

TATIANA DE LOURDES FONSECA

**INTERAÇÃO DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO
COM O HORMÔNIO TIREOIDEANO NA REGULAÇÃO
DA MASSA E METABOLISMO ÓSSEOS**

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

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia Ferreira.

São Paulo
2009

RESUMO

Fonseca TL. Interação do sistema nervoso simpático com hormônio tireoideano na regulação da massa e metabolismo ósseos [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Sabe-se a estimulação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) reduz a massa óssea via receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) e que a tireotoxicose também induz osteopenia. Para investigar se o hormônio tireoideano (HT) interage com o SNS para regular a massa óssea, avaliamos o efeito de dose suprafisiológica de tiroxina (T4), associado ou não com proranolol (Prop), um antagonista β -adrenérgico, ou isoproterenol (Iso), um agonista β -adrenérgico, por 6 semanas, no esqueleto de camundongos C57BL/6J. No fêmur, o tratamento com T4 diminuiu a Densidade Mineral Óssea (BMD) e o Prop bloqueou a osteopenia induzida pelo T4. A associação do Iso com o T4 intensificou a redução do BMD femoral. O T4 diminuiu a resistência óssea (RO) no fêmur e tíbia e o Prop bloqueou a redução da RO induzida pelo T4. A expressão de β_2 -AR no fêmur não foi afetada por nenhum tratamento. Em seguida, avaliamos se a osteopenia induzida pela tireotoxicose é potencializada em camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}, que apresentam aumento crônico do tônus simpático. Camundongos fêmeas α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} e selvagens (C57BL/6J) de 40 dias de idade foram tratados com 10 e 20 vezes a dose fisiológica de T3 (0,35 μ g/100 g PC/dia) por 12 semanas. Inesperadamente, vimos que os animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam um fenótipo generalizado de alta massa óssea (HBM), com melhora na conectividade e arquitetura trabecular e com aumento da RO, associados à redução na reabsorção e aumento na formação ósseas. O T3 causou redução generalizada no BMD dos animais selvagens (11 a 14%, $p < 0,01$), mas não induziu osteopenia nos animais KO. Observamos que os adrenoreceptores (AR) α_{2A} , α_{2C} , β_1 , β_2 e β_3 são expressos na tíbia de camundongos selvagens e em células osteoblásticas (MC3T3-E1), além disso, o α_{2C} -AR e o β_1 -AR apresentaram redução em sua expressão nos animais selvagens tratados com T3. Não houve variação da expressão do β_1 -, β_2 - e β_3 -AR entre os animais selvagens e KOs. A expressão da fosfatase ácida tartrato resistente e do receptor do ativador do NF- κ B (fatores relacionados à atividade osteoclástica) estava reduzida nos animais KO. Observamos que o T3 reduziu a expressão da Osteoprotegerina (3x $p < 0,001$), uma proteína que limita a atividade

osteoclástica, nos animais selvagens, mas não nos animais KOs. Os nossos resultados mostram que os animais KOs apresentam um fenótipo de HBM, apesar do seu elevado tônus simpático e da intacta sinalização β_2 -adrenérgica, o que sugere que os receptores α_{2A} e α_{2C} , além do β_2 -AR, possam mediar as ações do SNS no metabolismo ósseo. O fato do propranolol limitar e do isoproterenol acentuar os efeitos deletérios da tireotoxicose no esqueleto, e dos camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentarem resistência à osteopenia induzida pelo T3, sugere que há uma interação entre SNS e o HT para regular a massa óssea, e que esta depende tanto do β_2 -AR como do α_{2A} - e/ou α_{2C} -AR.

Palavras-chave: Hormônios tireoideanos; Sistema nervoso simpático; Massa óssea; Hiperatividade simpática; Receptores adrenérgicos e metabolismo ósseo.

ABSTRACT

Fonseca TL. Interaction of the sympathetic nervous system with thyroid hormone in the regulation of bone mass and metabolism [Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

It is well known that activation of the sympathetic nervous system (SNS) reduces bone mass via β_2 -adrenergic receptors (β_2 -AR) and that thyrotoxicosis also induces osteopenia. To investigate if thyroid hormone (TH) interacts with the SNS to regulate bone mass, we evaluated the effect of a supraphysiological dose of thyroxin (T4), associated or not with propranolol (Prop) or isoproterenol (Iso), a β -adrenergic antagonist and agonist, respectively, per 6 weeks, in the skeleton of C57BL/6J mice. In the femur, T4 treatment decreased Bone Mineral Density (BMD) and Prop blocked the T4-induced osteopenia. The association of Iso with T4 intensified the BMD reduction in the femur. T4 decreased bone strength (BS) in the femur and tibia. β_2 -AR mRNA expression in the femur was not affected by any treatment. Next, we evaluated if the T4-induced osteopenia is increased in α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} mice, which present an elevated sympathetic tone. 40-day-old female wild type (WT) - C57BL/6J - and α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} mice were treated with 10 and 20 physiological doses of T3 (0,35 μ g/100 g BW/day) for 12 weeks. Surprisingly, we found that α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} mice present a generalized high bone mass (HBM) phenotype, with better connected and more plate-shape trabeculae and with increased BS, associated with decreased bone resorption and increased bone formation. T3 treatment decreased BMD in all skeleton sites in WT mice, but did not induce osteopenia in KO mice. We found that α_{2A} , α_{2C} , β_1 , β_2 e β_3 -adrenoceptors (AR) are expressed in WT tibia and osteoblastic cells (MC3T3-E1), moreover, α_{2C} -AR and β_1 -AR mRNAs were down-regulated by T3 in WT mice. Tibial β_1 , β_2 e β_3 -AR mRNA expression did not vary between mice lineages. The expression of tartrate-resistant acid phosphatase and receptor activator of nuclear factor kappa- β (factors positively related to osteoclastic activity) were reduced in KO mice. Finally, we found that T3 down-regulates osteoprotegerin, a protein that limits osteoclastic activity, in WT but not in KO mice. Our results show that KO mice present a HBM phenotype, in spite of an elevated sympathetic tone and of intact β_2 -

adrenergic signaling, which suggests that α_{2A} - and/or α_{2C} -AR, besides β_2 -AR, may also play a role in mediating the SNS actions in bone metabolism. The fact of propranolol limited and isoproterenol accentuated the deleterious effects of thyrotoxicosis in the skeleton, and that KO mice are resistant to the T3-induced osteopenia suggest that TH interacts with the SNS to regulated bone mass, and that this interaction is dependent on both β_2 -AR and α_{2A} -AR and/or α_{2C} -AR signaling.

Key words: Thyroid hormones; Sympathetic nervous system; bone mass; sympathetic hyperactivity; adrenergic receptor and bone metabolism.

1 INTRODUÇÃO

Para que a homeostase do tecido ósseo se mantenha, é necessário que a atividade das principais células ósseas esteja em equilíbrio. O osso é constantemente remodelado através da ação dos osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea, e dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. Este processo, que é definido como remodelamento ósseo, é controlado por fatores locais, secretados pelas próprias células osteoblásticas ou osteoclásticas, e por fatores sistêmicos, incluindo uma série de hormônios.

O hormônio tireoidiano é essencial para o desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos. A triiodotironina (T3) estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea por regular a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. [1, 2]. Em situações de excesso de hormônio tireoidiano, a atividade osteoclástica é mais acentuada do que a osteoblástica, levando a um aumento da calcemia e diminuição da massa óssea. Recentemente, demonstrou-se que o Sistema Nervoso Simpático (SNS) é também um potente regulador da massa óssea, atuando como um inibidor da formação óssea e estimulador da reabsorção óssea, através de receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -AR) [3, 4].

Uma das características mais proeminentes do hormônio tireoidiano, mas ainda pouco entendida, é a sua interação com o SNS. O sinergismo entre as catecolaminas e o hormônio tireoidiano é requerido para que a máxima termogênese, lipólise, glicogenólise e gluconeogênese ocorram [5]. Existem também evidências de que haja um aumento do tônus simpático em pacientes com hipertireoidismo [6]. Considerando-se que o excesso de hormônio tireoidiano causa perda de massa óssea e que a ativação do SNS também possui efeito negativo na massa óssea, é possível que haja uma interação entre o SNS e o hormônio tireoidiano na regulação do metabolismo ósseo e, conseqüentemente, na regulação da massa óssea. Uma evidência dessa possível interação é o fato de que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol corrige a hipercalcemia secundária à tireotoxicose [7]. Além disso, mostrou-se que, em pacientes hipertireoideos, o tratamento com propranolol reduz a excreção urinária de

hidroxiprolina, um marcador bioquímico da reabsorção óssea [8]. Esses achados levantam a hipótese de que o sinergismo entre o SNS e o hormônio tireoideano também ocorra na regulação do *turnover* ósseo.

Para confirmar nossa hipótese, em um primeiro momento, avaliamos o efeito da dose suprafisiológica de T4, associado ou não com propranolol (Prop), um antagonista β -adrenérgico, ou isoproterenol (Iso), um agonista β -adrenérgico, durante seis semanas, no esqueleto de camundongos C57BL/6J. Com estes experimentos observamos que, no fêmur, o tratamento com T4 diminuiu a densidade mineral óssea (BMD) e o Prop bloqueou a osteopenia induzida pelo T4. Já a associação do Iso com o T4 intensificou a redução do BMD femoral. Através de testes biomecânicos, mostramos que o T4 diminuiu a resistência óssea no fêmur e tibia. Nesses ossos, o Prop bloqueou a redução da resistência óssea induzida pelo T4. A expressão do RNAm do β_2 -AR no fêmur não foi afetada por nenhum tratamento. Esses resultados sugerem que o hormônio tireoideano interage com o SNS para regular a massa e função ósseas, mas não através do aumento da responsividade do tecido ósseo ao SNS, pelo menos via aumento do β_2 -AR.

Continuando o estudo da interação do SNS com o hormônio tireoideano, estudamos camundongos modificados geneticamente. Esses animais apresentam duplo “*knockout*” dos genes dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} (α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}), que regulam negativamente a liberação de noradrenalina, o que faz com que apresentem aumento das concentrações plasmáticas de catecolaminas. Dessa forma, os camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} representam um valioso modelo de elevação crônica do tônus simpático.

O fenótipo ósseo dos camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} ainda não havia sido investigado. Considerando-se os vários estudos que indicam que o SNS regula negativamente a massa óssea [3, 4, 9], nós acreditávamos que esses animais apresentariam massa óssea reduzida, além de uma intensificação da osteopenia induzida pelo T3, o que seria mais uma forte evidência de que o hormônio tireoideano interage com o SNS para regular a fisiologia óssea.

Surpreendentemente, no presente estudo, mostramos que os animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam um notável fenótipo de alta massa óssea (HBM) com melhora da qualidade óssea, apesar de seu elevado tônus simpático e da presença de receptores β_2 -AR funcionais. Esses dados são uma forte evidência de que o β_2 -AR

não é o único receptor adrenérgico envolvido no controle do metabolismo ósseo, o que levanta a hipótese de que os receptores α_{2A} e/ou α_{2C} também possam mediar a sinalização simpática no esqueleto.

Um achado bastante surpreendente deste estudo, também, foi o fato de que a tireotoxicose não induziu osteopenia nos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$. O que sugere fortemente que o hormônio tireoideano interage com o SNS, via receptores α -adrenérgicos, para regular a massa óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Tecido ósseo

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos tecidos do corpo humano e desempenha funções importantes como proteção de órgãos, locomoção e local de armazenamento de cálcio, fosfato e outros íons [10, 11].

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado como cortical (ou compacto) e trabecular (ou esponjoso). O osso cortical, que representa aproximadamente 80% da massa esquelética, predomina nos ossos longos e tem principalmente função mecânica e de proteção de órgãos. Sua espessura e arquitetura variam dependendo do sítio esquelético, o que reflete o desempenho funcional do osso. O osso trabecular ou esponjoso, que corresponde a aproximadamente 20% da massa esquelética, é encontrado predominantemente no esqueleto axial e no interior dos ossos longos, dentro de suas extremidades expandidas (metáfises e epífises). O osso esponjoso dá resistência adicional aos ossos, além de acomodar a medula óssea por entre as suas traves ósseas. Tanto o osso trabecular quanto o cortical formam um reservatório de cálcio e fosfato que podem ser prontamente removidos ou acrescentados por ação celular, sob controle hormonal [11].

Microscopicamente, como todo tecido conjuntivo, o tecido ósseo consiste de uma porção celular e de uma matriz extracelular (MEC). A MEC possui um componente orgânico (35%) e um inorgânico (65%). A sua fase orgânica é formada por colágeno, proteínas não colágenas (osteonectina, osteocalcina, etc.), mucopolissacarídeos e lipídios. A fase inorgânica é predominantemente, constituída por cálcio e fósforo. Os componentes inorgânicos (cálcio e fósforo) são depositados como sais amorfos sobre a matriz extracelular e, durante o processo de mineralização óssea, formam estruturas cristalinas similares aos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. As moléculas de colágeno formam uma estrutura tridimensional, criando espaços para acomodar esses cristais [12].

As células ósseas representam apenas 1 a 2% do tecido ósseo. Entretanto, são responsáveis pelas funções metabólicas do osso (como, por exemplo, o remodelamento ósseo e a manutenção dos níveis circulantes do cálcio). As principais células ósseas são: (a) as células osteoprogenitoras, que dão origem aos osteoblastos; (b) os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea; (c) os osteócitos, encontrados embebidos na MEC; (d) as células de revestimento ou de superfície, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas e (e) os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea [11].

As células osteoprogenitoras são derivadas de células mesenquimais que se diferenciam em células da linhagem osteoblástica (osteoblastos e células de revestimento) [13]. Os osteoblastos são células mononucleadas, encontradas nas superfícies de maturação ou remodelação ósseas. Os osteoblastos apresentam retículo endoplasmático e complexo de Golgi muito desenvolvidos, o que é característico de células que apresentam alta atividade de síntese protéica [14]. Os osteoblastos são responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz óssea. Além disso, os osteoblastos exercem um papel importante, embora indireto, na regulação da reabsorção óssea, uma vez que são essas células, e não os osteoclastos, que possuem receptores para vários fatores e hormônios que induzem a reabsorção óssea. Durante a deposição óssea, os osteoblastos podem inibir a atividade dos osteoclastos ou podem, simplesmente, deixar de estimulá-los. Por outro lado, na presença de estimuladores da reabsorção óssea como, por exemplo, o hormônio da paratireóide, cujos receptores estão presentes nos osteoblastos, estas células liberam fatores de acoplamento que ativam os osteoclastos [14].

Os osteócitos constituem tipo celular mais abundante no osso maduro, ficando dispersos dentro da matriz. Eles são derivados de osteoblastos que se tornaram encarcerados na matriz óssea por eles produzida. Os osteócitos mantêm contato uns com os outros, com osteoblastos e com células de revestimento encontradas nas superfícies ósseas, através de uma vasta rede de extensões citoplasmáticas localizadas no interior de canalículos ósseos [15]. As funções exatas dos osteócitos ainda não estão claras, mas há evidências de que eles têm um papel essencial na manutenção da integridade da matriz óssea. Tem-se mostrado que os osteócitos são capazes de sintetizar matriz óssea na superfície da lacuna osteocítica, a qual pode, posteriormente, sofrer mineralização. Embora os osteócitos

sejam classicamente considerados como capazes de reabsorver o osso mineralizado, que envolve sua lacuna, estudos mais recentes põem em dúvida essa idéia [16]. Além disso, os osteócitos parecem ser importantes na recepção e transdução dos estímulos mecânicos, detectando as deformações produzidas pela força mecânica [17]. Há ainda, uma série de evidências de que tenham o papel de ativar localmente o remodelamento ósseo, além de estarem ativamente envolvidos na manutenção da matriz óssea [18].

As células de revestimento são células da linhagem osteoblástica encontradas nas superfícies ósseas quiescentes, isto é, onde não está ocorrendo formação ou reabsorção óssea. Há evidências de que estas células sejam osteoblastos inativos (quiescentes) que podem voltar ao estado ativo quando estimuladas apropriadamente. Elas formam camadas contínuas e estão em contato umas com as outras e com os osteócitos vizinhos, através de junções celulares. Acredita-se que essas células atuem no sentido de proteger as superfícies ósseas de agentes nocivos à integridade óssea, como, por exemplo, os pirofosfatos. Acredita-se, ainda, que essas células exerçam um papel ativo na regulação da diferenciação das células osteoprogenitoras. Além disso, essas células possuem receptores de hormônios e fatores que iniciam o remodelamento ósseo [19-21].

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea. São células gigantes e multinucleadas (4-20 núcleos), formadas pela fusão de células mononucleadas hematopoiéticas [22], e que são encontradas onde existe erosão ativa de osso. Ficam em contato íntimo com a superfície do osso em depressões denominadas lacunas de reabsorção ou lacunas de Howship. Claramente, os osteoclastos causam desmineralização e destruição estrutural da matriz orgânica [23].

O aumento da atividade osteoclástica é acompanhada por um aumento na síntese e secreção da fosfatase ácida do tipo 5b. A fosfatase ácida presente nas células osteoclásticas é um enzima que resiste à influência inibitória do L(+) tartrato (que tem função catalítica para outras fosfatases ácidas), sendo assim, esta fosfatase é denominada fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) [24]. O TRAP está presente em grandes quantidades nas bordas em escova dos osteoclastos. Desta forma, o TRAP é considerado um marcador bioquímico da reabsorção óssea,

uma vez que é um dos produtos osteoclásticos relacionados à atividade osteoclástica [25].

A integridade mecânica do tecido ósseo é mantida através de um processo denominado remodelamento ósseo. No remodelamento ósseo, há um equilíbrio entre a atividade celular de osteoclastos (que reabsorvem o tecido ósseo) e osteoblastos (que o repõem). O ciclo de remodelamento começa com a ativação de células osteoclásticas que, em seguida reabsorvem osso e formam uma lacuna de reabsorção (lacuna de Howship). Em seguida à reabsorção óssea, os osteoblastos “invadem” a lacuna de Howship e dão início à formação óssea, repondo a mesma quantidade de osso que foi reabsorvida pelos osteoclastos. A seqüência ativação-reabsorção-formação dura aproximadamente 200 dias em cada “sítio” chamado de unidade de remodelamento ósseo [26].

Sinais de diferenciação celular são responsáveis pela regulação do processo de remodelamento. Sabe-se, atualmente, que essa regulação é determinada pela interação entre proteínas localizadas nas superfícies dos osteoblastos e osteoclastos.

O ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANK-L) é um membro da superfamília dos ligantes aos fatores de necrose tumoral (TNF). O RANK-L está presente na superfície das células osteoblásticas e se liga a seu receptor o RANK, que está presente na superfície das células precursoras dos osteoclastos e nos osteoclastos maduros. O RANK é uma proteína de membrana do tipo I, que foi originalmente clonada a partir de células dendríticas [27]. A ligação do RANK-L ao seu receptor específico, o RANK, promove a indução da osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos. O RANK-L também é um fator essencial para sobrevivência e maturação dos osteoclastos [28-32].

A osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína solúvel, sintetizada pelos osteoblastos [33], que se liga ao RANK-L, desta forma, bloqueia a ligação RANK/RANK-L. Assim sendo, a interação OPG/RANK-L limita a sobrevivência, diferenciação e atividade dos osteoclastos [28-32].

A descoberta desta nova interação celular entre os osteoblastos e osteoclastos permitiu um maior entendimento sobre o remodelamento ósseo, tanto em condições fisiológicas quanto em estados patológicos, como a osteoporose, osteopetrose e artrite reumatóide.

2.2 O Hormônio tireoideano

Os hormônios tireoideanos são produzidos na glândula tireóide em um processo que envolve o transporte ativo de iodo para dentro da célula folicular, além da sua oxidação e incorporação em resíduos tirosina na molécula de tireoglobulina [34, 35]. Esta iodinação de tirosinas resulta em resíduos monoiodinados (MIT) e diiodinados (DIT), que são enzimaticamente ligados para formar os hormônios tireoideanos, a 3,5,3',5'-tetraiodotironina (tiroxina ou T4) e 3,5,3'-triiodotironina (T3). A tireoglobulina iodinada que contém MIT, DIT, T4 e T3 é armazenada no colóide, próximo ao lúmen das células foliculares da tireóide. A liberação dos hormônios pela célula folicular envolve a endocitose e digestão lisossomal da tireoglobulina. Embora a tireóide produza preferencialmente T4, há um consenso de que a maioria dos efeitos dos hormônios tireoideanos sejam fruto da ligação do T3 com os seus receptores nucleares (TRs) [34, 36].

Nos mamíferos, 60-90% da produção tireoideana corresponde a T4 e 10-40% corresponde a T3. Menos de 1% da produção tireoideana é representado por outras iodotironinas, o T3 reverso (rT3) e a diiodotironina (T2) [36].

A síntese e secreção dos hormônios tireoideanos é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Resumidamente, o hipotálamo produz e secreta o hormônio liberador de tireotrofina (TRH; *thyrotropin-releasing hormone*), que atinge a hipófise e estimula a produção do hormônio tireotrófico (TSH; *thyroid stimulating hormone*). O TSH estimula a captação de iodo pela glândula tireóide e, portanto, estimula a produção de iodotironinas. Por outro lado, a secreção de TSH é regulada negativamente pelos próprios produtos da glândula tireóide, ou seja, por *feedback* negativo [36, 37]. Quando um indivíduo apresenta níveis aumentados de TSH e níveis diminuídos de T3 e T4, têm-se uma situação patológica denominada hipotireoidismo. Contrariamente, o hipertireoidismo se caracteriza sorologicamente por níveis aumentados de T3 e T4 e reduzidos de TSH [36].

A afinidade dos TRs é aproximadamente 10 vezes maior pelo T3 em relação ao T4. Por conta disso, considerando-se os efeitos genômicos dos hormônios tireoideanos, o T4 atua como um pró-hormônio, e o T3 como o hormônio ativo, ligando-se aos receptores nucleares [38-40]. O T4, produto secretado em maior

abundância pela glândula tireóide, é convertido a T3 por ação de enzimas conhecidas como selenodesiodases das iodotironinas. A conversão do T4 a T3 ocorre na própria tireóide, nas células dos tecidos alvo ou nas células de outros tecidos. As ações genômicas do T3 são resultado da interação de T3-TR-TRE (elementos responsivos dos TRs nos genes alvos), o que leva a modulação da transcrição gênica.

É digno de nota, entretanto, que alguns efeitos dos hormônios tireoideanos ocorrem muito rapidamente e não são afetados por inibidores da transcrição gênica ou tradução, demonstrando que esses hormônios também atuam via mecanismos não genômicos [41]. Tais ações têm sido descritas em vários tecidos e tipos celulares [42, 43]. O rT3, assim como o T2, eram considerados isoformas biologicamente inativas por não desempenharem uma ação genômica direta através da ligação com os TRs. Porém, estudos vêm demonstrando que o rT3 e T2 também desempenham importantes ações biológicas por mecanismos não genômicos [42, 44].

O receptor de TSH (TSHR) é primariamente expresso nas células foliculares da glândula tireóide, mas também foi identificado no cérebro, rins, testículos, coração, osso, tecido adiposo, fibroblastos e em células do sistema imune, hematopoiéticas e ósseas [45-48]. Ao contrário do que se pensava anteriormente, o TSH parece atuar diretamente sobre tecidos não tireoideanos, entre esses, o tecido ósseo. Há evidências de que o TSH tem ação anabólica no tecido ósseo, entretanto, os achados são muitas vezes conflitantes. Williams e Bassett concluem, em revisão recente do tema, que o TSH não teria um papel importante no osso em casos de hipo ou hipertireoidismo [49-51]. Acredita-se, entretanto, que em condições de eutireoidismo, o TSH possa regular a diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras e limitar a diferenciação de monócitos em osteoclastos, agindo assim como um regulador fino do remodelamento ósseo [52].

2.3 O Hormônio tireoideano e o tecido ósseo

O hormônio tireoideano é essencial para o desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos normais. Estudos com animais experimentais e estudos clínicos mostram que, tanto a deficiência quanto o excesso desse hormônio, resultam em

efeitos importantes no esqueleto. Em modelos animais de hipotireoidismo, a deficiência de T3 resulta em atraso na ossificação do esqueleto, redução da espessura da placa de crescimento, desorganização da cartilagem e limitação da diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas. Por outro lado, o excesso de hormônio tireoideano resulta em maturação esquelética acelerada, fechamento prematuro das placas de crescimento e subsequente diminuição do crescimento dos membros e do peso corporal [53].

O hormônio tireoideano também tem efeito no osso adulto, sendo importante para a manutenção do metabolismo ósseo, uma vez que estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea por regular a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Em condições de excesso de hormônio tireoideano, a atividade desses dois tipos celulares está aumentada, com predomínio da atividade osteoclástica. Como resultado, o metabolismo ósseo é acelerado, favorecendo a reabsorção óssea, balanço negativo do cálcio e perda de massa óssea [1, 54].

Estudos revelaram que o hipertireoidismo é capaz de diminuir a densidade mineral óssea (BMD) do fêmur, coluna lombar e antebraço [55-57] e, além disso, aumenta o risco de fraturas de pacientes não tratados [57, 58]. Uma meta-análise recente mostrou que o tratamento do hipertireoidismo restaura a massa óssea aos níveis da normalidade, mesmo quando nenhuma medida anti-osteopênica é tomada, a não ser a restauração do *status* eutireoideo [59]. Entretanto, vários estudos mostram reversão apenas parcial da massa óssea após a remissão do hipertireoidismo [55, 56, 60, 61].

Por outro lado, no hipotireoidismo, o metabolismo ósseo é reduzido com inalteração ou pequeno aumento da massa óssea [62]. Porém, estudos mostram aumento do risco de fraturas na deficiência do hormônio tireoideano. Isso pode ser explicado pela redução na qualidade óssea, em função da menor renovação do tecido ósseo, ou pelo aumento do risco de quedas, o que também é observado nesta condição [58].

Embora a importância do hormônio tireoideano no desenvolvimento e metabolismo ósseos seja clara, pouco se sabe a respeito dos mecanismos que medeiam os efeitos desse hormônio no tecido ósseo.

A identificação das isoformas TR α 1, TR α 2 e TR β 1 em células osteoblásticas

[63-66], osteoclásticas [67, 68] e em condrócitos das placas epifisárias de crescimento [68, 69], bem como a responsividade dessas células ao hormônio tireoideano em culturas isoladas, evidenciam uma ação direta do T3 no tecido ósseo.

Um mecanismo indireto pelo qual o T3 afeta o esqueleto é através do aumento da secreção do hormônio do crescimento (GH) e *insulin-like growth factor-1* (IGF-I), que, por sua vez, vão atuar diretamente nas células ósseas [53, 70].

2.4 O Sistema nervoso simpático e os receptores adrenérgicos

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) constitui o componente eferente do sistema nervoso visceral. Este se divide em Sistema Nervoso Simpático e Sistema Nervoso Parassimpático (SNP). A grande maioria das fibras pós-ganglionares simpáticas tem a noradrenalina como neurotransmissor, sendo, portanto, adrenérgicas [71].

O sistema adrenérgico é um regulador essencial de funções neuronais, endócrinas, cardiovasculares, vegetativas e metabólicas. As catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, transmitem seus sinais biológicos via receptores acoplados à proteína G para regular uma variedade de funções celulares [72]. Esses receptores são denominados receptores adrenérgicos, e é através deles que o SNS efetua suas ações sobre os órgãos alvo. A maioria desses receptores está localizada na membrana plasmática de neurônios e em células alvo neuronais e não neuronais.

Os receptores adrenérgicos foram inicialmente classificados como α e β . Atualmente, sabe-se que há pelo menos nove subtipos de receptores adrenérgicos: três isoformas α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}) [73], três isoformas α_2 (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}), e três isoformas β (β_1 , β_2 e β_3) [74].

Em contato com seus ligantes (adrenalina e noradrenalina), os receptores adrenérgicos passam por mudanças conformacionais, que levam à formação de heterodímeros de proteínas G, que sinalizam via subunidade $G\alpha$ e/ou $G\beta\gamma$. Os receptores adrenérgicos se acoplam e ativam diferentes proteínas G, desencadeando sinais intracelulares específicos para cada tipo de receptor (para revisão ver Wettschureck e Offermanns) [75].

Os receptores α_1 -adrenérgicos são acoplados à proteína $G_{q/11}$ que, uma vez ativada, aumenta as concentrações intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e de cálcio (Ca^{2+}). A maioria dos receptores α_2 -adrenérgicos tem seus efeitos intracelulares mediados por proteínas da família $G_{i/o}$. Neste caso, a sinalização se dá tanto via subunidade $G\alpha$ quanto $G\beta\gamma$. A ativação da proteína $G\alpha$ pelos receptores α_2 -adrenérgicos leva à inibição da adenilato ciclase (AC), o que resulta em uma redução celular dos níveis de monofosfato de 3', 5'-adenosina cíclico (AMPc). Por outro lado, a liberação das subunidades $G\beta\gamma$ leva à ativação das proteínas $G_{i/o}$ que são importantes reguladores da função neuronal, pois inibem os canais de Ca^{2+} e ativam os canais de K^+ GIRK, além de ativar proteínas quinases mitógenas (MAP) ERK1/2 [76].

Todas as isoformas de receptores β -adrenérgicos estimulam a adenilato ciclase e, portanto, induzem a síntese de AMPc [77], que é portanto o segundo mensageiro das ações da noradrenalina mediadas pelos receptores β -adrenérgicos. Por outro lado, os receptores α_2 inibem a AC e, portanto, diminuem a formação de AMPc, antagonizando as ações mediadas pelos receptores β -adrenérgicos.

Todos os nove subtipos de receptores adrenérgicos são ativados pela adrenalina e noradrenalina, entretanto, apenas os receptores α_2 atuam como autoreceptores inibitórios pré-sinápticos. Assim sendo, esses receptores modulam (inibem) a liberação de noradrenalina pelas terminações simpáticas e por neurônios adrenérgicos no sistema nervoso central (SNC).

Ainda não foi completamente elucidada a função fisiológica e o potencial terapêutico de cada subtipo de receptor adrenérgico. Somente os receptores β -adrenérgicos possuem ligantes seletivos para cada subtipo de receptor, o que tem colaborado muito na identificação da significância fisiológica de cada isoforma. Agonistas para receptores β_2 -AR têm um importante papel em terapia de asma, ao passo que antagonistas dos receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR) são utilizados como medicação de primeira linha para pacientes com hipertensão, doenças coronárias ou falência cardíaca [78].

Ligantes específicos dos receptores α_1 -adrenérgicos reduzem a hiperplasia benigna da próstata sem causar hipotensão. Com relação aos receptores α_2 -adrenérgicos ainda não se encontram ligantes específicos disponíveis para uso clínico e talvez seja por este motivo que ainda pouco se sabe a respeito de suas

funções fisiológicas. Na clínica são utilizados agonistas α_2 -adrenérgicos não específicos para o tratamento de pacientes com hipertensão, glaucoma, dores tumorais e pós-operatórias e para redução de tremores relativos à retirada de medicamentos. Um problema apresentado pelos agonistas α_2 -adrenérgicos é a sobreposição dos efeitos desejáveis e indesejáveis. Um claro exemplo é o efeito positivo de agonistas do receptor α_2 -adrenérgico no tratamento da hipertensão sobrepondo-se ao efeito negativo, que provoca sedação do paciente. Por esta razão, os agonistas α_2 -adrenérgicos são utilizados como medicamentos de segunda linha [78].

Na tentativa elucidar quais as principais funções fisiológicas e o potencial terapêutico das isoformas dos receptores adrenérgicos e de seus subtipos foram desenvolvidos animais geneticamente modificados que apresentavam deleções específicas para cada tipo de receptor. A tabela 1 resume os principais fenótipos gerados para cada tipo de deleção.

Tabela 1 - Fenótipo de camundongos deficientes dos subtipos dos receptores adrenérgicos

Linhagem	Fenótipo	Referência
$\alpha_{1A}^{-/-}$	Redução da pressão sanguínea de repouso	Rokosh e Simpsom, 2002 [79]
$\alpha_{1B}^{-/-}$	Pressão sanguínea normal, redução da resposta pressórica pela fenilefrina	Cavalli <i>et al.</i> 1997 [80]
$\alpha_{1D}^{-/-}$	Redução da pressão sanguínea de repouso	Tanoue <i>et al.</i> 2002a [81], 2002b [82] e 2002c [83]
$\alpha_{1AD}^{-/-}$	Redução do crescimento cardíaco após o nascimento	O'Connell <i>et al.</i> 2003 [84]
$\alpha_{2A}^{-/-}$	Efeitos não hipotensivos de agonistas α_2 , aumento da liberação de noradrenalina	MacMillam <i>et al.</i> 1996 [85]; Altman <i>et al.</i> 1999 [86] e Hein <i>et al.</i> 1999 [87]
$\alpha_{2B}^{-/-}$	Resposta não hipertensiva para intravascular agonistas α_2 , efeitos não analgésicos do óxido nítrico	Link <i>et al.</i> 1996 [88] e Sawamura <i>et al.</i> 2000 [89]
$\alpha_{2C}^{-/-}$	Aumento da secreção de adrenalina, aumento da agressão e alterações do comportamento	Scheinin <i>et al.</i> 2001 [90] e Brede <i>et al.</i> 2003 [91]
$\alpha_{2AC}^{-/-}$	Elevado tônus simpático e redução da função cardíaca	Hein <i>et al.</i> 1999 [87] e Brum <i>et al.</i> 2002 [92]
$\alpha_{2ABC}^{-/-}$	Mortalidade embrionária, defeitos no desenvolvimento vascular da placenta	Philipp <i>et al.</i> 2002a [93] e 2002b [78]
$\beta_1^{-/-}$	Ausência de resposta cardíaca para o isoproterenol, alterações no controle dinâmico da razão do coração, danos no relaxamento vascular	Rohrer <i>et al.</i> 1996 [94] e Chruscinski <i>et al.</i> 1999 [95] e 2001 [96]
$\beta_2^{-/-}$	Bloqueio da resposta hipotensiva para os agonistas β , redução da gordura corporal	Chruscinski <i>et al.</i> 1999 [95]
$\beta_3^{-/-}$	Aumento da gordura corporal	Susulic <i>et al.</i> 1995 [97] e Revelli <i>et al.</i> 1997 [98]
$\beta_{1,2}^{-/-}$	Prejuízo do alcance cronotrópico, contractilidade e razão metabólica	Rohrer <i>et al.</i> 1999 [99]
$\beta_{1,2,3}^{-/-}$	Prejuízo na termogênese induzida pela dieta	Bachman <i>et al.</i> 2002 [100]

Fonte: Melanie Philipp e Lutz Hein, 2004 [101].

Mais estudos sobre a especificidade das isoformas dos receptores adrenérgicos serão necessários para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na criação de drogas subtipo seletivas.

2.5 O Sistema nervoso simpático e o tecido ósseo

O estudo da ação do SNS sobre o tecido ósseo praticamente teve o seu início ao se investigar o efeito de um pequeno hormônio polipeptídico, a leptina, no esqueleto. A leptina é secretada principalmente por adipócitos e controla especialmente o peso corporal e a função gonadal através de vias hipotalâmicas [102, 103]. Mais recentemente, demonstrou-se que a leptina é também um potente regulador da massa óssea, atuando como um inibidor da formação óssea [9]. A descoberta da função antiosteogênica da leptina foi inesperada por duas razões. A primeira razão é porque esta não é a função pela qual a leptina havia sido clonada. A segunda, e com grande relevância para a fisiologia, é que constatou-se que camundongos obesos Ob/Ob, deficientes de leptina, apresentam um fenótipo de HBM associado a um importante aumento na taxa de formação óssea. Apesar disso, apresentam hipogonadismo e hipercortisolismo [9], dois fatores que acarretam aumento da reabsorção óssea e diminuição da formação óssea, respectivamente. A coexistência do hipogonadismo e hipercortisolismo, que até então eram considerados fatores osteopênicos primordiais, com a HBM nos camundongos deficientes de leptina é, portanto, fundamental para a consideração da importância do papel da leptina como um potente fator antiosteogênico. É digno de nota que esse fenótipo de HBM nos camundongos com deficiência da sinalização de leptina não é uma consequência do elevado peso corporal desses animais. De fato, camundongos transgênicos A-Zip/F1 “fat-free” apresentam baixos níveis de leptina em função da lipodistrofia e também apresentam HBM apesar do seu baixo peso corporal [9, 104]. Em contraste, camundongos deficientes do receptor 4 de melanocortina são extremamente obesos mas não apresentam alteração da massa óssea [3, 105].

Demonstrou-se que o efeito antiosteogênico da leptina não é local e sim central [9]. Ou seja, ele não ocorre, por exemplo, quando a leptina é hiperexpressa em osteoblastos de camundongos *in vivo* [3], mas sim quando ela é administrada diretamente no III Ventrículo por infusão intracerebroventricular (ICV) [3, 9], ou quando há aumento sérico importante da leptina [106]. A infusão de doses mínimas de leptina no III Ventrículo leva a marcantes reduções da massa óssea, tanto em camundongos selvagens quanto deficientes de leptina. Com base em lesões

químicas, demonstrou-se que o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) medeia o efeito central da leptina [3]. Além disso, demonstrou-se que esse efeito central é mediado pelo SNS e, mais especificamente, por receptores β_2 -AR [3, 4].

Uma abordagem utilizada para investigar o envolvimento do SNS na regulação da massa óssea foi feita avaliando-se o esqueleto de camundongos deficientes de dopamina β -hidroxilase (DBH), uma enzima essencial para a síntese de adrenalina e noradrenalina a partir da dopamina [107, 108]. Esses camundongos não são obesos, a despeito de várias evidências de que o SNS é um regulador negativo do peso corporal; apresentam altas concentrações séricas de corticosterona e dopamina, condições que conhecidamente induzem osteopenia [107, 109]; e apresentam um fenótipo de HBM [3]. Um aspecto extremamente importante foi o fato dos animais DBH-deficientes, após infusão ICV de leptina, perderem praticamente toda a gordura corporal, mas não apresentarem o efeito antiosteogênico leptina-dependente. Esses achados permitiram a conclusão de dois aspectos importantes da biologia da leptina: (i) O SNS não é essencial para a ação da leptina na regulação do peso corporal, e (ii) a ação antiosteogênica da leptina é mediada pelo SNS, pelo menos parcialmente.

A partir da constatação de que o SNS é um regulador da massa óssea, levantaram-se as seguintes questões: Há receptores adrenérgicos nas células ósseas? Quais são esses receptores? Eles são funcionais? Quais deles medeiam as ações do SNS no tecido ósseo? Há inervação simpática no tecido ósseo? Takeda *et al.* [3] demonstraram a presença de receptores β_2 -AR em culturas primárias de osteoblastos e em osteoblastos de ossos longos de camundongos. Nenhum outro receptor β ou α adrenérgico foi detectado nos osteoblastos. A funcionalidade dos receptores β_2 -AR nos osteoblastos foi demonstrada tratando-se essas células, em cultura, com noradrenalina ou isoproterenol (um agonista dos receptores β -adrenérgicos) na presença ou ausência de propranolol (um antagonista dos receptores β -adrenérgicos), e medindo-se a produção de AMPc, um segundo mensageiro β adrenérgico. O isoproterenol e a noradrenalina aumentaram a produção de AMPc, sendo que esses efeitos foram abolidos pelo propranolol. Demonstrou-se, ainda, que a proliferação osteoblástica é inibida pelo isoproterenol, efeito este que é anulado pelo tratamento com propranolol. Além disso, foi demonstrada, por microscopia eletrônica, a presença de fibras nervosas amielínicas

na medula óssea adjacentes às trabéculas ósseas e aos osteoblastos, o que sugere a presença de inervação simpática no tecido ósseo [3]. Esse achado corrobora estudos prévios que identificaram, por imunohistoquímica, a presença de nervos simpáticos no osso de ratos adultos [110]. Takeda *et al.* [3] ainda mostraram que o tratamento de camundongos selvagens e Ob/Ob (obesos, deficientes de leptina e com HBM) com isoproterenol resultou em uma importante perda de massa óssea nas vértebras e nos ossos longos, secundária a uma diminuição na taxa de formação óssea e no número de osteoblastos, e sem alteração do peso corporal. Por outro lado, demonstrou-se que o bloqueio farmacológico dos β_2 -AR com propranolol *in vivo* impede a ação antiosteogênica da leptina sem alterar o peso corporal. Esses achados reforçam a importância do SNS em mediar a ação da leptina no esqueleto e o fato das ações desse hormônio no peso corporal e metabolismo ósseo utilizarem diferentes vias.

O estudo de camundongos com inativação gênica do β_2 -AR (β_2 -AR^{-/-}) trouxe ainda importantes evidências com relação ao papel do SNS no controle do remodelamento ósseo [4]. Esses camundongos apresentam níveis séricos normais de leptina e estrógeno, e apresentam uma massa óssea ainda mais elevada do que aquela dos animais Ob/Ob, associada a um aumento da formação óssea e redução da reabsorção óssea. Esse fenótipo sugere que o SNS inibe a formação e ativa a reabsorção do tecido ósseo e que, dessa forma, determina o nível de massa óssea de um animal. Por outro lado, a infusão ICV de leptina nos camundongos β_2 -AR^{-/-} não causou qualquer efeito sobre a formação e a reabsorção ósseas, o que também evidencia a importância do SNS em mediar a ação da leptina na regulação do remodelamento ósseo.

Recentemente, Shi *et al.* [111] estudaram a dissociação da regulação neural da massa óssea pela leptina do metabolismo energético. Eles mostraram que camundongos com deleção do receptor de leptina no sistema nervoso central apresentaram um aumento da formação e reabsorção óssea, resultando em HBM, de maneira similar à observada em animais deficientes de leptina. Por outro lado, a deleção dos receptores de leptina somente nos osteoblastos, não influenciou o remodelamento ósseo. Além disso, através do uso de animais com ganho de função do receptor de leptina (camundongos *l/l*), eles mostraram que a sinalização da leptina inibe o ganho de massa óssea por regular positivamente a atividade

simpática (esses animais apresentam níveis séricos elevados de noradrenalina) independente de qualquer mudança no controle do apetite ou do gasto energético. Assim, a leptina regula o ganho de massa óssea por mecanismos neurais que são independentes do metabolismo energético.

Contudo, há uma série de aspectos que ainda precisam ser elucidados com relação ao papel da leptina na regulação da massa óssea. Em mulheres obesas, por exemplo, os níveis séricos de leptina são elevados e a massa óssea também. Por outro lado, em mulheres magras, tanto os níveis séricos de leptina quanto a massa óssea são baixos [112]. Essa observação põe em dúvida a manutenção da função da leptina entre as diferentes espécies. Por outro lado, há algumas evidências de que o hipotálamo e o seu controle do SNS desempenham um papel chave na regulação da homeostase óssea também em humanos. Na Distrofia do Reflexo Simpático (“Reflex Sympathetic Dystrophy”), por exemplo, que é uma doença caracterizada por disfunção autonômica com aumento localizado do tônus simpático [113], acompanhado por osteopenia focal, um dos mais efetivos tratamentos, inclusive para a osteopenia, se faz com o uso de β -bloqueadores. Além disso, um estudo recente mostrou que a administração de bloqueadores β -adrenérgicos em mulheres elevou a densidade mineral óssea e reduziu o risco de fraturas [114].

Existem ainda muitos resultados conflitantes em relação aos estudos envolvendo animais geneticamente modificados e manipulações farmacológicas. É importante notar que a administração de alguns agonistas β -adrenérgicos como o clenbuterol [115], salbutamol [116] e formoterol [116] causou efeitos deletérios sobre massa óssea de ratos. Enquanto que, em outro estudo, observou-se que o salbutamol foi capaz de prevenir os efeitos deletérios causados pela ovariectomia [117]. A administração de β -bloqueadores também apresenta-se inconclusiva, uma vez que os efeitos positivos nem sempre são detectados e parecem estar associados a dose utilizada, pois há uma redução do seu benefício em altas doses [118]. Em humanos, há uma série de estudos mostrando que a administração de β -bloqueadores pode promover efeitos positivos [119, 120], negativos [121] e até mesmo não apresentarem nenhum efeito [122, 123] sobre a densidade mineral óssea (BMD) e/ou fraturas. Desta forma, fica claro que os efeitos dos β -agonistas e β -bloqueadores no metabolismo ósseo ainda são muito controversos e necessita de mais estudos para serem elucidados.

2.6 A Interação entre o sistema nervoso simpático e o hormônio tireoideano na regulação do metabolismo ósseo

Uma das características mais proeminentes do hormônio tireoideano, mas ainda pouco entendida, é a sua interação com o SNS. O sinergismo entre as catecolaminas e o hormônio tireoideano é requerido para que a máxima termogênese, lipólise, glicogenólise e gluconeogênese ocorram [5]. Existem também evidências de que haja um aumento do tônus simpático em pacientes com hipertireoidismo [6]. Os mecanismos desse sinergismo ainda não são completamente entendidos e vêm sendo investigados nos diferentes sistemas. Sabe-se que o hormônio tireoideano não aumenta a concentração de catecolaminas no plasma [124]. Entretanto, observa-se que a produção de AMPc induzida pela adrenalina em culturas de células miocárdicas é aumentada pelo T3 [125]. Pelo menos um mecanismo para esse importante efeito é a ação do hormônio tireoideano em aumentar o número de receptores β -adrenérgicos no coração [126]. Considerando-se que o excesso de hormônio tireoideano causa perda de massa óssea e que a ativação do SNS também possui efeito negativo na massa óssea, é possível que haja uma interação entre o SNS e o hormônio tireoideano também na regulação do metabolismo ósseo e, conseqüentemente, na regulação da massa óssea. Uma evidência dessa possível interação é o fato de que o tratamento de pacientes hipertireoideos com propranolol corrige a hipercalcemia secundária à tirotoxicose [7]. Além disso, mostrou-se que, em pacientes hipertireoideos, o tratamento com propranolol reduz a excreção urinária de hidroxiprolina, um marcador bioquímico da reabsorção óssea [8]. Esses achados sugerem que o aumento da reabsorção óssea no hipertireoidismo possa envolver mecanismos dependentes dos receptores β -adrenérgicos.

Em um estudo recente do nosso laboratório [70], vimos que o tratamento de ratas Wistar com aproximadamente 10 vezes a dose fisiológica de T3 por 32 e 64 dias causou perda de massa óssea generalizada pelo esqueleto. Por outro lado, o tratamento com doses equimolares do tireomimético seletivo pelo TR β , o GC-1, não teve efeito algum na massa óssea, apesar de, como o T3, suprimir o TSH e diminuir os níveis séricos de colesterol. Uma observação interessante é o fato de que o GC-1, no tecido adiposo marrom (BAT), é capaz de elevar a expressão da *uncoupling*

protein 1 (UCP-1), a enzima chave da termogênese, mas não é capaz de, como o T3, aumentar a responsividade adrenérgica e, conseqüentemente, induzir a termogênese [127]. Esses achados sugerem que a estimulação da UCP-1 e o aumento da responsividade adrenérgica são mediados por diferentes isoformas de TR no BAT: TR β e TR α 1, respectivamente. A observação dos efeitos do GC-1 no BAT e no esqueleto levantou as seguintes questões: O GC-1 é incapaz de causar perda de massa óssea porque, como no BAT, é incapaz de aumentar a responsividade do tecido ósseo às catecolaminas? O hormônio tireoideano depende do SNS para regular a massa óssea, assim como depende do simpático para induzir a termogênese? Com o objetivo de responder essas questões, este estudo tem como meta investigar uma possível interação do hormônio tireoideano com o SNS na regulação do remodelamento e da massa óssea.

2.7 Camundongos com inativação gênica dos receptores α_{2A} - e α_{2C} -adrenérgicos como modelo para o estudo da interação do hormônio tireoideano com o SNS na regulação do remodelamento ósseo e da massa óssea

Como dito anteriormente, os receptores α_2 -adrenérgicos são autoreceptores inibitórios pré-sinápticos. Assim sendo, têm um importante papel no SNS, pois regulam (inibem) a liberação de neurotransmissores das terminações nervosas simpáticas e de neurônios adrenérgicos no SNC [128]. Uma evidência disso é que a ativação desses receptores no tronco cerebral leva a uma redução do tônus simpático [86, 129].

Hein *et al.* [87], através da inativação dos genes dos receptores adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} e α_{2A}/α_{2C} de camundongos, mostraram que os subtipos α_{2A} e α_{2C} são requeridos para o controle pré-sináptico normal da liberação de noradrenalina dos nervos simpáticos no coração e dos neurônios noradrenérgicos centrais. Mostraram ainda, que o receptor adrenérgico α_{2A} inibe a liberação de noradrenalina quando estimulado em alta freqüência, enquanto que o receptor adrenérgico α_{2C} modula a neurotransmissão em baixa freqüência de estimulação nervosa. Além disso, mostraram que a regulação de alta e baixa freqüências parecem ser importantes fisiologicamente, uma vez que camundongos com a dupla inativação dos receptores

α_{2A} e α_{2C} (camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}) apresentaram concentrações plasmáticas elevadas de noradrenalina e desenvolveram hipertrofia cardíaca, o que configura aumento do tônus simpático [87].

Os animais α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} apresentam cardiomiopatia induzida pela hiperatividade simpática, redução da capacidade de exercício, diminuição do consumo máximo de oxigênio e significativas anormalidades na ultraestrutura dos cardiomiócitos [92]. Também foi observado um aumento na mortalidade a partir dos 6 meses de idade. Além disso, os estudos de Brum *et al.* [92] também mostraram que, apesar do elevado tônus simpático, não foi observada dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos durante a resposta cronotrópica máxima ao isoproterenol.

O fenótipo ósseo dos camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-} ainda não havia sido investigado. Considerando-se os vários estudos que mostraram que o SNS regula negativamente a massa óssea [3, 4, 9], nós acreditávamos que esses animais apresentassem massa óssea reduzida. Vale ressaltar que a caracterização do fenótipo ósseo desses animais foi, também, um objetivo deste estudo.

Independentemente do fenótipo ósseo, esses animais representam um modelo importante de elevação crônica do tônus simpático. Assim sendo, nós acreditávamos que o tratamento com T3 causasse uma osteopenia mais intensa nos camundongos α_{2A}/α_{2C} -AR^{-/-}, em relação a animais selvagens, o que seria mais uma forte evidência de que o hormônio tireoideano interage com o SNS para regular a fisiologia óssea.

7 CONCLUSÃO

- O fato do propranolol (antagonista β -adrenérgico) e do isoproterenol (agonista β -adrenérgico) limitar e intensificar, respectivamente, os efeitos deletérios da tireotoxicose no esqueleto sugere que o hormônio tireoideano interage com o SNS via sinalização β_2 -adrenérgica para regular a fisiologia óssea.
- A inativação dos receptores adrenérgicos α_{2A} e α_{2C} resulta em fenótipo de alta massa óssea, devido ao aumento da formação e redução da reabsorção óssea presente nestes animais;
- O fato dos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ apresentarem HBM a despeito do seu elevado tônus simpático e de uma sinalização β_2 -adrenérgica intacta, sugere que o β_2 -AR não é o único receptor adrenérgico envolvido no controle do metabolismo ósseo. Além disso, levanta a hipótese de que a sinalização dos α_{2A} e/ou α_{2C} -AR também possa mediar as ações do SNS no esqueleto;
- A resistência dos animais $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}\text{-AR}^{-/-}$ à osteopenia induzida pelo T3, sugere que o hormônio tireoideano interage com SNS não só através de receptores β_2 -adrenérgicos, mas também através de receptores α adrenérgicos, especialmente, via α_{2C} -AR, uma vez que estes receptores foram regulados negativamente pelo T3 somente nos animais selvagens;
- Nossos resultados também sugerem que o hormônio tireoideano age negativamente na massa óssea através do β_1 -AR e da via da OPG, e que esta via seja provavelmente modulada pelo SNS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- [1] Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. *Acta Med Scand.* 1978;204(1-2):97-102.
- [2] Kragstrup J, Melsen F, Mosekilde L. Effects of thyroid hormone(s) on mean wall thickness of trabecular bone packets. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1981;3(3):181-5.
- [3] Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell.* 2002 Nov 1;111(3):305-17.
- [4] Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature.* 2005 Mar 24;434(7032):514-20.
- [5] Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *The Journal of clinical investigation.* 1991 Jan;87(1):125-32.
- [6] Pijl H, de Meijer PH, Langius J, Coenegracht CI, van den Berk AH, Chandie Shaw PK, et al. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2001 Dec;86(12):5848-53.
- [7] Rude RK, Oldham SB, Singer FR, Nicoloff JT. Treatment of thyrotoxic hypercalcemia with propranolol. *The New England journal of medicine.* 1976 Feb 19;294(8):431-3.
- [8] Beylot M, Vincent M, Benzoni D, Bodson A, Riou JP, Mornex R. [Effects of propranolol and indomethacin upon urinary hydroxyproline in hyperthyroid patients (author's transl)]. *La Nouvelle presse medicale.* 1982 Mar 20;11(13):989-91.
- [9] Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell.* 2000 Jan 21;100(2):197-207.
- [10] Graaf VD. *Anatomia Humana.* Sexta edição ed: Editora Manole 2003.
- [11] Baron R. *Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements.* In: Murray J. Favus MD, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of*

* **De acordo com:**

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Mineral Metabolism. fifth edition ed. Washington, D.C.: The American Society for Bone and Mineral Research 2003:1-8.

[12] Carneiro LCJJ. *Histologia Básica*. Décima Edição ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan 2004.

[13] Gilbert SF, ed. *Developmental biology*. 8th ed. Sunderland: Sinauer Associates 2006.

[14] Puzaz JE. The Osteoblast. In: Favus MJ, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. New York: Raven Press 1993:15-21.

[15] Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcified tissue international*. 1981;33(5):509-12.

[16] Noble BS. The osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008 May 15;473(2):106-11.

[17] Yeh CK, Rodan GA. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. *Calcified tissue international*. 1984;36 Suppl 1:S67-71.

[18] Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *Journal of biomechanics*. 2003 Oct;36(10):1453-9.

[19] Menton DN, Simmons DJ, Orr BY, Plurad SB. A cellular investment of bone marrow. *Anat Rec*. 1982 May;203(1):157-64.

[20] Gray H. *Gray Anatomia*. Trigésima Sétima Edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1995.

[21] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):176-90.

[22] Kahn AJ, Simmons DJ, Krukowski M. Osteoclast precursor cells are present in the blood of preossification chick embryos. *Dev Biol*. 1981 May;84(1):230-4.

[23] Ross FP. Osteoclast Biology and Bone Resorption. In: Rosen V, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 7 ed. Washington: ASBMR 2008:16-21.

[24] Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *Mol Pathol*. 2002 Apr;55(2):65-72.

[25] Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta*. 2001 Nov;313(1-2):95-105.

[26] Harvey CB, O'Shea PJ, Scott AJ, Robson H, Siebler T, Shalet SM, et al. Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function. *Mol Genet Metab*. 2002 Jan;75(1):17-30.

-
- [27] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):175-9.
- [28] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25.
- [29] Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3540-5.
- [30] Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*. 2001 Jun;79(5-6):243-53.
- [31] Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999 May 3;145(3):527-38.
- [32] Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem*. 2005 Dec 16;280(50):41155-64.
- [33] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1991-8.
- [34] Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3):1097-142.
- [35] Wagner M, Magagin S, Maia AL. The Role of Thyroid Hormone on Testicular Development and Function. *J Endocrinol*. 2008 Aug 26.
- [36] Kronenberg HM. *Williams Textbook of Endocrinology*: Saunders, printed by Elsevier 2008.
- [37] Kopp P. The TSH receptor and its role in thyroid disease. *Cell Mol Life Sci*. 2001 Aug;58(9):1301-22.
- [38] Brent GA, Moore DD, Larsen PR. Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Physiol*. 1991;53:17-35.
- [39] Lewinson D, Harel Z, Shenzer P, Silbermann M, Hochberg Z. Effect of thyroid hormone and growth hormone on recovery from hypothyroidism of epiphyseal growth plate cartilage and its adjacent bone. *Endocrinology*. 1989 Feb;124(2):937-45.

-
- [40] Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23(1):38-89.
- [41] Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid.* 2002 Jun;12(6):441-6.
- [42] Davis PJ, Davis FB, Lawrence WD. Thyroid hormone regulation of membrane Ca²⁺(+)-ATPase activity. *Endocr Res.* 1989;15(4):651-82.
- [43] Goulart da Silva F, Giannocco G, Santos MF, Nunes MT. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology.* 2006 Dec;147(12):5777-85.
- [44] Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 2008 May;29(2):211-8.
- [45] Bell A, Gagnon A, Dods P, Papineau D, Tiberi M, Sorisky A. TSH signaling and cell survival in 3T3-L1 preadipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Oct;283(4):C1056-64.
- [46] Davies T, Marians R, Latif R. The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(2):161-4.
- [47] Klein JR. Physiological relevance of thyroid stimulating hormone and thyroid stimulating hormone receptor in tissues other than the thyroid. *Autoimmunity.* 2003 Sep-Nov;36(6-7):417-21.
- [48] Prummel MF, Brokken LJ, Meduri G, Misrahi M, Bakker O, Wiersinga WM. Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Nov;85(11):4347-53.
- [49] Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, et al. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell.* 2003 Oct 17;115(2):151-62.
- [50] Sampath TK, Simic P, Sendak R, Draca N, Bowe AE, O'Brien S, et al. Thyroid-stimulating hormone restores bone volume, microarchitecture, and strength in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2007 Jun;22(6):849-59.
- [51] Bassett JH, Williams AJ, Murphy E, Boyde A, Howell PG, Swinhoe R, et al. A lack of thyroid hormones rather than excess thyrotropin causes abnormal skeletal development in hypothyroidism. *Mol Endocrinol.* 2008 Feb;22(2):501-12.
- [52] Bassett JH, Williams GR. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone.* 2008 Sep;43(3):418-26.
- [53] Gouveia CH. [The molecular and structural effects of thyroid hormone in bones]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004 Feb;48(1):183-95.

- [54] Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res.* 1997 Dec;12(12):2098-107.
- [55] Diamond T, Vine J, Smart R, Butler P. Thyrotoxic bone disease in women: a potentially reversible disorder. *Ann Intern Med.* 1994 Jan 1;120(1):8-11.
- [56] Grant DJ, McMurdo ME, Mole PA, Paterson CR. Is previous hyperthyroidism still a risk factor for osteoporosis in post-menopausal women? *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995;43(3):339-45.
- [57] Solomon BL, Wartofsky L, Burman KD. Prevalence of fractures in postmenopausal women with thyroid disease. *Thyroid.* 1993 Spring;3(1):17-23.
- [58] Vestergaard P, Mosekilde L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients. *Thyroid.* 2002 May;12(5):411-9.
- [59] Vestergaard P, Mosekilde L. Hyperthyroidism, bone mineral, and fracture risk--a meta-analysis. *Thyroid.* 2003 Jun;13(6):585-93.
- [60] Toh SH, Claunch BC, Brown PH. Effect of hyperthyroidism and its treatment on bone mineral content. *Arch Intern Med.* 1985 May;145(5):883-6.
- [61] Wakasugi M, Wakao R, Tawata M, Gan N, Inoue M, Koizumi K, et al. Change in bone mineral density in patients with hyperthyroidism after attainment of euthyroidism by dual energy X-ray absorptiometry. *Thyroid.* 1994 Summer;4(2):179-82.
- [62] Vestergaard P, Weeke J, Hoeck HC, Nielsen HK, Rungby J, Rejnmark L, et al. Fractures in patients with primary idiopathic hypothyroidism. *Thyroid.* 2000 Apr;10(4):335-40.
- [63] Rizzoli R, Poser J, Burgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism.* 1986 Jan;35(1):71-4.
- [64] Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology.* 1987 May;120(5):1873-81.
- [65] LeBron BA, Pekary AE, Mirell C, Hahn TJ, Hershman JM. Thyroid hormone 5'-deiodinase activity, nuclear binding, and effects on mitogenesis in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res.* 1989 Apr;4(2):173-8.
- [66] Kasono K, Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Stimulation of alkaline phosphatase activity by thyroid hormone in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1): a possible mechanism of hyperalkaline phosphatasia in hyperthyroidism. *Bone Miner.* 1988 Sep;4(4):355-63.

- [67] Allain TJ, Yen PM, Flanagan AM, McGregor AM. The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *Eur J Clin Invest*. 1996 May;26(5):418-25.
- [68] Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*. 1997 Aug;21(2):137-42.
- [69] Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology*. 2000 Oct;141(10):3887-97.
- [70] Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, Soares AG, Passarelli M, Scanlan TS, et al. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR β -selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Nov;285(5):E1135-E41.
- [71] Machado AB. *Neuroanatomia Funcional*. 2ª edição ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogum 1993.
- [72] Hoffmann BB, Lefkowitz RJ. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. . In: Hardman JG, Limbird LE, eds. *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill 1996:199-248.
- [73] Civantos Calzada B, Aleixandre de Artinano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res*. 2001 Sep;44(3):195-208.
- [74] Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1994 Jun;46(2):121-36.
- [75] Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews*. 2005 Oct;85(4):1159-204.
- [76] Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell and tissue research*. 2006 Nov;326(2):541-51.
- [77] Rang HP. *Farmacologia*. 4ª edição ed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora guanabara Koogum 2001.
- [78] Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Aug;283(2):R287-95.
- [79] Rokosh DG, Simpson PC. Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9474-9.

-
- [80] Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, et al. Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Oct 14;94(21):11589-94.
- [81] Tanoue A, Koba M, Miyawaki S, Koshimizu TA, Hosoda C, Oshikawa S, et al. Role of the alpha1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension*. 2002 Jul;40(1):101-6.
- [82] Tanoue A, Koshimizu TA, Tsujimoto G. Transgenic studies of alpha(1)-adrenergic receptor subtype function. *Life sciences*. 2002 Sep 27;71(19):2207-15.
- [83] Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, et al. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Mar;109(6):765-75.
- [84] O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A, Swigart PM, Rodrigo MC, Simpson GL, et al. The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Jun;111(11):1783-91.
- [85] MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE. Central hypotensive effects of the alpha2a-adrenergic receptor subtype. *Science (New York, NY)*. 1996 Aug 9;273(5276):801-3.
- [86] Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, et al. Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha2A-adrenergic receptor knockout mice. *Molecular pharmacology*. 1999 Jul;56(1):154-61.
- [87] Hein L, Altman JD, Kobilka BK. Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature*. 1999 Nov 11;402(6758):181-4.
- [88] Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, et al. Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science (New York, NY)*. 1996 Aug 9;273(5276):803-5.
- [89] Sawamura S, Kingery WS, Davies MF, Agashe GS, Clark JD, Kobilka BK, et al. Antinociceptive action of nitrous oxide is mediated by stimulation of noradrenergic neurons in the brainstem and activation of [alpha]2B adrenoceptors. *J Neurosci*. 2000 Dec 15;20(24):9242-51.
- [90] Scheinin M, Sallinen J, Haapalinna A. Evaluation of the alpha2C-adrenoceptor as a neuropsychiatric drug target studies in transgenic mouse models. *Life sciences*. 2001 Apr 6;68(19-20):2277-85.
- [91] Brede M, Nagy G, Philipp M, Sorensen JB, Lohse MJ, Hein L. Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003 Aug;17(8):1640-6.

- [92] Brum PC, Kosek J, Patterson A, Bernstein D, Kobilka B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Nov;283(5):H1838-45.
- [93] Philipp M, Brede ME, Hadamek K, Gessler M, Lohse MJ, Hein L. Placental alpha(2)-adrenoceptors control vascular development at the interface between mother and embryo. *Nature genetics*. 2002 Jul;31(3):311-5.
- [94] Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP, Jr., Barsh GS, et al. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 9;93(14):7375-80.
- [95] Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):16694-700.
- [96] Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK, Hein L. Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Molecular pharmacology*. 2001 Nov;60(5):955-62.
- [97] Susulic VS, Frederich RC, Lawitts J, Tozzo E, Kahn BB, Harper ME, et al. Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene. *J Biol Chem*. 1995 Dec 8;270(49):29483-92.
- [98] Revelli JP, Preitner F, Samec S, Muniesa P, Kuehne F, Boss O, et al. Targeted gene disruption reveals a leptin-independent role for the mouse beta3-adrenoceptor in the regulation of body composition. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Sep 1;100(5):1098-106.
- [99] Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK. Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 1999 Jun 11;274(24):16701-8.
- [100] Bachman ES, Dhillon H, Zhang CY, Cinti S, Bianco AC, Kobilka BK, et al. betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science (New York, NY)*. 2002 Aug 2;297(5582):843-5.
- [101] Philipp M, Hein L. Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther*. 2004 Jan;101(1):65-74.
- [102] Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*. 1996 Nov 1;87(3):377-89.
- [103] Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
- [104] Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, Shintani M, Miyanaga F, Aizawa-Abe M, et al. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipoatrophic diabetes. *Diabetes*. 2001 Jun;50(6):1440-8.

-
- [105] Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 1997 Jan 10;88(1):131-41.
- [106] Eleftheriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, et al. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):3258-63.
- [107] Thomas SA, Matsumoto AM, Palmiter RD. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature*. 1995 Apr 13;374(6523):643-6.
- [108] Thomas SA, Palmiter RD. Examining adrenergic roles in development, physiology, and behavior through targeted disruption of the mouse dopamine beta-hydroxylase gene. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)*. 1998;42:57-60.
- [109] Bliziotis M, McLoughlin S, Gunness M, Fumagalli F, Jones SR, Caron MG. Bone histomorphometric and biomechanical abnormalities in mice homozygous for deletion of the dopamine transporter gene. *Bone*. 2000 Jan;26(1):15-9.
- [110] Bjurholm A, Kreicbergs A, Terenius L, Goldstein M, Schultzberg M. Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *Journal of the autonomic nervous system*. 1988 Dec;25(2-3):119-25.
- [111] Shi Y, Yadav VK, Suda N, Liu XS, Guo XE, Myers MG, Jr., et al. Dissociation of the neuronal regulation of bone mass and energy metabolism by leptin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 23;105(51):20529-33.
- [112] Lewin S, Gouveia CH, Marone MM, Wehba S, Malvestiti LF, Bianco AC. [Vertebral and femoral bone mineral density of 724 caucasian Brazilian women: influence of age and body weight]. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*. 1997 Apr-Jun;43(2):127-36.
- [113] Schwartzman RJ. New treatments for reflex sympathetic dystrophy. *The New England journal of medicine*. 2000 Aug 31;343(9):654-6.
- [114] Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 2004 Jan;19(1):19-24.
- [115] Cavalie H, Lac G, Lebecque P, Chanteranne B, Davicco MJ, Barlet JP. Influence of clenbuterol on bone metabolism in exercised or sedentary rats. *J Appl Physiol*. 2002 Dec;93(6):2034-7.
- [116] Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Richard O, et al. Severe bone alterations under beta2 agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone*. 2005 Nov;37(5):622-33.

-
- [117] Pataki A, Muller, K., Bilbe, G., Green, J.R., Glatt, M. Anabolic effects of beta2-agonists, formoterol and salbutamol on cancellous bone ovariectomized (OVX) rat. . Bone. 1996;9(a):A116.
- [118] Bonnet N, Beaupied H, Vico L, Dolleans E, Laroche N, Courteix D, et al. Combined effects of exercise and propranolol on bone tissue in ovariectomized rats. J Bone Miner Res. 2007 Apr;22(4):578-88.
- [119] Bonnet N, Gadois C, McCloskey E, Lemineur G, Lespessailles E, Courteix D, et al. Protective effect of beta blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. Bone. 2007 May;40(5):1209-16.
- [120] Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. Jama. 2004 Sep 15;292(11):1326-32.
- [121] Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen BR, Kolthoff N, Brixen K, et al. Fracture risk in perimenopausal women treated with beta-blockers. Calcified tissue international. 2004 Nov;75(5):365-72.
- [122] Levasseur R, Dargent-Molina P, Sabatier JP, Marcelli C, Breart G. Beta-blocker use, bone mineral density, and fracture risk in older women: results from the Epidemiologie de l'Osteoporose prospective study. Journal of the American Geriatrics Society. 2005 Mar;53(3):550-2.
- [123] Reid IR, Lucas J, Wattie D, Horne A, Bolland M, Gamble GD, et al. Effects of a beta-blocker on bone turnover in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2005 Sep;90(9):5212-6.
- [124] Kim B, Carvalho-Bianco SD, Larsen PR. Thyroid hormone and adrenergic signaling in the heart. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004 Feb;48(1):171-5.
- [125] Tse J, Gandhi A, Yan L, He YQ, Weiss HR. Effects of triiodothyronine pretreatment on beta-adrenergic responses in stunned cardiac myocytes. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia. 2003 Aug;17(4):486-90.
- [126] Carvalho-Bianco SD, Kim BW, Zhang JX, Harney JW, Ribeiro RS, Gereben B, et al. Chronic cardiac-specific thyrotoxicosis increases myocardial beta-adrenergic responsiveness. Molecular endocrinology (Baltimore, Md. 2004 Jul;18(7):1840-9.
- [127] Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, et al. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. The Journal of clinical investigation. 2001 Jul;108(1):97-105.
- [128] Miller RJ. Presynaptic receptors. Annual review of pharmacology and toxicology. 1998;38:201-27.
- [129] Ruffolo RR, Jr., Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. Structure and function of alpha-adrenoceptors. Pharmacol Rev. 1991 Dec;43(4):475-505.

- [130] Link RE, Stevens MS, Kulatunga M, Scheinin M, Barsh GS, Kobilka BK. Targeted inactivation of the gene encoding the mouse alpha 2c-adrenoceptor homolog. *Molecular pharmacology*. 1995 Jul;48(1):48-55.
- [131] Bianco AC, Silva JE. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology*. 1987 Jan;120(1):55-62.
- [132] Carneiro-Ramos MS, Silva VB, Santos RA, Barreto-Chaves ML. Tissue-specific modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) in hyperthyroidism. *Peptides*. 2006 Nov;27(11):2942-9.
- [133] Miyabara EH, Aoki MS, Moriscot AS. Cyclosporin A preferentially attenuates skeletal slow-twitch muscle regeneration. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2005 Apr;38(4):559-63.
- [134] Freitas FR, Capelo LP, O'Shea PJ, Jorgetti V, Moriscot AS, Scanlan TS, et al. The thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats. *J Bone Miner Res*. 2005 Feb;20(2):294-304.
- [135] Naffah-Mazzacoratti M, Fernandes MJ., Cavaleiro EA. Serum catecholamine levels determined by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo* 1992;36:119-22.
- [136] Monte JC, Casarini D, Parise E, Schor N, dos Santos OF. Neurohumoral systems in patients with cirrhosis. *Renal failure*. 1997 Mar;19(2):335-42.
- [137] Mazess RB, Barden HS, Eberle RW, Denton MD. Age changes of spine density in posterior-anterior and lateral projections in normal women. *Calcified tissue international*. 1995 Mar;56(3):201-5.
- [138] Einhorn TA. Bone biomechanics. In: Marcus R, Feldman D KJ, (EDS) *Osteoporosis academic press.*, ed. San Diego, California, USA. 1996:17-22.
- [139] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987 Dec;2(6):595-610.
- [140] Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor--a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone*. 1992;13(4):327-30.
- [141] Hildebrand T, Ruegsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering*. 1997;1(1):15-23.
- [142] Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone*. 1997 Apr;20(4):315-28.

-
- [143] Livak K. ABI Prism 7700 Sequence Detection system, User bulletin 2. PE Applied Biosystems. 1997.
- [144] Liu W, Saint DA. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002 Jun 7;294(2):347-53.
- [145] William GL. *The Thyroid Gland*. John Dyson. 21 ed. Philadelphia, PA.: W. B. Saunders Company 1989:1480-500.
- [146] Villicev CM, Freitas FR, Aoki MS, Taffarel C, Scanlan TS, Moriscot AS, et al. Thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 increases energy expenditure and prevents fat-mass accumulation in rats. *The Journal of endocrinology*. 2007 Apr;193(1):21-9.
- [147] White P, Burton KA, Fowden AL, Dauncey MJ. Developmental expression analysis of thyroid hormone receptor isoforms reveals new insights into their essential functions in cardiac and skeletal muscles. *Faseb J*. 2001 Jun;15(8):1367-76.
- [148] Angeras U, Hasselgren PO. Protein turnover in different types of skeletal muscle during experimental hyperthyroidism in rats. *Acta endocrinologica*. 1985 May;109(1):90-5.
- [149] Ongphiphadhanakul B, Alex S, Braverman LE, Baran DT. Excessive L-thyroxine therapy decreases femoral bone mineral densities in the male rat: effect of hypogonadism and calcitonin. *J Bone Miner Res*. 1992 Oct;7(10):1227-31.
- [150] Ishihara C, Kushida K, Takahashi M, Koyama S, Kawana K, Atsumi K, et al. Effect of thyroid hormone on bone and mineral metabolism in rat: evaluation by biochemical markers. *Endocr Res*. 1997 Aug;23(3):167-80.
- [151] Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Benhamou CL, Courteix D. Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006 Sep;318(3):1118-27.
- [152] Weinstein RS. True strength. *J Bone Miner Res*. 2000 Apr;15(4):621-5.
- [153] Bacurau AV, Jardim MA, Ferreira JC, Bechara LR, Bueno CR, Jr., Albaloureiro TC, et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. *J Appl Physiol*. 2009 May;106(5):1631-40.
- [154] Lafontan M, Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev*. 1995 Dec;16(6):716-38.
- [155] Gesta S, Hejnova J, Berlan M, Daviaud D, Crampes F, Stich V, et al. In vitro and in vivo impairment of alpha2-adrenergic receptor-dependent antilipolysis by fatty acids in human adipose tissue. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2001 Dec;33(12):701-7.

-
- [156] Martineau L, Horan MA, Rothwell NJ, Little RA. Salbutamol, a beta 2-adrenoceptor agonist, increases skeletal muscle strength in young men. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Nov;83(5):615-21.
- [157] Maltin CA, Delday MI, Watson JS, Heys SD, Nevison IM, Ritchie IK, et al. Clenbuterol, a beta-adrenoceptor agonist, increases relative muscle strength in orthopaedic patients. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Jun;84(6):651-4.
- [158] de Vries F, Pouwels S, Bracke M, Leufkens HG, Cooper C, Lammers JW, et al. Use of beta-2 agonists and risk of hip/femur fracture: a population-based case-control study. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. 2007 Jun;16(6):612-9.
- [159] Bonnet N, Benhamou CL, Beaupied H, Laroche N, Vico L, Dolleans E, et al. Doping dose of salbutamol and exercise: deleterious effect on cancellous and cortical bones in adult rats. *J Appl Physiol*. 2007 Apr;102(4):1502-9.
- [160] Bonnet N, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada MN, Collomp K, Benhamou CL, et al. Alteration of trabecular bone under chronic beta2 agonists treatment. *Medicine and science in sports and exercise*. 2005 Sep;37(9):1493-501.
- [161] Frost HM, Schonau E. The "muscle-bone unit" in children and adolescents: a 2000 overview. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000 Jun;13(6):571-90.
- [162] Angel NZ, Walsh N, Forwood MR, Ostrowski MC, Cassady AI, Hume DA. Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *J Bone Miner Res*. 2000 Jan;15(1):103-10.
- [163] Bassett JH, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2003 Oct;14(8):356-64.
- [164] Takeda S. Central control of bone remodeling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005 Mar 18;328(3):697-9.
- [165] Takeda S, Karsenty G. Central control of bone formation. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2001;19(3):195-8.
- [166] Liu W, Xu D, Yang H, Xu H, Shi Z, Cao X, et al. Functional identification of three receptor activator of NF-kappa B cytoplasmic motifs mediating osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54759-69.
- [167] Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *Journal of cellular physiology*. 1990 May;143(2):213-21.
- [168] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of cellular physiology*. 1990 Jun;143(3):420-30.

- [169] Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. I: Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *The American journal of medicine*. 1993 Nov 30;95(5A):11S-6S.
- [170] Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996 Aug 1;382(6590):448-52.
- [171] Bonnet N, Benhamou CL, Malaval L, Goncalves C, Vico L, Eder V, et al. Low dose beta-blocker prevents ovariectomy-induced bone loss in rats without affecting heart functions. *Journal of cellular physiology*. 2008 Dec;217(3):819-27.
- [172] Pierroz DD, Baldock, P., Bouxsein, M. L., Ferrari, S. L. . Low cortical bone mass in mice lacking beta 1 e beta 2 adrenergic receptors is associated with low bone formation and circulating IGF-I. *J Bone Miner Res*. 2006;21(s):s277.
- [173] Hajjar RJ, Muller FU, Schmitz W, Schnabel P, Bohm M. Molecular aspects of adrenergic signal transduction in cardiac failure. *J Mol Med*. 1998 Oct;76(11):747-55.
- [174] Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation*. 2000 Apr 11;101(14):1634-7.
- [175] Navegantes LC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2002 May;5(3):281-6.
- [176] Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle & nerve*. 2002 May;25(5):729-34.
- [177] Pierroz DD, Bouxsein ML, Rizzoli R, Ferrari SL. Combined treatment with a beta-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. *Bone*. 2006 Aug;39(2):260-7.
- [178] Takeda S, Eleftheriou F, Karsenty G. Common endocrine control of body weight, reproduction, and bone mass. *Annual review of nutrition*. 2003;23:403-11.
- [179] Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2008 Apr-Jun;8(2):94-104.
- [180] Bouxsein ML, Devlin MJ, Glatt V, Dhillon H, Pierroz DD, Ferrari SL. Mice lacking beta-adrenergic receptors have increased bone mass but are not protected from deleterious skeletal effects of ovariectomy. *Endocrinology*. 2009 Jan;150(1):144-52.
- [181] Pierroz DDM, P., Glantt, V., Bouxsein, M., Rizzoli, R. Ferrari, S.L. β 1 β 2-Adrenergic receptor KO mice have decreased total body and cortical bone mass despite increased trabecular number. *J Bone Miner Res*. 2004;19(s):s32.
- [182] Nishiura T, Abe K. Alpha1-adrenergic receptor stimulation induces the expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand gene via protein

kinase C and extracellular signal-regulated kinase pathways in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Archives of oral biology*. 2007 Aug;52(8):778-85.

[183] Starke K, Endo T, Taube HD. Pre- and postsynaptic components in effect of drugs with alpha adrenoceptor affinity. *Nature*. 1975 Apr 3;254(5499):440-1.

[184] Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V, Hein L. alpha2-adrenergic receptor subtypes - novel functions uncovered in gene-targeted mouse models. *Biol Cell*. 2004 Jun;96(5):343-8.

[185] Levey GS, Klein I. Catecholamine-thyroid hormone interactions and the cardiovascular manifestations of hyperthyroidism. *The American journal of medicine*. 1990 Jun;88(6):642-6.

[186] Sanford CF, Griffin EE, Wildenthal K. Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation research*. 1978 Nov;43(5):688-94.

[187] Siehl D, Chua BH, Lautensack-Belser N, Morgan HE. Faster protein and ribosome synthesis in thyroxine-induced hypertrophy of rat heart. *The American journal of physiology*. 1985 Mar;248(3 Pt 1):C309-19.

[188] Hu LW, Liberti EA, Barreto-Chaves ML. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats. *Virchows Arch*. 2005 Mar;446(3):265-9.

[189] Soukup T, Zacharova G, Smerdu V, Jirmanova I. Body, heart, thyroid gland and skeletal muscle weight changes in rats with altered thyroid status. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2001;50(6):619-26.

[190] Yu F, Degens H, Li X, Larsson L. Gender- and age-related differences in the regulatory influence of thyroid hormone on the contractility and myosin composition of single rat soleus muscle fibres. *Pflugers Arch*. 1998 Dec;437(1):21-30.

[191] Bassett JH, O'Shea PJ, Sriskantharajah S, Rabier B, Boyde A, Howell PG, et al. Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2007 May;21(5):1095-107.

[192] Kanatani M, Sugimoto T, Sowa H, Kobayashi T, Kanzawa M, Chihara K. Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKL-RANK interaction. *Journal of cellular physiology*. 2004 Oct;201(1):17-25.

[193] Varga F, Spitzer S, Klaushofer K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype. *Calcified tissue international*. 2004 Apr;74(4):382-7.

[194] Amato G, Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Lalli E, Biondi B, et al. High serum osteoprotegerin levels in patients with hyperthyroidism: effect of medical treatment. *Bone*. 2004 Sep;35(3):785-91.

[195] Guang-Da X, Hui-Ling S, Zhi-Song C, Lin-Shuang Z. Alteration of plasma concentrations of OPG before and after levothyroxine replacement therapy in hypothyroid patients. *Journal of endocrinological investigation*. 2005 Dec;28(11):965-72.

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

[197] Compston J. Bone quality: what is it and how is it measured? *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Aug;50(4):579-85.