

# ***O Efeito Molecular e Estrutural do Hormônio Tiroideano no Esqueleto***

*revisão*

## RESUMO

**Cecília H.A. Gouveia**

O hormônio tiroideano é essencial para o desenvolvimento, maturação e metabolismo ósseos normais. Durante o desenvolvimento, a deficiência do hormônio tiroideano resulta em atraso na maturação do esqueleto e disgênese das epífises, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas. O hormônio tiroideano também tem efeito no osso do adulto. A tirotóxicose é freqüentemente associada ao aumento do metabolismo ósseo e diminuição da massa óssea. Embora a importância do hormônio tiroideano no desenvolvimento e metabolismo ósseos seja clara, os mecanismos que medeiam os efeitos desse hormônio no tecido ósseo apenas começam a ser desvendados. O hormônio tiroideano pode atuar indiretamente no esqueleto, aumentando a secreção de hormônio do crescimento (GH) e *insulin-like growth factor-1* (IGF-1); ou diretamente, modulando genes alvo via receptores nucleares específicos. Não se sabe, entretanto, se os principais efeitos do hormônio tiroideano no osso são resultado de ações diretas ou indiretas. Achados *in vitro*, tais como a presença de receptores de hormônio tiroideano (TR) e a indução de genes e proteínas em células esqueléticas pelo hormônio tiroideano, evidenciam a importância de ações diretas. Esta revisão tem como meta sumarizar os achados *in vivo* e *in vitro* relacionados aos efeitos do hormônio tiroideano no esqueleto. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/1:183-195)

**Descritores:** Hipertireoidismo; Hipotireoidismo; Massa óssea; Remodelamento ósseo; Desenvolvimento ósseo; Osteoporose

*Departamento de Anatomia,  
Instituto de Ciências Biomédicas,  
Universidade de São Paulo,  
São Paulo, SP.*

## ABSTRACT

**The Molecular and Structural Effects of Thyroid Hormone in the Skeleton.** During development, thyroid hormone deficiency results in delayed skeletal maturation and epiphyseal dysgenesis, resulting in reduced growth and skeletal abnormalities. Thyroid hormone also has effects on bones of adults. Thyrotoxicosis is frequently associated with increased bone turnover and decreased bone mass. However, the mechanisms that mediate its effects on bone tissue are poorly understood. Thyroid hormone acts indirectly in the skeleton, by increasing the secretion of growth hormone and insulin-like growth factor-1; or directly, by modulating target genes via specific nuclear receptors. *In vitro* findings, such as the presence of thyroid receptors (TRs) and the induction of genes and proteins in skeletal cells by thyroid hormone, emphasize the importance of direct actions. The aim of this review is to summarize the *in vivo* and *in vitro* findings related to the effects of thyroid hormone on the skeleton. (Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/1:183-195)

**Keywords:** Hyperthyroidism; Hypothyroidism; Bone mass; Bone remodeling; Bone development; Osteoporosis

*Recebido em 20/10/03  
Aceito em 30/10/03*

**E**MBORA O HORMÔNIO TIROIDEANO seja conhecido há várias décadas como um potente regulador do desenvolvimento e metabolismo ósseos, os mecanismos de ação do hormônio tiroideano no esqueleto são pouco entendidos. Avanços na identificação dos mecanismos moleculares de ação do hormônio tiroideano (1) e no entendimento da fisiologia óssea têm servido como base para o entendimento dos mecanismos de ação do hormônio tiroideano no esqueleto. Esta revisão tem como meta sumarizar os achados *in vivo* e *in vitro* relacionados aos efeitos do hormônio tiroideano no esqueleto.

### O Remodelamento Ósseo

Ao longo da vida, o tecido ósseo é continuamente renovado em um processo finamente regulado, chamado de remodelamento ósseo. Esse processo envolve o acoplamento da atividade dos osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea, e dos osteoclastos, células multinucleadas gigantes responsáveis pela reabsorção óssea. Esse acoplamento é determinado por uma constante troca de sinais entre os osteoblastos e osteoclastos. O remodelamento ósseo ocorre em pequenas unidades de células chamadas de unidades de remodelamento ósseo (BRUs, *bone remodeling units*), que são observadas em vários sítios das superfícies ósseas. A seqüência de eventos em um sítio de remodelamento, ou seja, em uma BRU, é a ativação-reabsorção-formação (ARF). As superfícies ósseas quiescentes são recobertas por células de superfície ou de revestimento (*flat bone-lining cells*). Em resposta a um estímulo de reabsorção, as células de superfície se retraem e expõem a superfície celular; ao mesmo tempo, ocorre a diferenciação, ativação e migração dos osteoclastos aos sítios de reabsorção (superfície exposta). Os osteoclastos reabsorvem o osso velho e formam uma lacuna, chamada de lacuna de Howship. Finalmente, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam a matriz extracelular (osteóide) que, após um período de amadurecimento (aproximadamente 10 dias), será mineralizada. Ao final de cada ciclo de remodelamento, a quiescência é restaurada. O produto final do remodelamento ósseo é a manutenção da integridade óssea (2).

O remodelamento ósseo é regulado por uma variedade de hormônios sistêmicos e fatores locais que atuam nas linhagens de células osteoblásticas e/ou osteoclásticas, exercendo os seus efeitos na proliferação de células indiferenciadas e no recrutamento, diferenciação celular e/ou ativação celular (3). Os principais hormônios sistêmicos que regulam o metabolismo ósseo, denominados hormônios calciotrópicos, incluem o hormônio paratiróideo (PTH), o metabólito

ativo da vitamina D, a  $1,25(\text{OH})_2\text{VD}$  (VD), e a calcitonina. Além desses, o hormônio tiroideano juntamente com a insulina, o GH, os glicocorticóides e os hormônios sexuais possuem profundos efeitos na fisiologia e estrutura ósseas. Há evidências de que esses hormônios atuam sinérgica ou antagonicamente para a manutenção do metabolismo ósseo. Ao longo dessa revisão, algumas possíveis interações entre o hormônio tiroideano com esses hormônios serão apresentadas.

### O Hormônio Tiroideano e o Remodelamento Ósseo

Em condições normais, o hormônio tiroideano ativa tanto a síntese quanto a degradação da matriz óssea, sendo, portanto, importante para a manutenção da integridade do esqueleto. Estudos histomorfométricos em humanos e animais experimentais mostram que, em condições de excesso do hormônio tiroideano, a atividade dos osteoblastos e osteoclastos está aumentada, com predomínio da última (4-6). Como resultado, o metabolismo ósseo está acelerado, favorecendo a reabsorção, balanço negativo do cálcio e perda de massa óssea. O aumento do metabolismo ósseo na tirotoxicose é caracterizado por aumento do número de osteoclastos, das superfícies de erosão, da taxa de formação e mineralização ósseas, bem como aumento do número de BRUs (4-6). O ciclo de remodelamento ósseo (ARF), que normalmente é de 200 dias em humanos, é reduzido primariamente por causa de uma diminuição da duração do período de formação (7,8). Assim sendo, na tirotoxicose há uma inabilidade de se repor completamente o osso reabsorvido em cada BRU. A consequência desse desbalanço, que ocorrerá em praticamente todos os sítios de remodelamento, é um pronunciado afinamento das trabéculas ósseas, levando a uma diminuição do seu número e volume e aumento da separação entre elas, com eventual reabsorção trabecular. No osso cortical, observa-se aumento da porosidade e diminuição da espessura; esta última em função do aumento da reabsorção endosteal (8). Em contraste, no hipotireoidismo há uma marcante diminuição do metabolismo ósseo e, em cada BRU do osso trabecular, nota-se um balanço positivo (9). Contudo, como resultado do baixo remodelamento ósseo, apenas pequenos aumentos na massa óssea podem ser observados (9). A análise histomorfométrica de indivíduos hipotiróides indica diminuição da atividade osteoblástica e osteoclástica. No osso trabecular da crista ilíaca, observou-se redução da profundidade dos sítios de reabsorção óssea, diminuição da taxa de reabsorção óssea, prolongamento do período de formação óssea e diminuição da taxa de deposição e mine-

ralização da matriz extracelular (9). Este último efeito, entretanto, não reflete um defeito na mineralização do esqueleto, mas sim um aumento do tempo de formação óssea (9). No osso cortical, a porosidade não sofre alteração, mas observa-se redução da atividade osteoclástica e aumento da sua espessura (9,10).

#### Expressão de Receptores de Hormônio Tiroideano em Células Esqueléticas

A presença de receptores de hormônio tiroideano (TRs) foi identificada primeiramente em linhagens de células osteoblato-*like* de ratos (ROS17/2.8 cells, UMR-106) (11-13) e camundongos (MC3T3-E1) (14) através de estudos de *binding*. Estudos similares identificaram sítios de ligação de hormônio tiroideano também no núcleo de células de culturas primárias de ratos adultos (15) e de células de calvárias de camundongos (16). Aumentos na secreção de osteocalcina (13,15) e na atividade da fosfatase alcalina (14,15) nessas células, quando tratadas com triiodotironina ( $T_3$ ), sugeriram um acoplamento dos TRs com as respostas biológicas ao hormônio tiroideano. Posteriormente, a presença de mRNA e proteína das isoformas TR 1, TR 2 e TR 1 foram identificadas em células de osteossarcoma de ratos (17-19) e em osteoblastos humanos (20). Williams e cols. (18) demonstraram que as isoformas TR 1 e TR 1 estão presentes, funcionalmente e em proporções variadas, em três linhagem de células de osteossarcoma que expressam fenótipos de fibroblasto, preosteoblasto, e osteoblasto maduro (ROS 25/1, UMR 106 e ROS17/2.8, respectivamente), o que sugere uma possível mudança na ação do hormônio tiroideano durante o desenvolvimento ósseo. De fato, essas células apresentaram diferentes respostas ao tratamento com  $T_3$ .

A identificação de TRs em osteoclastos ocorreu mais recentemente. Allain e cols. (17) identificaram a presença de todas as isoformas conhecidas de TR, com exceção de TR 2, no núcleo de células osteoclásticas humanas, originárias de osteoclastoma. Abu e cols. (20) confirmaram a presença de TRs em osteoclastos humanos através de hibridização *in situ*.

A presença de TRs também foi demonstrada nos condrócitos das placas epifisárias de crescimento de humanos (20) e de ratos (21,22). Em camundongos, demonstrou-se que, tanto os condrócitos da zona de reserva e proliferativa expressam TR 1, TR 2 e TR 1, enquanto que TRs não foram detectados em condrócitos hipertróficos (22). Em humanos, TRs foram detectadas em todas as zonas da placa de crescimento, incluindo a zona hipertrófica (20).

Um achado importante foi a identificação das isoformas e de receptores de hormônio tiroideano

na medula óssea de camundongos, bem como em células do estroma da medula (23). A medula óssea é um componente extremamente importante para a fisiologia óssea, uma vez que contém células hematopoiéticas e estromais que, por sua vez, incluem células precursoras dos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente. A presença de TRs nessas células sugere uma ação direta do hormônio tiroideano na diferenciação osteoclástica e/ou osteoblástica.

Além de TRs, mostrou-se que células osteoblásticas de ratos, camundongos e humanas também expressam receptores de TSH (TSH-R). Mostrou-se, ainda, que o TSH aumenta a produção de cAMP nessas células, o que sugere que os TSH-Rs expressos nos osteoblastos são funcionais (24). Entretanto, esses receptores e o seu papel no metabolismo ósseo ainda necessitam ser melhor caracterizados.

A co-expressão de TRs com os receptores de ácido retinóico (RXR e RAR) (25) e o receptor da VD (VDR) (18) em células esqueléticas, juntamente com a demonstração de que há uma complexa interação entre o ácido retinóico e a VD para regular a especificidade da ação do  $T_3$  em células ósseas (19), sugere que há um fino balanço entre os níveis fisiológicos dos respectivos receptores nucleares e ligantes. É possível que esse balanço seja um dos principais determinantes da especificidade de resposta das células ósseas a diferentes condições hormonais. Assim sendo, as ações do  $T_3$  não devem ser consideradas de forma isolada, mas deve-se esperar que TRs interajam com VDR, RXR e RAR nos elementos responsivos do hormônio tiroideano (TREs) dos genes alvos do hormônio tiroideano no tecido ósseo. Um interação mútua entre receptores nucleares e de membrana também foi descrita em células osteoblásticas. Em um estudo recente, demonstrou-se que o PTH aumenta o número de TRs, ao mesmo tempo em que o  $T_3$  induz a expressão de receptores de PTH em células ROS 17/2.8, o que sugere um sinergismo entre esses dois hormônios na regulação do metabolismo ósseo (26).

#### Efeitos do Hormônio Tiroideano em Células Ósseas

##### *Efeitos do Hormônio Tiroideano nos Osteoblastos*

Em osteoblastos isolados, o  $T_3$  estimula a produção de mRNA e de proteínas associadas com a formação da matriz óssea, tais com a fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno (11,13-15). O  $T_3$  também aumenta os níveis de mRNA de IGF-1 em células osteoblásticas de camundongos (27) e ratos (28). Através da técnica de

*Differential Display*, identificamos aproximadamente 195 genes candidatos a regulados pelo T<sub>3</sub> em células ROS 17/2.8. Dentre eles, identificamos dois genes positivamente regulados pelo T<sub>3</sub>, a *nonmuscle alkali myosin light chain* (NM aMLC) e ATPase-6; entretanto, os papéis desses genes no metabolismo ósseo ainda precisam ser esclarecidos (29). Apesar de todos esses genes se mostrarem responsivos ao hormônio tiroideano em osteoblastos, praticamente não se sabe como o T<sub>3</sub> regula a sua expressão. Em células ROS 17/2.8, mostramos que o T<sub>3</sub> estimula a expressão da osteocalcina, uma das proteínas não colágenas mais abundantes da matriz extracelular, a nível transcricional e pós transcricional (30); entretanto, em experimentos de transfecção, o T<sub>3</sub> foi incapaz de ativar o promotor da osteocalcina de rato (30). Recentemente, Varga e cols. (31) identificaram um TRE no promotor do gene da osteocalcina de camundongos. Assim sendo, a osteocalcina de camundongo parece ser o primeiro gene identificado como diretamente regulado pelo T<sub>3</sub> em osteoblastos. Dois outros genes responsivos ao T<sub>3</sub> em osteoblastos são as metaloproteinases de matriz (MMP): a colagenase 3 (ou MMP-13) e gelatinase B (ou MMP-9) (32). As MMPs compreendem uma família de enzimas proteolíticas envolvidas no remodelamento ósseo e na morfogênese (33). A MMP-13, por exemplo, parece ter a função de digerir a matriz óssea ainda não mineralizada (osteóide) para dar início à reabsorção pelos osteoclastos (34). Acredita-se que esse processo seja bastante importante, uma vez que os osteoclastos são incapazes de se acoplarem a superfícies ósseas não mineralizadas. Mostrou-se que MMP-13 e a MMP-9 são reguladas pelo T<sub>3</sub> a nível transcricional; entretanto, TREs ainda não foram identificados nos seus genes (32).

O hormônio tiroideano também apresenta efeitos na proliferação osteoblástica. Alguns estudos mostraram que o T<sub>3</sub> tem efeito positivo (35,36), outros mostraram um efeito inibitório (14) e outros não encontraram efeito (12,13,18). Efeitos do T<sub>3</sub> na diferenciação celular também têm sido descritos. Varga e cols. (37) mostraram que, em células MC3T3-E1, o T<sub>3</sub> atua como um regulador da diferenciação osteoblástica deprimindo genes relacionados especificamente à proliferação celular (histona H4 e c-fos/c-jun) e induzindo a expressão de genes fenotípicos, tais como a osteocalcina e fosfatase alcalina. Por outro lado, Ohishi e cols. (38) mostraram que, em calvárias de ratos em cultura, o T<sub>3</sub> suprime a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, mas aumenta a atividade funcional de osteoblastos maduros. Na literatura, há também variações do efeito do hormônio tiroideano na expressão da IGF-1 e dos marcadores fenotípicos dos osteoblastos, o

que provavelmente é explicado pelos diferentes tipos de células osteoblásticas estudadas e pelas diferentes condições de culturas, tais como número de passagens, grau de confluência e dose de hormônio tiroideano administrada. De qualquer forma, os efeitos do hormônio tiroideano somados à expressão de TRs em células osteoblásticas evidenciam uma ação direta do hormônio tiroideano nos osteoblastos e na regulação do remodelamento ósseo, uma vez que os osteoblastos possuem um papel central nesse processo.

#### Efeitos do Hormônio Tiroideano nos Osteoclastos

Clinicamente, a tirotoxicose é associada com aumento da atividade osteoclástica (39), mas, *in vitro*, o T<sub>3</sub> não afeta a atividade de osteoclastos isolados no sentido de aumentar a reabsorção óssea (40,41). Essas células dependem da presença de osteoblastos para se tornarem responsivas ao T<sub>3</sub> (40,41). Demonstrou-se que o T<sub>3</sub> recruta e ativa osteoclastos em culturas de ossos de roedores por um mecanismo modulado pelos osteoblastos (40). Recentemente, demonstrou-se que o T<sub>3</sub> aumenta a expressão do mRNA do ligante do *receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B* (RANKL) em células pré-osteoblásticas (42). O RANKL é uma molécula chave para a osteoclastogênese e ativação osteoclástica. Ele é sintetizado e secretado pelos osteoblastos e se liga ao seu receptor, o RANK, expresso em células precursoras dos osteoclastos, o que ativa a osteoclastogênese (43).

A significância da expressão de TRs nos osteoclastos ainda necessita ser elucidada. Entretanto, a possibilidade de que os osteoclastos possam exibir uma resposta direta, entretanto, mais lenta ao hormônio tiroideano, não pode ser excluída. Mostrou-se que, em culturas isoladas de osteoclastos de rato, o T<sub>3</sub> aumenta a expressão das integrinas 3 e 5, proteínas importantes para o acoplamento dos osteoclastos às superfícies ósseas (44). Tal ação poderia facilitar a reabsorção óssea; entretanto, não é suficiente para induzi-la em um curto período de tempo (24 horas). O fato de que não é possível manter culturas de osteoclastos, livres de osteoblastos ou de fatores osteoblásticos, além de 24 horas dificulta a elucidação da importância de tais efeitos. De qualquer forma, a presença de TRs em osteoclastos suporta a visão de que o T<sub>3</sub> tem efeitos diretos e indiretos nos osteoclastos e enfatiza a necessidade de futuros estudos para a identificação e caracterização da natureza e importância de cada um desses efeitos.

Com relação à ativação osteoclástica, incluindo a osteoclastogênese, há evidências de que o T<sub>3</sub> e VD atuam de forma sinérgica. Demonstrou-se que TRs e VDRs, além de receptores de estrógeno e andrógeno,

estão co-expressos na medula óssea de camundongos (23), o que é um pré-requisito para tal sinergismo. Estudos mostram que o  $T_3$  aumenta, de forma permissiva, o efeito da VD na osteoclastogênese em um processo dependente da interleucina-6 (IL-6) (45), uma citocina que possui papel fundamental nesse processo. Uma observação importante é o fato de que a osteoclastogênese dependente da IL-6 é completamente bloqueada pelo 17 $\beta$ -estradiol (46). Esses achados poderiam, parcialmente, explicar o aumento da reabsorção óssea na tirotoxicose e porquê doses elevadas de reposição de levo-tiroxina (L- $T_4$ ) durante a pós-menopausa representam um risco adicional para o desenvolvimento da osteoporose. Miura e cols. (42) também encontraram sinergismo entre as ações do  $T_3$  e VD na osteoclastogênese. Em co-culturas de pré-osteoblastos com células da medula óssea, o  $T_3$  aumentou a formação osteoclástica induzida pela VD. Um achado interessante foi o fato de que o  $T_4$  apresentou o mesmo efeito, o que sugeriu que ele era metabolizado localmente a  $T_3$ . Esse achado levou à identificação da expressão do mRNA da desidrodase das iodotironinas do tipo 2 (D2), uma das enzimas que convertem  $T_4$  a  $T_3$ , em células pré-osteoblásticas. Demonstrou-se, ainda, que a VD aumenta a expressão da D2 nessas células de maneira dependente da dose e do tempo, o que indica um novo mecanismo de sinergismo entre a VD e o  $T_3$  na osteoclastogênese (42).

#### Efeito do Hormônio Tiroideano no Esqueleto

##### *Os Camundongos Geneticamente Modificados e o Esqueleto*

A deleção (*knockout*) e mutação (*knockin*) dos receptores de hormônio tiroideano em camundongos têm sido importantes ferramentas para desvendar o papel de cada uma das isoformas de TR nas diversas respostas ao  $T_3$ . Esses modelos também têm sido importantes para a identificação do tecido ósseo como um importante alvo do hormônio tiroideano.

Camundongos com a deleção isolada do TR 1 (TR 1 $^{-/-}$ ) (47) ou TR 2 (TR 2 $^{-/-}$ ) (48) praticamente não apresentam alteração evidente no tecido ósseo. Por outro lado, camundongos com a deleção simultânea de TR 1 e TR 2 (TR 1/2 $^{-/-}$ ) (49) e camundongos com a deleção de ambos os receptores e [TR 1 $^{-/-}$ TR 2 $^{-/-}$  (50) e TR 1 $^{-/-}$ TR 2 $^{-/-}$  (51)] apresentam praticamente o mesmo fenótipo de retardo no crescimento e maturação ósseos, similar ao que ocorre no hipotireoidismo congênito (52), mas com menos severidade. O mesmo é visto em camundongos TR 0/0 (53), que não expressam TR 1 e 2, bem

como as isoformas truncadas codificadas pelo locus do TR (TR 1 e TR 2).

Os camundongos TR 1 $^{-/-}$ TR 2 $^{-/-}$  apresentam diminuição pronunciada no comprimento do fêmur, tibia e sexta vértebra lombar, sendo que o local mais afetado é o fêmur (50). A análise histológica desses animais revela placas de crescimento desorganizadas e atraso na ossificação das epífises, enquanto que a densitometria óssea indica diminuição da área óssea sem alteração da densidade. Uma vez que esses camundongos apresentam diminuição no conteúdo de proteína e mRNA de GH na adeno-hipófise e, também, diminuição dos níveis séricos de IGF-1, enquanto que os camundongos TR 1 $^{-/-}$  ou TR 2 $^{-/-}$  praticamente não apresentam alteração do GH, a deficiência de GH foi considerada a causa mais provável do retardo no crescimento ósseo dos camundongos TR 1 $^{-/-}$ TR 2 $^{-/-}$ .

Ao contrário dos camundongos com deleção simultânea do TR 1 e TR 2, que super produzem  $T_3$  e  $T_4$ , os camundongos TR 0/0 apresentam hipotireoidismo progressivo. Assim sendo, inicialmente, considerou-se que o retardo no crescimento dos mutantes TR 0/0 fosse uma consequência dos baixos níveis de  $T_3$  e  $T_4$ . Posteriormente, comparou-se camundongos TR 0/0 e TR 1 $^{-/-}$ TR 2 $^{-/-}$  com 2 semanas de idade e exatamente as mesmas alterações esqueléticas foram observadas (51). Nessa idade, camundongos TR 0/0 e selvagens apresentam concentrações plasmáticas similares de hormônios tiroideanos, o que evita a interferência do hipotireoidismo e sugere efeito direto do hormônio tiroideano no desenvolvimento do fenótipo. O mesmo ocorre com os camundongos TR 0/0 que, em um estado basal, são bioquimicamente eutiróides e apresentam níveis hipofisários normais de GH, mas apresentam alterações importantes no desenvolvimento esquelético (53). Esses achados sugerem efeitos diretos do hormônio tiroideano no esqueleto, independentes do eixo GH/IGF-1.

A falta de alteração evidente do crescimento e maturação ósseos nos camundongos TR 1 $^{-/-}$  e TR 2 $^{-/-}$  sugere um substancial *overlap* da ação desses dois receptores no controle do desenvolvimento ósseo. Além disso, o TR 2 parece ter um papel modulatório importante no desenvolvimento ósseo, uma vez que os mutantes TR 1 $^{-/-}$  (47), ao contrário dos camundongos TR 2 $^{-/-}$  (49), apresentam crescimento e maturação ósseos praticamente normais. O KO do TR 2 resulta em uma super-expressão do TR 1 e em um fenótipo complexo com baixos níveis séricos de  $T_3$  e  $T_4$  livres e níveis normais de TSH, além de redução dos níveis séricos de IGF-1 com níveis normais de GH (mRNA e proteína) na hipófise (54). Os camundongos TR 2 $^{-/-}$

apresentam diminuição do peso corporal, aumento da frequência cardíaca e aumento da temperatura corporal; além de serem obesos e apresentarem alterações esqueléticas. Esses animais apresentam uma pequena redução na taxa de crescimento; entretanto, o comprimento do fêmur e tibia são normais, bem como a espessura da placa de crescimento tibial e a mineralização das epífises. Entretanto, esses animais apresentam diminuição do conteúdo mineral ósseo (BMC) cortical e diminuição das dimensões do osso cortical da tibia. Esses parâmetros são associados com diminuição do crescimento perióstico no adulto e indicam atraso no crescimento em camundongos. Somando-se a isso, o KO do TR 2 resulta em diminuição da densidade mineral óssea (BMD) do fêmur e vértebra, além de diminuição do BMD trabecular da tibia proximal. Assim sendo, os camundongos TR 2<sup>-/-</sup> apresentam um fenótipo misto de hiper e hipotiroidismo, causado pela super-expressão do TR 1, ou falta do TR 2, ou ambos, o que sugere que o balanço entre a expressão do TR 1 e TR 2 compõe um nível adicional de controle do desenvolvimento e metabolismo dos tecidos, incluindo os tecidos esqueléticos (54).

Recentemente, gerou-se camundongos com KO do gene Pax8, que codifica uma proteína necessária para a diferenciação de células tiroideas (55). O único defeito primário desses camundongos é a total falta de células foliculares na tireóide e, portanto, de produção de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (56). A comparação dos camundongos Pax8<sup>-/-</sup> com os camundongos TR<sup>0/0</sup>TR<sup>-/-</sup>, que não expressam todos os TRs, revela fenótipos similares; entretanto, alguns defeitos são mais pronunciados nos camundongos Pax8<sup>-/-</sup>, incluindo defeitos ósseos, tais como desorganização das placas epifisárias de crescimento, diminuição do número de condrócitos hipertróficos, atraso na ossificação do esqueleto e atraso no crescimento (57). Isto é interpretado como um resultado do efeito negativo de TRs não ligados pelo ligante nos genes alvo do T<sub>3</sub>, os quais são denominados aporreceptores (58). O interessante é que o duplo KO Pax8<sup>-/-</sup>TR<sup>-/-</sup> apresenta praticamente o mesmo fenótipo dos camundongos Pax8<sup>-/-</sup>, enquanto que, no duplo KO Pax8<sup>-/-</sup>TR<sup>0/0</sup>, há uma reversão parcial do fenótipo esquelético (57). Esses achados indicam que o aporreceptor TR<sub>β</sub>, mas não o aporreceptor TR<sub>α</sub>, tem efeitos deletérios no desenvolvimento do esqueleto e indicam que o T<sub>3</sub> é necessário para inibir esses efeitos.

Kaneshige e cols. (59) gerou um camundongo *knockin* com uma mutação na região carboxi-terminal (exon 10), derivada de uma paciente com resistência generalizada ao hormônio tiroideano (RTH). Esse

receptor beta, denominado PV, não é capaz de ligar T<sub>3</sub> e é um dos mais potentes mutantes dominantes negativos do TR. Dentre outras alterações, o mutante TR PV, assim como pacientes portadores de RTH, apresenta níveis séricos elevados de TSH e T<sub>4</sub> e alterações esqueléticas severas. Os camundongos mutantes TR PV apresentam crescimento longitudinal ósseo intra-uterino acelerado associado com ossificação intramembranosa e endocondral prematuras levando à quiescência prematura das placas epifisárias de crescimento, o que, por sua vez, resulta em retardo no crescimento pós-natal e menor comprimento corporal, além de craniossinostose. Assim sendo, o esqueleto dos camundongos TR PV é tireotóxico e apresenta características fenotípicas típicas do hipertiroidismo juvenil (60).

O fenótipo desenvolvido por todos esses camundongos mutantes sugere que uma complexa interação das diferentes isoformas de TR com os seus genes alvos medeia os efeitos do hormônio tiroideano no tecido ósseo e apontam o esqueleto como um importante alvo do T<sub>3</sub>. Além disso, mostram que os TRs, independentemente do T<sub>3</sub>, têm efeitos importantes no desenvolvimento do esqueleto.

#### O Efeito do Análogo do Hormônio Tiroideano Seletivo pelo TR<sub>β</sub> GC-1 no Esqueleto

Recentemente, desenvolveu-se o GC-1, um análogo seletivo pelo TR tanto nas suas funções de ligação ao ligante quanto de ativação da transcrição gênica (61). Esse análogo liga-se ao TR com a mesma afinidade que o T<sub>3</sub>, mas com uma afinidade aproximadamente 10 vezes menor pelo TR 1 quando comparado ao T<sub>3</sub>. Essa característica faz do GC-1 uma importante ferramenta para o estudo do papel fisiológico das diferentes isoformas de TR e tem a vantagem de não afetar o equilíbrio entre o TR<sub>α</sub> e TR<sub>β</sub>. Estudos mostram que o GC-1 apresenta ações seletivas no tecido adiposo marrom, no desenvolvimento cerebelar e no metabolismo e desenvolvimento ósseos (62-65). Nós mostramos que o GC-1 parcialmente reverte alterações esqueléticas decorrentes do hipotiroidismo em ratas (64). Ratas hipotiroideas em desenvolvimento tratadas com GC-1 apresentaram placas epifisárias organizadas; entretanto, apresentaram atraso no crescimento e na ossificação do esqueleto, além de baixos níveis de IGF-1. Esse estudo mostrou que o TR<sub>β</sub> medeia ações importantes do T<sub>3</sub> durante o desenvolvimento, e que essas ações são independentes do eixo GH/IGF-1. Em um outro estudo, utilizamos o GC-1 como ferramenta farmacológica para investigar o papel do TR<sub>β</sub> em mediar os efeitos osteopênicos do T<sub>3</sub> em ratas (65). Nós mostramos que

o tratamento crônico com dose supra-fisiológica de  $T_3$  causou uma perda de massa óssea generalizada, enquanto que o tratamento equivalente com GC-1 não alterou a massa óssea. Ao mesmo tempo, o GC-1, assim como o  $T_3$ , promoveu efeitos previamente conhecidos, tais como a redução dos níveis séricos de colesterol e TSH (65). Considerando-se que o GC-1 atua predominantemente via TR $\beta$ , esses achados sugerem que os efeitos osteopênicos do  $T_3$  são mediados pelo TR $\beta$ . A investigação do efeito do GC-1 no esqueleto mostra que o desenvolvimento de análogos seletivos dos TRs, que evitem os efeitos tóxicos do  $T_3$ , tais como perda de massa óssea, tem o potencial de trazer importantes melhorias nas terapias supressivas do TSH, especialmente aquelas de longa duração.

#### Efeitos Divergentes do Hormônio Tiroideano em Diferentes Sítios do Esqueleto

Observações clínicas e experimentais mostram que há uma heterogeneidade das respostas do esqueleto ao hormônio tiroideano. A administração de altas doses de L- $T_4$ , por um período de 3 a 20 semanas, resulta em diminuição da densidade mineral óssea (BMD) no fêmur mas não nas vértebras de ratos (66-70). Essa resposta heterogênea do esqueleto ao hormônio tiroideano foi também observada com relação à expressão gênica de marcadores osteoblásticos e osteoclásticos. Aumento dos níveis de mRNA da osteocalcina (69,70), osteopontina (69), fosfatase alcalina (68-70), fosfatase ácida tartrato-resistente (68,69) e histona H4 (68) foram identificados no fêmur mas não nas vértebras de ratos tratados com altas doses de L- $T_4$ . Em uma tentativa de investigar possíveis diferenças entre osteoblastos femorais e vertebrais, Milne e cols. (28) desenvolveram um sistema *in vitro* onde células da medula óssea do fêmur e das vértebras de ratos adultos foram cultivadas em condições que permitiam a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos capazes de mineralizar a matriz extracelular. Nos osteoblastos de origem femoral,  $T_3$  induziu a expressão do mRNA do colágeno do tipo I e da osteocalcina, mas praticamente não induziu a expressão de IGF-1. Por outro lado, nos osteoblastos de origem vertebral, apenas a expressão do mRNA da IGF-1 foi marcadamente estimulada pelo tratamento com  $T_3$  (28). Esses estudos confirmam a diversidade de respostas ao hormônio tiroideano dependendo do sítio do esqueleto e sugerem que ambos os osteoblastos femorais e vertebrais são responsivos ao hormônio tiroideano. Isso está de acordo com a identificação de TR $\alpha$  1, TR $\alpha$  2 e TR $\beta$  1 no fêmur e vértebras de ratos, bem como nas células osteoblásticas de origem verte-

bral e femural (71). Assim sendo, o diferente padrão de respostas apresentado pelo fêmur e vértebras provavelmente está relacionado à expressão diferenciada de outros fatores regulatórios nessas duas regiões. Um exemplo disso é o padrão de expressão de IGF-1 no esqueleto, que também é dependente da região óssea. Demonstrou-se que a produção dos componentes do sistema da IGF por células ósseas humanas é significativamente diferente dependendo da região do esqueleto. Clinicamente, o excesso de hormônio tiroideano também resulta em perda óssea predominantemente no fêmur (72). Assim sendo, um melhor entendimento das bases moleculares da especificidade da ação hormonal dependente da região óssea deverá facilitar uma terapia de prevenção de aumento da perda óssea femural em pacientes que necessitam de administração de L- $T_4$  em doses supressivas do TSH.

#### Efeito do Hormônio Tiroideano no Crescimento e Maturação do Esqueleto

Estudos clássicos de mais de 40 anos identificaram o hormônio tiroideano como um potente regulador do crescimento e maturação do esqueleto (73,74). A deficiência do hormônio tiroideano na criança é frequentemente associada com retardo ósseo severo, baixa estatura e falha mecânica das placas de crescimento de ambos os quadris (75). Em modelos animais de hipotireoidismo, a deficiência de  $T_3$  resulta em atraso na ossificação do esqueleto e em alterações importantes nas placas de crescimento como redução da espessura, desorganização da cartilagem e impedimento da diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos (73). Por outro lado, o aumento nas concentrações de hormônio tiroideano pode resultar em maturação esquelética acelerada, fechamento prematuro das placas de crescimento e subsequente diminuição do crescimento dos membros e do peso corporal.

O hormônio tiroideano, juntamente com o GH, IGFs, glicocorticóides, estrógenos e andrógenos, representa o principal fator sistêmico que influencia o crescimento e maturação do esqueleto. Os quatro primeiros, durante a infância e os dois últimos, durante a adolescência (76,77). Antes da adolescência, o hormônio tiroideano é considerado o principal pré-requisito para a maturação normal do tecido ósseo (76).

Um dos mecanismos através dos quais o hormônio tiroideano estimula o desenvolvimento ósseo é indiretamente através do aumento da secreção de GH e IGF-1 (78), fatores que apresentam efeitos diretos no tecido ósseo. O GH e o  $T_3$  interagem na estimulação do crescimento ósseo longitudinal e na maturação óssea. O *crossstalk* entre as vias de ação do  $T_3$  e

GH ocorre em vários níveis, incluindo o efeito do  $T_3$  na regulação da transcrição gênica do GH (79) e na estimulação da expressão de IGF-1 *in vivo* e *in vitro* (27,80). Entretanto, há evidências de que o hormônio tiroideano é capaz de atuar diretamente nos condrócitos das placas de crescimento através de mecanismos independentes do GH. Foi mostrado, por exemplo, que, em ratos hipotiróideos, o GH sozinho não é capaz de induzir a organização dos condrócitos da placa de crescimento e promover a diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos (81,82). Recentemente, Robson e cols. (83) mostraram que, em culturas primárias da placa de crescimento da tíbia de ratos, o  $T_3$  atua diretamente inibindo a proliferação dos condrócitos proliferativos, ao mesmo tempo em que promove a sua diferenciação em condrócitos hipertróficos. A presença de TRs nos condrócitos da placa de crescimento de humanos (20) e de ratos sustentam o efeito direto do  $T_3$  no desenvolvimento do esqueleto (21).

Recentemente, duas proteínas sinalizadoras, a *Indian hedgehog* (Ihh) e a *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), foram identificadas como cruciais para a regulação da diferenciação dos condrócitos da placa de crescimento (84). A Ihh, produzida pela camada pré-hipertrófica da placa de crescimento, estimula a produção de PTHrP no pericôndrio. O PTHrP atua na camada proliferativa inibindo a diferenciação celular e, assim, mantendo o estado proliferativo. O resultado desse sistema de *feedback* negativo é o oposto do efeito do  $T_3$ . Um estudo recente demonstrou, em ratos, um aumento da expressão do mRNA do PTHrP no hipotiroidismo e uma redução do receptor do PTHrP na tirotoxicose (85). Esses efeitos correlacionam-se com a disgênese epifisária e atraso no crescimento vistos no hipotiroidismo e com a acelerada taxa de crescimento vistos na tirotoxicose, sugerindo que importantes ações fisiológicas do  $T_3$  na cartilagem epifiseal são mediadas através da alça de *feedback* negativo Ihh/PTHrP-R.

Apesar das fortes evidências de que o hormônio tiroideano tem um efeito direto e fundamental no crescimento e maturação do esqueleto, ainda não é claro se os seus principais efeitos resultam de interações com GH, IGF-1 ou outros sistemas.

#### Efeito do Hormônio Tiroideano no Tecido Ósseo Adulto

##### *O Hipertiroidismo*

Efeitos osteopênicos do hormônio tiroideano foram primeiramente descritos há mais de um século atrás

(86). Hoje, a tirotoxicose evidente é considerada uma das causas da osteoporose secundária (87,88). Estudos revelam diminuição de BMD no fêmur, coluna lombar e antebraço (89-91) e aumento do risco de fraturas em pacientes hipertiróideos não tratados (91,92). Uma meta-análise recente mostrou que o tratamento do hipertiroidismo restaura a massa óssea aos níveis da normalidade, mesmo quando nenhuma medida anti-osteopênica é tomada, a não ser a restauração do status eutiróideo (93). Entretanto, vários estudos mostram reversão apenas parcial da massa óssea após a remissão do hipertiroidismo (89,90,94,95). Franklyn e cols. (96) investigaram o impacto do hipertiroidismo na mortalidade. Neste estudo, mostraram que pacientes hipertiróideos tratados com iodo radioativo apresentavam uma taxa de mortalidade 13% maior do que a população em geral, sendo que o risco de morte foi associado com aumento de doenças cardiovasculares e aumento de fraturas de fêmur. Observou-se um aumento de quase 200% no risco de morte devido às fraturas de fêmur naqueles pacientes. Apesar deste estudo não revelar a influência da severidade ou duração do hipertiroidismo na taxa de mortalidade, esses achados sugerem que maior atenção seja dada às conseqüências do hipertiroidismo no metabolismo ósseo.

##### O Hipertiroidismo Subclínico

Uma grande controvérsia existe com relação ao impacto do hipertiroidismo subclínico, de origem endógena ou exógena, na massa e metabolismo ósseos. Esta condição é caracterizada por redução do TSH e concentração normal de  $T_3$  e  $T_4$  livres no soro. O hipertiroidismo subclínico de origem exógena pode ser observado em pacientes com nódulos tiroideanos ou portadores de carcinoma de tiróide em terapia com L- $T_4$  em doses supressivas do TSH ou em pacientes hipotiróideos em terapia de reposição de hormônio tiroideano. Há substancial evidência de que estes pacientes podem ser facilmente "super" tratados, resultando em redução dos níveis séricos de TSH, mas sem as manifestações clínicas da tirotoxicose. Alguns estudos indicam que não há associação entre essa condição e a redução da massa óssea (97-100), outros encontram associação apenas após a menopausa (101-103) e outros encontram associação tanto na pré- quanto na pós-menopausa (104,105). Uma meta-análise de estudos que mediram o BMD de mulheres recebendo  $T_4$  em doses supressivas do TSH concluiu que esse tratamento leva a um aumento de 1% na taxa anual de perda de massa óssea em mulheres na pós-menopausa (106). Esses dados são parcialmente corroborados por uma outra meta-análise que mostrou que a redução do TSH sérico está associ-



ada com perda de massa óssea vertebral e femural apenas em mulheres na pós-menopausa; por outro lado, este estudo também mostrou que a terapia de reposição de hormônio tiroideano está associada com perda de massa óssea, mas apenas na pré-menopausa (102). Estudos mais recentes, entretanto, mostram que a terapia de reposição com L-T<sub>4</sub>, que mantém os níveis séricos de TSH dentro dos limites de normalidade, não causa perda de massa óssea como foi previamente postulado. De fato, em um amplo estudo prospectivo envolvendo 686 mulheres acima de 65 anos de idade, Bauer e cols. (107) mostraram que o T<sub>4</sub> exógeno aumenta o risco de fraturas vertebrais e femurais apenas quando administrado em doses supressivas do TSH. Resultados similares são encontrados em pacientes com bócio nodular. Faber e cols. (103) detectou redução no BMD femural e vertebral de aproximadamente 2% ao ano em mulheres na pós-menopausa portadoras de bócio nodular que apresentavam níveis normais de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> livres, mas redução dos níveis séricos de TSH. Eles demonstraram que a normalização do TSH, pelo tratamento com iodo radioativo, resultou em cessação da perda de massa óssea. Esses achados estão de acordo com aqueles de Mudde e cols. (108), que normalizaram o TSH sérico de pacientes com hipertiroidismo subclínico com metimazole e encontraram cessação de perda óssea no antebraço. Kumeda e cols. (109) mostraram que portadores de Doença de Graves apresentaram aumento de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo mesmo quando os níveis de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> livres haviam sido normalizados, mas não os níveis séricos de TSH, após terapia com drogas antitiroídeas (tionamidas). Houve uma forte correlação negativa do TSH sérico com a fosfatase alcalina sérica e a piridinolina e desoxipiridinolina urinárias, e uma correlação positiva entre esses marcadores e os artícorpos dos receptores de TSH, um indicador da atividade da doença de Graves; por outro lado, não houve correlação entre os níveis séricos de T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> livres e aqueles marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.

Apesar da permanente controvérsia referente ao hipertiroidismo subclínico representar ou não um fator de risco para a osteoporose, um grande número de estudos mostra uma forte associação entre os níveis séricos de TSH e o metabolismo ósseo, e sugere a necessidade de uma análise cuidadosa na decisão pela administração de T<sub>4</sub> em doses supressivas do TSH. Além disso, estudos também sugerem a necessidade de se normalizar o TSH, além do T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> livres, durante terapia com tionamidas, com o objetivo de se normalizar o metabolismo ósseo. Assim sendo, é prudente considerar que pacientes com hipertiroidismo subclíni-

co sejam pertencentes a um grupo de risco da osteoporose, especialmente porque muitos deles podem permanecer nesta condição por período prolongado.

#### O Hipotiroidismo

Como já foi discutido anteriormente nesta revisão, o hipotiroidismo está associado com redução do metabolismo ósseo. Nessa condição, a massa óssea pode estar ligeiramente aumentada ou permanecer inalterada. Vestergaard e cols. (110) demonstraram que o hipotiroidismo primário idiopático resulta em aumento no risco de fraturas de antebraço em indivíduos com idade acima de 50 anos. Mais recentemente, foi mostrado que o aumento no risco de fraturas em pacientes hipotiroídeos ocorre antes e após o diagnóstico (92). Considerando-se que a massa óssea do adulto praticamente não se altera no hipotiroidismo, o aumento no risco de fraturas está provavelmente associado com uma redução da qualidade óssea e/ou outros fatores, incluindo o aumento da tendência de quedas.

#### CONCLUSÕES

Esta revisão mostra que o hormônio tiroideano é um importante regulador do desenvolvimento e metabolismo ósseos e, portanto, da integridade óssea. A presença de TRs nos osteoblastos, osteoclastos, condrócitos e em células da medula óssea sugere que ações diretas do T<sub>3</sub> nessas células são importantes para o desenvolvimento e fisiologia do esqueleto. O fato de que o hormônio tiroideano aumenta a expressão de vários genes osteoblásticos relacionados com a formação da matriz óssea *in vivo* e *in vitro* evidencia o T<sub>3</sub> como uma molécula reguladora da formação óssea. Ao mesmo tempo, a indução da reabsorção óssea pelo T<sub>3</sub> evidencia um importante papel desse hormônio na regulação desse processo, seja ele no sentido de ativar a osteoclastogênese e/ou a atividade osteoclástica. As alterações ósseas observadas em camundongos com deleção ou mutação de TRs reafirmam a importância do hormônio tiroideano na fisiologia esquelética e sugerem que uma complexa interação das diferentes isoformas de TR com os seus genes alvo medeia as ações do T<sub>3</sub> no esqueleto. Os estudos desenvolvidos com o GC-1 sugerem que as diferentes isoformas de TR medeiam ações seletivas do T<sub>3</sub> no metabolismo e desenvolvimento do esqueleto, e mostram que o desenvolvimento de análogos seletivos dos TRs, que evitem efeitos tóxicos do T<sub>3</sub>, tais como a perda de massa óssea, têm o potencial de trazer importantes melhorias para as terapias supressivas do TSH.

## REFERÊNCIAS

1. Motomura K, Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27:1-23.
2. Mundy GRaC D, Oyajobi BO. Bone remodeling. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 5<sup>th</sup> ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2003.p.46-58.
3. Canalis E. Osteogenic Growth Factors. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 5<sup>th</sup> ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2003.p.28-31.
4. Allain TJ, Thomas MR, McGregor AM, Salisbury JR. A histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. *Bone* 1995;16:505-9.
5. Mosekilde L, Melsen F, Christensen MS. Interrelationships between bone morphometry, thyroid function tests and serum parathyroid hormone in hyperthyroidism. *Calcif Tissue Res* 1977;22 Suppl:229-35.
6. Mosekilde L, Melsen F, Bagger JP, Myhre-Jensen O, Schwartz Sorensen N. Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1977;85:515-25.
7. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and bone balance in hyperthyroidism. *Bone* 1985;6:421-8.
8. Melsen F, Mosekilde L. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hyperthyroidism. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1977;85A:141-50.
9. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. *Bone* 1986;7:101-8.
10. 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;3:181-5.
11. Rizzoli R, Poser J, Burgi U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells. *Metabolism* 1986;35:71-4.
12. LeBron BA, Pekary AE, Mirell C, Hahn TJ, Hershman JM. Thyroid hormone 5'-deiodinase activity, nuclear binding, and effects on mitogenesis in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res* 1989;4:173-8.
13. 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;120:1873-81.
14. Kasono K, Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Stimulation of alkaline phosphatase activity by thyroid hormone in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1): a possible mechanism of hyperalkaline phosphatasia in hyperthyroidism. *Bone Miner* 1988;4:355-63.
15. Egrise D, Martin D, Neve P, Verhas M, Schoutens A. Effects and interactions of 17 beta-estradiol, T<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on cultured osteoblasts from mature rats. *Bone Miner* 1990;11:273-83.
16. Krieger NS, Stappenbeck TS, Stern PH. Characterization of specific thyroid hormone receptors in bone. *J Bone Miner Res* 1988;3:473-8.
17. Allain TJ, Yen PM, Flanagan AM, McGregor AM. The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *Eur J Clin Invest* 1996;26:418-25.
18. Williams GR, Bland R, Sheppard MC. Characterization of thyroid hormone (T<sub>3</sub>) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T<sub>3</sub>, vitamin D<sub>3</sub>, and retinoid signaling. *Endocrinology* 1994;135:2375-85.
19. Williams GR, Bland R, Sheppard MC. Retinoids modify regulation of endogenous gene expression by vitamin D<sub>3</sub> and thyroid hormone in three osteosarcoma cell lines. *Endocrinology* 1995;136:4304-14.
20. Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone* 1997;21:137-42.
21. Ballock R, Mita BC, Zhou X, Chen DH, Mink LM. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in rat growth plate cartilage *in vivo*. *J Bone Miner Res* 1999;14:1550-6.
22. Stevens DA, Hasserjian RP, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* 2000;15:2431-42.
23. Gruber R, Czerwenka K, Wolf F, Ho GM, Willheim M, Peterlik M. Expression of the vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor alpha- and beta-isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone* 1999;24:465-73.
24. Inoue M, Tawata M, Yokomori N, Endo T, Onaya T. Expression of thyrotropin receptor on clonal osteoblast-like rat osteosarcoma cells. *Thyroid* 1998;8:1059-64.
25. Bland R, Sammons RL, Sheppard MC, Williams GR. Thyroid hormone, vitamin D and retinoid receptor expression and signaling in primary cultures of rat osteoblastic and immortalised osteosarcoma cells. *J Endocrinol* 1997;154:63-74.
26. Gu WX, Stern PH, Madison LD, Du GG. Mutual up-regulation of thyroid hormone and parathyroid hormone receptors in rat osteoblastic osteosarcoma 17/2.8 cells. *Endocrinology* 2001;142:157-64.
27. Varga F, Rumpler M, Klaushofer K. Thyroid hormones increase insulin-like growth factor mRNA levels in the clonal osteoblastic cell line MC3T3-E1. *FEBS Lett* 1994;345:67-70.
28. Milne M, Kang MI, Quail JM, Baran DT. Thyroid hormone excess increases insulin-like growth factor I transcripts in bone marrow cell cultures: divergent effects on vertebral and femoral cell cultures. *Endocrinology* 1998;139:2527-34.
29. Gouveia CH, Schultz JJ, Jackson DJ, Williams GR, Brent GA. Thyroid hormone gene targets in ROS 17/2.8 osteoblast-like cells identified by differential display analysis. *Thyroid* 2002;12:663-71.
30. Gouveia CH, Schultz JJ, Bianco AC, Brent GA. Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Endocrinol* 2001;170:667-75.

31. Varga F, Spitzer S, Rumpler M, Klaushofer K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits thyroid hormone-induced osteocalcin expression in mouse osteoblast-like cells via a thyroid hormone response element. *J Mol Endocrinol* 2003;30:49-57.
32. Pereira RC, Jorgetti V, Canalis E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):E496-504.
33. Filanti C, Dickson GR, Di Martino D, et al. The expression of metalloproteinase-2, -9, and -14 and of tissue inhibitors-1 and -2 is developmentally modulated during osteogenesis *in vitro*, the mature osteoblastic phenotype expressing metalloproteinase-14. *J Bone Miner Res* 2000;15:2154-68.
34. Kusano K, Miyaura C, Inada M, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998;139:1338-45.
35. Ernst M, Froesch ER. Triiodothyronine stimulates proliferation of osteoblast-like cells in serum-free culture. *FEBS Lett* 1987;220:163-6.
36. Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. Effects of triiodothyronine on DNA synthesis and differentiation markers of normal human osteoblast-like cells *in vitro*. *Biochem Mol Biol Int* 1993;30:779-88.
37. Varga F, Rumpler M, Luegmayer E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Klaushofer K. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/C-jun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif Tissue Int* 1997;61:404-11.
38. Ohishi K, Ishida H, Nagata T, et al. Thyroid hormone suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells to osteoblasts, but enhances functional activities of mature osteoblasts in cultured rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 1994;161:544-52.
39. Allain TJ, McGregor AM. Thyroid hormones and bone. *J Endocrinol* 1993;139:9-18.
40. Allain TJ, Chambers TJ, Flanagan AM, McGregor AM. Triiodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *J Endocrinol* 1992;133:327-31.
41. Britto JM, Fenton AJ, Holloway WR, Nicholson GC. Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 1994;134:169-76.
42. Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, et al. Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *J Bone Miner Res* 2002;17:443-54.
43. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3540-5.
44. Holly S SK, Martim J. *J Bone Miner Res* 1993;8(Suppl):S136.
45. Schiller C, Gruber R, Ho GM, et al. Interaction of triiodothyronine with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on interleukin-6-dependent osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow cell cultures. *Bone* 1998;22:341-6.
46. Schiller C, Gruber R, Redlich K, et al. 17Beta-estradiol antagonizes effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on interleukin-6 production and osteoclast-like cell formation in mouse bone marrow primary cultures. *Endocrinology* 1997;138:4567-71.
47. Wikstrom L, Johansson C, Salto C, et al. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *Embo J* 1998;17:455-61.
48. Forrest D, Erway LC, Ng L, Altschuler R, Curran T. Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. *Nat Genet* 1996;13:354-7.
49. Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, et al. The T<sub>3</sub>R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *Embo J* 1997;16:4412-20.
50. Gothe S, Wang Z, Ng L, et al. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* 1999;13:1329-41.
51. Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, et al. Different functions for the thyroid hormone receptors TR<sub>1</sub> and TR<sub>2</sub> in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *Embo J* 1999;18:623-31.
52. Ohlsson C, Isgaard J, Tornell J, Nilsson A, Isaksson OG, Lindahl A. Endocrine regulation of longitudinal bone growth. *Acta Paediatr Suppl* 1993;82 Suppl 391:33-40;discussion 1.
53. Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, et al. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol Cell Biol* 2001;21:4748-60.
54. Salto C, Kindblom JM, Johansson C, et al. Ablation of TR 2 and a concomitant overexpression of alpha1 yields a mixed hypo- and hyperthyroid phenotype in mice. *Mol Endocrinol* 2001;15:2115-28.
55. Pasca di Magliano M, Di Lauro R, Zannini M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13144-9.
56. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 1998;19:87-90.
57. Flamant F, Pogue AL, Plateroti M, et al. Congenital hypothyroid Pax8<sup>-/-</sup> mutant mice can be rescued by inactivating the TR<sub>1</sub> gene. *Mol Endocrinol* 2002;16:24-32.
58. Hu X, Lazar MA. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:6-10.
59. Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X, et al. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta-receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13209-14.
60. O'Shea PJ, Harvey CB, Suzuki H, et al. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 2003;17:1410-24.
61. Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chem Biol* 1998;5:299-306.
62. Trost SU, Swanson E, Gloss B, et al. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology* 2000;141:3057-64.

63. Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, et al. Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *J Clin Invest* 2001;108:97-105.
64. Freitas FRZT, Labatte C, Scanlan TS, Brent GA, Moriscot AS, Bianco AC, et al. Effects of the thyroid hormone receptor beta-selective compound GC-1 on bone development of Wistar rats. In: **74<sup>th</sup> annual meeting of the American thyroid association**; Los Angeles, CA; 2002.
65. Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, et al. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR - selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E1135-E41.
66. 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;12:2098-107.
67. Ongphiphadhanakul B, Alex S, Braverman LE, Baran DT. Excessive L-thyroxine therapy decreases femoral bone mineral densities in the male rat: effect of hypogonadism and calcitonin. *J Bone Miner Res* 1992;7:1227-31.
68. Ongphiphadhanakul B, Jenis LG, Braverman LE, et al. Etidronate inhibits the thyroid hormone-induced bone loss in rats assessed by bone mineral density and messenger ribonucleic acid markers of osteoblast and osteoclast function. *Endocrinology* 1993;133:2502-7.
69. Suwanwalaikorn S, Ongphiphadhanakul B, Braverman LE, Baran DT. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats. *Eur J Endocrinol* 1996;134:655-9.
70. Suwanwalaikorn S, Van Auken M, Kang MI, Alex S, Braverman LE, Baran DT. Site selectivity of osteoblast gene expression response to thyroid hormone localized by *in situ* hybridization. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 1):E212-7.
71. Milne M, Kang MI, Cardona G, et al. Expression of multiple thyroid hormone receptor isoforms in rat femoral and vertebral bone and in bone marrow osteogenic cultures. *J Cell Biochem* 1999;74:684-93.
72. Diamond T, Nery L, Hales I. A therapeutic dilemma: suppressive doses of thyroxine significantly reduce bone mineral measurements in both premenopausal and postmenopausal women with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1184-8.
73. Ray RD, Asling CW, Walker DG, Simpson ME, Li CH, Evans HM. Growth and differentiation of the skeleton in thyroidectomized-hypophysectomized rats treated with thyroxin, growth hormone, and combination. *J Bone Joint Surg Am* 1954;36-A:94-103.
74. Asling CW, Simpson ME, Li CH, Evans HM. The effects of chronic administration of thyroxin to hypophysectomized rats on their skeletal growth, maturation and response to growth hormone. *Anat Rec* 1954;119:101-17.
75. Wells D, King JD, Roe TF, Kaufman FR. Review of slipped capital femoral epiphysis associated with endocrine disease. *J Pediatr Orthop* 1993;13:610-4.
76. Underwood LVW. Normal and aberrant growth. In: Wilson JF, ed. **Williams' Textbook of endocrinology**. Philadelphia: WB Saunders; 1992.p.1079-138.
77. Weiss RE, Refetoff S. Effect of thyroid hormone on growth. Lessons from the syndrome of resistance to thyroid hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;25:719-30.
78. Hervas F, Morreale de Escobar G, Escobar Del Rey F. Rapid effects of single small doses of L-thyroxine and triiodo-L-thyronine on growth hormone, as studied in the rat by radioimmunoassay. *Endocrinology* 1975;97:91-101.
79. Schaufele F, West BL, Baxter JD. Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 1992;6:656-65.
80. Huang BK, Golden LA, Tarjan G, Madison LD, Stern PH. Insulin-like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2000;15:188-97.
81. Ballock RT, Reddi AH. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J Cell Biol* 1994;126:1311-8.
82. 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;124:937-45.
83. 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;141:3887-97.
84. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996;273:613-22.
85. Kindblom JM RH, Stevens DA, Siebler T, Gothe S, Tornell J, Forrest D, et al. Regulation of the *Ihh*/PTHrP Negative Loop in Growth Plate of Mice Lacking All Known Thyroid Hormone Receptors. *J Bone Miner Res* 1999;14(Suppl 1):S140.
86. Recklinghausen V. Die fibrose oder deformierende ostitis, die osteomalazie und die osteoplastische karcinose in ihren gegenseitigen beziehungen. Berlin; 1891.
87. Fraser SA, Anderson JB, Smith DA, Wilson GM. Osteoporosis and fractures following thyrotoxicosis. *Lancet* 1971;1:981-3.
88. Fallon MD, Perry HM 3rd, Bergfeld M, Droke D, Teitelbaum SL, Avioli LV. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. *Arch Intern Med* 1983;143:442-4.
89. Diamond T, Vine J, Smart R, Butler P. Thyrotoxic bone disease in women: a potentially reversible disorder. *Ann Intern Med* 1994;120:8-11.
90. 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;43:339-45.
91. Solomon BL, Wartofsky L, Burman KD. Prevalence of fractures in postmenopausal women with thyroid disease. *Thyroid* 1993;3:17-23.
92. Vestergaard P, Mosekilde L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients. *Thyroid* 2002;12:411-9.

93. Vestergaard P, Mosekilde L. Hyperthyroidism, bone mineral, and fracture risk — a meta-analysis. *Thyroid* 2003;13:585-93.
94. Toh SH, Claunuch BC, Brown PH. Effect of hyperthyroidism and its treatment on bone mineral content. *Arch Intern Med* 1985;145:883-6.
95. Wakasugi M, Wakao R, Tawata M, et al. Change in bone mineral density in patients with hyperthyroidism after attainment of euthyroidism by dual energy X-ray absorptiometry. *Thyroid* 1994;4:179-82.
96. Franklyn JA, Maisonneuve P, Sheppard MC, Betteridge J, Boyle P. Mortality after the treatment of hyperthyroidism with radioactive iodine. *N Engl J Med* 1998;338:712-8.
97. Zelmanovitz F, Genro S, Gross JL. Suppressive therapy with levothyroxine for solitary thyroid nodules: a double-blind controlled clinical study and cumulative meta-analyses. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3881-5.
98. Rosen HN, Moses AC, Garber J, et al. Randomized trial of pamidronate in patients with thyroid cancer: bone density is not reduced by suppressive doses of thyroxine, but is increased by cyclic intravenous pamidronate. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2324-30.
99. Muller CG, Bayley TA, Harrison JE, Tsang R. Possible limited bone loss with suppressive thyroxine therapy is unlikely to have clinical relevance. *Thyroid* 1995;5:81-7.
100. Hanna FW, Pettit RJ, Ammari F, Evans WD, Sandeman D, Lazarus JH. Effect of replacement doses of thyroxine on bone mineral density. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:229-34.
101. Foldes J, Tarjan G, Szathmari M, Varga F, Krasznai I, Horvath C. Bone mineral density in patients with endogenous subclinical hyperthyroidism: is this thyroid status a risk factor for osteoporosis? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:521-7.
102. Uzzan B, Campos J, Cucherat M, Nony P, Boissel JP, Perret GY. Effects on bone mass of long term treatment with thyroid hormones: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4278-89.
103. Faber J, Jensen IW, Petersen L, Nygaard B, Hegedus L, Siersbaek-Nielsen K. Normalization of serum thyrotrophin by means of radioiodine treatment in subclinical hyperthyroidism: effect on bone loss in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:285-90.
104. Lehmke J, Bogner U, Felsenberg D, Peters H, Schleusener H. Determination of bone mineral density by quantitative computed tomography and single photon absorptiometry in subclinical hyperthyroidism: a risk of early osteopaenia in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;36:511-7.
105. Wesche MF, Tiel VBMM, Lips P, Smits NJ, Wiersinga WM. A randomized trial comparing levothyroxine with radioactive iodine in the treatment of sporadic nontoxic goiter. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:998-1005.
106. Faber J, Galloe AM. Changes in bone mass during prolonged subclinical hyperthyroidism due to L-thyroxine treatment: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 1994;130:350-6.
107. Bauer DC, Ettinger B, Nevitt MC, Stone KL. Risk for fracture in women with low serum levels of thyroid-stimulating hormone. *Ann Intern Med* 2001;134:561-8.
108. Mudde AH, Houben AJ, Nieuwenhuijzen Kruseman AC. Bone metabolism during anti-thyroid drug treatment of endogenous subclinical hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;41:421-4.
109. Kumeda Y, Inaba M, Tahara H, et al. Persistent increase in bone turnover in Graves' patients with subclinical hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4157-61.
110. Vestergaard P, Weeke J, Hoeck HC, et al. Fractures in patients with primary idiopathic hypothyroidism. *Thyroid* 2000;10:335-40.

Endereço para correspondência:

Cecilia H.A. Gouveia  
Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo  
Av. Prof. Lineu Prestes 2415  
05508-900 São Paulo, SP  
Fax: (11) 3091-7366  
e.mail: cgouveia@usp.br