

EFEITOS SÍTIO-ÓSSEO DEPENDENTES NO FÊMUR E VÉRTEBRA DE RATAS COM DISFUNÇÕES TIREOIDIANAS

BONE SITE-DEPENDENT EFFECTS ON FEMUR AND VERTEBRAE OF FEMALE RATS WITH THYROID DYSFUNCTIONS

JANKERLE NEVES BOELONI¹, JUNEIO FREITAS SILVA², FLÁVIA DO CARMO MAGALHÃES¹, ALFREDO MIRANDA GOES², ROGÉRIA SERAKIDES¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar as diferenças sítio-ósseo dependentes no efeito das disfunções tireoidianas no fêmur e vértebras lombares de ratas. **Métodos:** 33 ratas *Wistar* com dois meses de idade foram distribuídas em três grupos: eutireoideas (controle), hipotireoideas e hipertireoideas. Após 90 dias de tratamento para indução do hipo e hipertireoidismo, as ratas foram eutanasiadas, o sangue foi colhido para dosagem de T4 livre e os fêmures e as vértebras lombares (L1-L3) foram descalcificados e processados para análise da porcentagem de tecido ósseo trabecular. **Resultados:** O grupo hipertireoideo apresentou porcentagem de tecido ósseo trabecular significativamente mais elevada na metáfise femoral, em comparação ao controle. Mas o hipertireoidismo não alterou a porcentagem de tecido ósseo trabecular na vértebra. O hipotireoidismo reduziu significativamente a porcentagem de tecido ósseo trabecular em comparação aos demais grupos nos segmentos 1-3 das vértebras lombares, mas não alterou a porcentagem de tecido ósseo trabecular no fêmur. **Conclusão:** O efeito do hipotireoidismo e do hipertireoidismo sobre a histomorfometria óssea é diferente e dependente do sítio ósseo.

Descritores: Hipotireoidismo. Hipertireoidismo. Fêmur. Coluna vertebral. Ratos.

ABSTRACT

Objective: Evaluating bone site-dependent differences in the effect of thyroid dysfunctions on the femur and lumbar vertebrae of female rats. **Methods:** Thirty-three 2-month-old female wistar rats were distributed in three groups: euthyroid (control), hypothyroid and hyperthyroid. Ninety days after treatment for hypothyroidism and hyperthyroidism induction, the female rats were euthanized; the blood was collected for free T4 dosage and the femurs and segment 1-3 of the lumbar vertebrae were decalcified and processed for analysis of the trabecular bone percentage. **Results:** The hyperthyroid group showed significantly higher trabecular bone percentage in the femoral metaphysis, in comparison with the control group. But the hyperthyroidism group did not increase the trabecular bone percentage in the lumbar vertebrae. The hypothyroidism group significantly reduced the trabecular bone percentage in the lumbar vertebrae, but did not alter the trabecular bone percentage in the femur. **Conclusion:** The effect of hypothyroidism and hyperthyroidism on bone histomorphometry is different in each condition and bone site-dependent.

Keywords: Hypothyroidism. Hyperthyroidism. Femur. Spine. Rats.

Citação: Boeloni JN, Freitas Silva J, Magalhães FC, Goes AM, Serakides R. Efeitos sítio-ósseo dependentes no fêmur e vértebra de ratas com disfunções tireoidianas. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010;18(5):291-4. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Boeloni JN, Freitas Silva J, Magalhães FC, Goes AM, Serakides R. Bone site-dependent effects on femur and vertebrae of female rats with thyroid dysfunctions. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2010;18(5):291-4. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1 – Setor de Patologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da UFMG.
2 – Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, e pesquisador do CNPq.

Trabalho realizado no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Endereço para correspondência: Rogéria Serakides: Setor de Patologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Av. Pres. Antônio Carlos, 6.627/ Caixa Postal 567.Cep. 31.270-901, Belo Horizonte, MG – Brasil. E-mail: serakide@dedalus.icc.ufmg.br

Trabalho recebido em 12/07/09, aprovado em 09/07/10

INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos, representados pela tiroxina (T4) e pela triiodotironina (T3), são responsáveis pelo crescimento, diferenciação e metabolismo na vida pós-natal de muitos órgãos e tecidos, incluindo o tecido ósseo.¹ No tecido ósseo adulto, eles estimulam tanto a formação² quanto a reabsorção óssea³ por regularem tanto a atividade dos osteoblastos quanto dos osteoclastos.⁴

O efeito das disfunções tireoidianas no tecido ósseo, principalmente o do hipertireoidismo, é amplamente estudado, em modelos animais,^{2,5-13} e em seres humanos.¹⁴⁻¹⁹ No hipertireoidismo experimental a resposta do osso depende da dose de tiroxina administrada, do perfil sérico dos esteróides sexuais e do curso da doença.² Algumas pesquisas demonstram que ratos adultos submetidos a altas doses de tiroxina apresentam osteopenia.⁵⁻⁷ No entanto, sem mensurar a quantidade de osso, há resultados que sugerem que a administração de tiroxina pode aumentar a massa óssea por estimular a atividade osteoblástica quando administrada por curto período, ou reduzir a massa óssea quando administrada por longo período.² Além disso, a administração de tiroxina pode melhorar ou agravar a osteopenia pós castração dependendo do tempo de administração² e da dose.⁹

Ao contrário do hipertireoidismo, no hipotireoidismo, pouco estudado no osso adulto, ocorre osteopenia por inibição da síntese de matriz óssea e por aumento da reabsorção óssea em ratos castrados e não castrados.¹²

Estudos sugerem que diferentes sítios do esqueleto respondem de forma diferenciada aos hormônios tireoidianos.^{5-7,9,20} No entanto, a maioria das pesquisas tem realizado uma avaliação somente descritiva dos efeitos do hipotireoidismo¹² e do hipertireoidismo² sobre o esqueleto ou uma avaliação morfométrica de um único sítio ósseo.¹⁰ Além disso, as pesquisas sobre o efeito do hipotireoidismo no esqueleto enfocam esse efeito na fase de crescimento e não no indivíduo adulto.²¹⁻²⁴

Dentre as pesquisas sobre os efeitos das disfunções tireoidianas no tecido ósseo, o hipertireoidismo tem recebido destaque durante vários anos.^{14-17,19} No entanto, o hipotireoidismo, considerado uma das disfunções tireoidianas mais diagnosticadas em seres humanos, tem seus efeitos pouco estudados, sobre o tecido ósseo de indivíduos adultos. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar as diferenças sítio-ósseo dependentes decorrentes do efeito das disfunções tireoidianas na porcentagem de tecido ósseo trabecular do fêmur e das vértebras lombares de ratas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 33 ratas Wistar com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas (cinco a seis ratas/caixa), recebendo ração comercial (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo, além de micronutrientes) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Todos os procedimentos descritos no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (Protocolo nº 134/2008).

Após um período de trinta dias de adaptação, as ratas foram divididas em três grupos: eutireoideo (controle, n=11), hipotireoideo (n=11) e hipertireoideo (n=11). Os animais do grupo hipotireoideo receberam diariamente propiltiouracil (Sigma, Saint

Louis, USA), por sonda oro-gástrica, na dose de 1 mg/animal, diluído em 5ml de água destilada de acordo com Ribeiro et al., 2004¹² durante todo o período experimental. Os animais do grupo hipertireoideo receberam diariamente tiroxina (L-thyroxine, Sigma, Saint Louis, USA), por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal, diluída em 5ml de água destilada de acordo com Serakides et al.², durante todo o período experimental. Os animais do grupo eutireoideo receberam 5ml de água, como placebo, no mesmo esquema posológico.

Após 90 dias do início dos tratamentos, as ratas foram eutanasiadas por punção cardíaca precedida por anestesia intraperitoneal com pentobarbital 2,5% (30m/kg). O sangue foi colhido para dosagem de T4 livre pela técnica da quimioluminescência seguindo o protocolo do fabricante (Access Immunoassay System, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Chaska, MN, USA), com CV intra-ensaio de 4% e 7% e CV inter-ensaio de 7% e 11%, respectivamente. À necropsia, os fêmures e as vértebras lombares (L1-L3) foram fixados em formalina a 10% neutra e tamponada e posteriormente dissecados. Os ossos foram descalcificados em solução de ácido fórmico a 10% e processados, em seguida, pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 5µm foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histomorfométrica.

No fêmur, a porcentagem de osso trabecular foi determinada na epífise e metáfise distal e na cabeça do fêmur a 1mm abaixo da placa epifisária e da cartilagem articular, com objetiva de 20x e com auxílio de ocular micrométrica contendo uma graticula de 121 pontos. As variáveis foram determinadas em três campos em cada região, totalizando 363 pontos para cada sítio ósseo analisado. No segmento 1-3 das vértebras lombares, a porcentagem de tecido ósseo trabecular foi determinada em objetiva de 20x, em um total de 6 campos/vértebra, iniciados a 1mm abaixo de cada placa epifisária tanto proximal quanto distal, totalizando 726 pontos/vértebra.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso. Para cada variável, a média e o desvio-padrão foram determinados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA do programa estatístico *Instat* (Graph Pad Software, Versão 3.00, 32 Win 95/NT, San Diego, USA) e as médias foram comparadas pelo teste *Student-Newman Keuls* (SNK). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

A dosagem de T4 livre confirmou os estados hipotireoideo e hipertireoideo dos animais, visto que os níveis plasmáticos de tiroxina foram significativamente superiores no grupo tratado com tiroxina e significativamente inferiores no grupo tratado com propiltiouracil em comparação ao controle. (Tabela 1)

Tabela 1 – Concentração plasmática de T4 livre (ng/dl) em ratas dos grupos eutireoideo (controle), hipotireoideo e hipertireoideo.

Grupo	Concentração de T4 livre (ng/dl)
Eutireoideo	1,62 ± 0,36 B
Hipotireoideo	0,03 ± 0,04 C
Hipertireoideo	4,13 ± 0,99 A

*Médias com letras diferentes na coluna diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Em comparação ao controle, o hipotireoidismo induzido por três meses reduziu significativamente a porcentagem de tecido trabecular somente das vértebras lombares. (Tabela 2) Nesse sítio ósseo, as trabéculas apresentavam-se delgadas, fragmentadas e pouco conectadas entre si com cobertura osteoblástica fusiforme (pouco ativa). Já no fêmur, o hipotireoidismo não alterou significativamente a porcentagem de tecido ósseo trabecular em nenhuma das regiões estudadas (metáfise, epífise e cabeça). (Tabela 2)

Tabela 2 – Porcentagem de tecido ósseo trabecular nos fêmures e vértebras lombares 1-3 de ratas dos grupos eutireoideo (controle), hipotireoideo e hipertireoideo.

Sítio ósseo	Grupo		
	Eutireoideo	Hipotireoideo	Hipertireoideo
Cabeça (fêmur)	49,24 ± 4,49 A	51,54 ± 10,56 A	51,04 ± 7,63 A
Metáfise distal (fêmur)	37,37 ± 10,37 B	35,49 ± 6,69 B	45,11 ± 7,58 A
Epífise distal (fêmur)	32,23 ± 6,08 A	29,58 ± 2,83 A	31,59 ± 6,97 A
Vértebras lombares 1-3	46,33 ± 2,53 A	39,85 ± 3,58 B	46,67 ± 4,64 A

*Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem significativamente entre si (p<0,05).

No grupo hipertireoideo, a porcentagem de tecido ósseo trabecular dos fêmures foi significativamente superior a do grupo controle na região da metáfise distal. Não houve diferença significativa nos demais sítios estudados (epífise e cabeça do fêmur e vértebras lombares). (Tabela 2) O grupo hipertireoideo apresentou trabéculas metafisárias predominantemente espessas e confluentes principalmente revestidas por osteoblastos cuboidais com núcleos grandes. Havia também focos de hiperplasia osteoblástica. Os osteócitos mostravam-se ora ativos, com núcleos grandes alojados em lacunas periosteocíticas alargadas, ora inativos com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas e pouco basofílicas.

DISCUSSÃO

A dosagem sérica de tiroxina confirmou os estados hipo e hipertireoideo dos animais, validando os resultados com relação ao efeito destas disfunções tireoidianas nos fêmures e vértebras lombares. Esse resultado já era esperado já que doses iguais também foram utilizadas satisfatoriamente para a indução tanto do hipotireoidismo¹² quanto do hipertireoidismo.^{2,11,13}

O efeito do hipotireoidismo sobre o fêmur e as vértebras corrobora em parte com os de outro estudo¹², onde se utilizou a mesma dose de propiltiouracil, mas administrada por 120 dias. Semelhante ao presente estudo, Ribeiro et al.¹², mesmo sem realizar morfometria óssea, sugere que a osteopenia não é tão evidente no fêmur e os sítios mais acometidos são a tíbia, vértebras lombares, maxila, mandíbula e os ossos nasais.

Ao contrário do hipotireoidismo, o hipertireoidismo aumentou a porcentagem de tecido ósseo trabecular no fêmur. Em estudo anterior, com uma dose quatro vezes superior à dose utilizada

neste estudo, foi demonstrado, por análise histomorfométrica, aumento na porcentagem de tecido ósseo trabecular do ílio de ratos tratados com tiroxina por 90 dias.¹⁰ No entanto, outros estudos avaliando o efeito do hipertireoidismo sobre fêmur e vértebras lombares, demonstraram que ocorre osteopenia no fêmur e não na vértebra^{5,6}, ao contrário do observado no presente estudo. E isto pode ser explicado pelo tempo de administração, já que nesses estudos a tiroxina foi administrada somente por um mês. No estudo realizado por Serakides et al.², a tiroxina foi administrada por 30, 60 e 90 dias, sugerindo, mesmo sem quantificar a massa óssea, que a resposta do osso depende do curso da doença, havendo osteopenia somente após 60 dias de administração da tiroxina.

O efeito anabólico da administração da tiroxina também foi observado em ratas castradas^{2,9} e lactantes.¹³ Ratas tratadas com tiroxina, dependendo da dose e do período de administração, não manifestam osteopenia pós-castração ou pós-lactação, comprovando o efeito anabólico do hipertireoidismo sobre a massa óssea. Mas o efeito do hipertireoidismo é dependente do sítio ósseo, da dose de tiroxina e do curso da doença.² Ratas tratadas com tiroxina por período prolongado ou com dose elevada têm apresentado agravamento da osteopenia pós-castração.^{2,9} Em mulheres, o hipertireoidismo é também considerado um fator de risco para a osteoporose pós-menopausa.¹⁶

No presente estudo o efeito anabólico da tiroxina sobre o tecido ósseo foi mais evidente que o efeito reabsorptivo. Ensaios *in vitro* têm demonstrado que a adição de hormônios tireoidianos em culturas de osteoblastos pode estimular a atividade de síntese dessas células.²⁵ Mas o osteoblasto é uma célula que deriva da diferenciação osteogênica das células tronco e as áreas de hiperplasia osteoblástica observadas no fêmur das ratas hipertireoideas sugere aumento da diferenciação de células tronco. Essa assertiva é apoiada por resultados recentes que comprovam que os hormônios tireoidianos, aumentam *in vitro*, a diferenciação osteogênica das células tronco da medula óssea em osteoblastos.²⁶

Várias pesquisas estudaram o efeito do hipo e do hipertireoidismo em ratos^{2,10-13} e em humanos^{15-17,19}, mas a maioria das pesquisas levou em consideração somente um sítio ósseo¹⁰ ou estudou mais de um osso sem realizar histomorfometria.² Além disso, pelo conhecimento dos autores, somente um estudo foi realizado para verificar o efeito do hipotireoidismo no osso adulto sem, no entanto, comprovar esses efeitos por histomorfometria.¹² Por isso, o presente estudo fornece resultados complementares em relação aos dados existentes atualmente na literatura.

CONCLUSÃO

As disfunções tireoidianas causam efeitos distintos no osso e dependentes do sítio ósseo analisado. O hipertireoidismo aumenta a porcentagem de tecido ósseo trabecular na metáfise distal do fêmur, enquanto o hipotireoidismo reduz a porcentagem de tecido ósseo trabecular somente nas vértebras.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi conduzido com apoio financeiro da Fapemig, CNPq e Capes (Pró-equipamentos 01/2007).

REFERÊNCIAS

1. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001;81:1097-142.
2. Serakides R, Nunes VA, Ocarino NM, Nascimento EF. Efeito da associação hipotireoidismo-castração no osso de ratas adultas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48:875-84.
3. Mundy GR, Shapiro JL, Bandelin JG, Canalis EM, Raisz LG. **Direct stimulation** of bone resorption by thyroid hormones. *J Clin Invest*. 1976;58:529-34.
4. Klaushofer K, Varga F, Glantschnig H, Fratzi-Zelman N, Czerwenka E, Leis HJ et al. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J Nutr*. 1995;125(7 Suppl):1996S-2003S.
5. 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.
6. Ongphiphadhanakul B, Jenis LG, Braverman LE, Alex S, Stein GS, Lian JB 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Allain TJ, Thomas MR, McGregor AM, Salisbury JR. A histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. *Bone*. 1995;16:505-9.
11. Serakides R, Nunes VA, Nascimento EF, Silva CM, Ribeiro AFC. Relação tireoide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000;52:579-85.
12. Ribeiro AFC, Serakides R, Ocarino NM, Nunes VA. Efeito da associação hipotireoidismo-castração no osso e nas paratireoides de ratas adultas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48:525-34.
13. Serakides R, Ocarino NM, Magalhães FC, Souza CA, Leite ED, Freitas ES. Histomorfometria óssea de ratas hipertireoideas lactantes e não-lactantes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52:677-83.
14. 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.
15. Pantazi H, Papapetrou PD. Changes in parameters of bone and mineral-metabolism during therapy for hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1099-106.
16. Ben-Shlomo A, Hagag P, Evans S, Weiss M. Early postmenopausal bone loss in hyperthyroidism. *Maturitas*. 2001;39:19-27.
17. Karga H, Papapetrou PD, Korakovouni A, Papandroulaki F, Polymeris A, Pampouras G. Bone mineral density in hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004;61:466-72.
18. Demartini AAC, Kulak CAM, Borba VC, Cat MNL, Dondoni RS, Sandrini R et al. Densidade mineral óssea de crianças e adolescentes com hipotireoidismo congênito. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007;51:1084-92.
19. van de Ven AC, Erdtsieck RJ. Changes of bone mineral density, quantitative ultrasound parameters and markers of bone turnover during treatment of hyperthyroidism. *Neth J Med*. 2008;66:428-32.
20. 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.
21. 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.
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. Ahmed M, Janjua Z. Effect of hypothyroidism and thyroxin replacement on growth of long bones in prenatally treated albino rats. *J Pak Med Assoc*. 2003;53:18-21.
24. Bassett JH, Swinhoe R, Chassande O, Samarut J, Williams GR. Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate. *Endocrinology*. 2006;147:295-305.
25. Ohishi K, Ishida H, Nagata T, Yamauchi N, Tsurumi C, Nishikawa S 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.
26. Boeloni JN, Ocarino NM, Melo AB, Silva JF, Castanheira P, Goes AM et al. Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Horm Res*. 2009;72:88-97.