há um *crosstalk* entre o T3 e a via de sinalização α_2 -AR para regular a diferenciação osteoblástica.

A análise da expressão gênica da OPG nas culturas primárias de osteoblastos também praticamente reproduziu o que foi observado nas culturas de órgãos. Ou seja, o tratamento com T3 ou UK reduziu a expressão da OPG nas células Selv e UK, reforçando a hipótese de que a tireotoxicose e a estimulação do SNS podem promover aumento de reabsorção óssea através da inibição da expressão da OPG.

Em sumário, vimos que a ativação dos receptores α_2 adrenérgicos pelo UK inibe o crescimento das células osteoblásticas de maneira mais importante do que o T3, inibe a formação de nódulos de mineralização, reduz a expressão de OPG e bloqueia o efeito positivo do T3 sobre a expressão da Ocn e sobre a formação dos nódulos de mineralização. Com esses achados, podemos concluir que o SNS tem ações diretas e osteopênicas no tecido ósseo e, mais especificamente, nos osteoblastos, mediadas por receptores α_2 adrenérgicos. Além disso, esses achados fortalecem a hipótese de que há um *crosstalk* entre a via de sinalização dos receptores α_2 adrenérgicos com a via de sinalização do T3 localmente em osteoblastos para regular o crescimento e diferenciação osteoblástica.

7. REFERÊNCIAS

1. Liu, Y., D. Luo, and T. Wang, *Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering*. Small, 2016. **12**(34): p. 4611-32.
2. Fukumoto, S. and T.J. Martin, *Bone as an endocrine organ*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(5): p. 230-6.
3. Kim, J.M., et al., *Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis*. Cells, 2020. **9**(9).
4. Clarke, B., *Normal bone anatomy and physiology*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(3): p. 131-9.
5. Li, W., et al., *Vitamin K2 stimulates MC3T3E1 osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction*. Mol Med Rep, 2019. **19**(5): p. 3676-3684.
6. Salhotra, A., et al., *Mechanisms of bone development and repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(11): p. 696-711.
7. Guyton, *Tratado de Fisiologia Médica*. 12 ed. 2011, São Paulo Elsevier Editora Ltda.
8. Burger, E.H., J.W. van der Meer, and P.J. Nijweide, *Osteoclast formation from mononuclear phagocytes: role of bone-forming cells*. J Cell Biol, 1984. **99**(6): p. 1901-6.
9. 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.
10. Freedman, L.P., *Anatomy of the steroid receptor zinc finger region*. Endocr Rev, 1992. **13**(2): p. 129-45.
11. Katz, D. and M.A. Lazar, *Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 20904-10.
12. Waung, J.A., J.H. Bassett, and G.R. Williams, *Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(4): p. 155-62.
13. 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.
14. Lademann, F., et al., *Thyroid Hormone Actions and Bone Remodeling - The Role of the Wnt Signaling Pathway*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2020. **128**(6-07): p. 450-454.
15. Wells, D., et al., *Review of slipped capital femoral epiphysis associated with endocrine disease*. J Pediatr Orthop, 1993. **13**(5): p. 610-4.
16. Ross, D.S., *Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone*. Thyroid, 1994. **4**(3): p. 319-26.
17. Mosekilde, L., E.F. Eriksen, and P. Charles, *Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1990. **19**(1): p. 35-63.
18. Williams, G.R., *Actions of thyroid hormones in bone*. Endokrynol Pol, 2009. **60**(5): p. 380-8.
19. Varga, F., et al., *Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression*. Calcif Tissue Int, 1997. **61**(5): p. 404-11.
20. 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.
21. Abu, E.O., et al., *The expression of thyroid hormone receptors in human bone*. Bone, 1997. **21**(2): p. 137-42.

22. Williams, G.R., R. Bland, and M.C. Sheppard, *Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling*. *Endocrinology*, 1994. **135**(6): p. 2375-85.
23. 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.
24. Stevens, D.A., et al., *Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(9): p. 1751-66.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Allain, T.J., et al., *Tri-iodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect*. *J Endocrinol*, 1992. **133**(3): p. 327-31.
29. Bakker, A.D. and J. Klein-Nulend, *Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones*. *Methods Mol Biol*, 2012. **816**: p. 19-29.
30. Mundy, G.R., et al., *Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones*. *J Clin Invest*, 1976. **58**(3): p. 529-34.
31. Miura, M., et al., *A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)(2)D(3) in osteoclast formation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **291**(4): p. 987-94.
32. Wehrwein, E.A., H.S. Orer, and S.M. Barman, *Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System*. *Compr Physiol*, 2016. **6**(3): p. 1239-78.
33. AB, M., *Neuroanatomia Funcional*. 2 ed. 1993, Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan.
34. Farley A, J.C., Hendry C, McLafferty E., *Nervous system: part 1*. *Nurs Stand*, 2014. **28**: p. 46-51.
35. Pongratz G, S.R., *The sympathetic nervous response in inflammation*. *Arthritis Res Ther*, 2014. **16**(6): p. 504.
36. Ondicova K, M.B., *Multilevel interactions between the sympathetic and parasympathetic nervous systems: a minireview*. *Endocr Regul*, 2010. **44**(2): p. 69-75.
37. 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.
38. 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.
39. Ruffolo, R.R., Jr., et al., *Preclinical and clinical pharmacology of carvedilol*. *J Hum Hypertens*, 1993. **7 Suppl 1**: p. S2-15.
40. Lahdesmaki, J., et al., *Alpha2A-adrenoceptors are important modulators of the effects of D-amphetamine on startle reactivity and brain monoamines*. *Neuropsychopharmacology*, 2004. **29**(7): p. 1282-93.
41. 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.
42. 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.

43. Villicev, C.M., et al., *Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats*. J Endocrinol, 2007. **193**(1): p. 21-9.
44. Hein L, A.J., Kobilka BK, *Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission*. Naure, 1999. **402**(6758): p. 181-4.
45. 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.
46. Takeda, S., et al., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system*. Cell, 2002. **111**(3): p. 305-17.
47. Elefteriou, F., et al., *Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 514-20.
48. Ducy, P., et al., *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass*. Cell, 2000. **100**(2): p. 197-207.
49. 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.
50. Cavalie, H., et al., *Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats*. J Appl Physiol (1985), 2002. **93**(6): p. 2034-7.
51. Brede M, N.G., Philipp M, Sorensen JB, Lohse MJ, Hein L., *Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor subtypes*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(8): p. 1640-6.
52. Elefteriou, F., P. Campbell, and Y. Ma, *Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system*. Calcif Tissue Int, 2014. **94**(1): p. 140-51.
53. 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.
54. Martins, G.M., et al., *Global Disruption of alpha2A Adrenoceptor Barely Affects Bone Tissue but Minimizes the Detrimental Effects of Thyrotoxicosis on Cortical Bone*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 486.
55. Silva JE, B.S., *Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications*. Thyroid, 2008. **18**(2): p. 157-65.
56. Giannocco G, K.M., Maciel RM, de Souza JS, *Thyroid hormone, gene expression, and Central Nervous System: Where we are*. Semin Cell Dev Biol, 2021. **114**: p. 47-56.
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. Bayliss RI, E.O., *Urinary excretion of free catecholamines in Graves' disease*. J Endocrinol, 1971. **49**(1): p. 167-73.
59. Coulombe P, D.J., Walker P, *Plasma catecholamine concentrations in hyperthyroidism and hypothyroidism*. Metabolism, 1976. **25**(9): p. 973-9.
60. Karlberg BE, H.K., Andersson RG, *Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration in plasma, adipose tissue and skeletal muscle in normal subjects and in patients with hyper- and hypothyroidism*. J Clin Endocrinol Metab, 1974. **39**(1): p. 96-101.
61. Guttler RB, C.M., DeQuattro VL, Warren DW, Otis CL, Nicoloff JT, *Effects of thyroid hormone on plasma adenosine 3',5'-monophosphate production in man*. Metabolism, 1977. **26**(10): p. 1155-62.
62. Carvalho-Bianco, S.D., et al., *Chronic cardiac-specific thyrotoxicosis increases myocardial beta-adrenergic responsiveness*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(7): p. 1840-9.
63. Bumgarner JR, R.V., Stiles GL, *Altered thyroid status regulates the adipocyte A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system*. Life Sci, 1989. **44**(22): p. 1705-12.
64. Sundin U, M.I., Fain JN, *Thyroid-catecholamine interactions in isolated rat brown adipocytes*. Metabolism, 1984. **33**(11): p. 1028-33.

65. Pracyk JB, S.T., *Thyroid hormone regulates ontogeny of beta adrenergic receptors and adenylate cyclase in rat heart and kidney: effects of propylthiouracil-induced perinatal hypothyroidism*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **261**(3): p. 951-8.
66. Ojamaa K, K.I., Sabet A, Steinberg SF, *Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness*. Metabolism, 2000. **49**(2): p. 275-9.
67. Michel-Reher MB, G.G., Jasper JR, Bernstein D, Olbricht T, Brodde OE, Michel MC, *Tissue- and subunit-specific regulation of G-protein expression by hypo- and hyperthyroidism*. Biochem Pharmacol, 1993. **45**(7): p. 1417-23.
68. Orford MR, L.F., Milligan G, Saggerson ED, *Treatment with triiodothyronine decreases the abundance of the alpha-subunits of Gi1 and Gi2 in the cerebral corte*. J Neurol Sci, 1992. **112**(1-2): p. 34-7.
69. Levine MA, F.A., Robishaw JD, Ladenson PW, Ahn TG, Moroney JF, Smallwood PM, *Influence of thyroid hormone status on expression of genes encoding G protein subunits in the rat heart*. J Biol Chem, 1990. **265**(6): p. 3553-60.
70. Goswami A, R.I., *Effects of thyroid status on membrane-bound low Km cyclic nucleotide phosphodiesterase activities in rat adipocytes*. J Biol Chem, 1985. **260**(1): p. 82-5.
71. Neofiti-Papi, B., et al., *Thyrotoxicosis Involves beta2-Adrenoceptor Signaling to Negatively Affect Microarchitecture and Biomechanical Properties of the Femur*. Thyroid, 2019. **29**(8): p. 1060-1072.
72. 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.
73. Stanton, L.A., J.R. Li, and F. Beier, *PPARgamma2 expression in growth plate chondrocytes is regulated by p38 and GSK-3*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(1-2): p. 242-56.
74. Mullah, B., et al., *Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(4): p. 1026-31.
75. Zhong, Z.A., N.J. Ethen, and B.O. Williams, *Use of Primary Calvarial Osteoblasts to Evaluate the Function of Wnt Signaling in Osteogenesis*. Methods Mol Biol, 2016. **1481**: p. 119-25.
76. 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.
77. Cambridge, D., *UK-14,304, a potent and selective alpha2-agonist for the characterisation of alpha-adrenoceptor subtypes*. Eur J Pharmacol, 1981. **72**(4): p. 413-5.
78. Bayorh, M.A., E. Ogbolu, and R.R. Socci, *Cardiovascular effects of oxymetazoline and UK14,304 in conscious and pithed rats*. Clin Exp Hypertens, 1997. **19**(4): p. 445-60.
79. Browning, K.N. and R.A. Travagli, *Neuropeptide Y and peptide YY inhibit excitatory synaptic transmission in the rat dorsal motor nucleus of the vagus*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 3): p. 775-85.
80. Khan, Z.P., C.N. Ferguson, and R.M. Jones, *alpha-2 and imidazoline receptor agonists. Their pharmacology and therapeutic role*. Anaesthesia, 1999. **54**(2): p. 146-65.
81. Hauschka, P.V., et al., *Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone*. Physiol Rev, 1989. **69**(3): p. 990-1047.
82. Mizokami, A., T. Kawakubo-Yasukochi, and M. Hirata, *Osteocalcin and its endocrine functions*. Biochem Pharmacol, 2017. **132**: p. 1-8.
83. Ducy P, D.C., Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G, *Increased bone formation in osteocalcin-deficient*

- mice*. Nature, 1996. **382**(6590): p. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.
84. Diegel CR, H.S., Ayturk UM, Hu JCW, Lim KE, Droscha CJ, Madaj ZB, Foxa GE, Izaguirre I, Transgenics Core VVA, Paracha N, Pidhaynyy B, Dowd TL, Robling AG, Warman ML, Williams BO, *An osteocalcin-deficient mouse strain without endocrine abnormalities*. PLoS Genet, 2020. **16**(5).
 85. Moriishi T, O.R., Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, Liu W, Fukuyama R, Wang Y, Komori H, Qin X, Amizuka N, Komori T, *Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass*. PLoS Genet, 2020. **16**(5).
 86. Mera P, L.K., Wei J, Berger JM, Karsenty G, *Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice*. Mol Metab, 2017. **6**(8): p. 941.
 87. Lee NK, S.H., Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G, *Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton*. Cell, 2007. **130**(3): p. 456-69.
 88. Oury F, S.G., Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, Hermo L, Suarez S, Roth BL, Ducy P, Karsenty G, *Endocrine regulation of male fertility by the skeleton*. Cell, 2011. **144**(5): p. 796-809.
 89. Lambert LJ, C.A., Niu A, Zhou L, Tucholski J, Johnson MS, Nagy TR, Eberhardt AW, Estep PN, Kesterson RA, Grams JM, *Increased trabecular bone and improved biomechanics in an osteocalcin-null rat model created by CRISPR/Cas9 technology*. Dis Model Mech, 2016. **9**(10): p. 1169-1179.
 90. Komori, T., *Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20): p. 7513.
 91. Gouveia, C.H., et al., *Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms*. J Endocrinol, 2001. **170**(3): p. 667-75.
 92. Varga, F., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits thyroid hormone-induced osteocalcin expression in mouse osteoblast-like cells via a thyroid hormone response element*. J Mol Endocrinol, 2003. **30**(1): p. 49-57.
 93. 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.
 94. 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.
 95. Boyce BF, X.L., *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. Arthritis Res Ther, 2007. **9**.
 96. 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.
 97. Ernst, M. and E.R. Froesch, *Triiodothyronine stimulates proliferation of osteoblast-like cells in serum-free culture*. FEBS Lett, 1987. **220**(1): p. 163-6.
 98. Limonard, E.J., et al., *Clonidine increases bone resorption in humans*. Osteoporos Int, 2016. **27**(3): p. 1063-1071.
 99. 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.
 100. 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.
 101. Cray, J.J., Jr., et al., *Effects of thyroxine exposure on osteogenesis in mouse calvarial pre-osteoblasts*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69067.