

EDUARDO HENRIQUE BEBER

**EFEITO DO AGONISTA DO RECEPTOR BETA
DO HORMÔNIO TIROIDEANO GC-1 NA
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Ciências Morfofuncionais).

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDUARDO HENRIQUE BEBER

**EFEITO DO AGONISTA DO RECEPTOR BETA DO
HORMÔNIO TIROIDEANO GC-1 NA
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Ciências Morfofuncionais).

Área de Concentração:
Ciências Morfofuncionais

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

São Paulo
2006

RESUMO

BEBER, E. H. **Efeito do Agonista do Receptor Beta do Hormônio Tiroideano GC-1 na Proliferação e Diferenciação de Células Osteoblásticas.** 2006. 87f . Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O hormônio tiroideano (T3) exerce uma ampla variedade de efeitos no tecido ósseo. A maioria das ações do T3 é mediada por receptores nucleares, os TRs. Existem dois genes que codificam TRs, o α e o β , que codificam o TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2 por *splicing* alternativo. Todos esses receptores, com exceção do TR β 2, são expressos nos osteoblastos, entretanto, não se sabe qual a participação funcional de cada uma dessas isoformas em mediar os efeitos do T3 no esqueleto. Há alguns anos, foi desenvolvido o GC-1, um análogo do T3 que apresenta alta afinidade e seletividade pelo TR β em relação ao TR α . No presente estudo, tivemos como objetivo verificar se células osteoblásticas de ratos (ROS17/2.8) e de camundongos (MC3T3-E1) são responsivas ao GC-1, através de estudos dos efeitos desse tiromimético na proliferação e diferenciação celular. O T3 e o GC-1 igualmente inibiram a proliferação das células ROS17/2.8 a partir do sexto dia de tratamento, e igualmente estimularam a expressão do mRNA da osteocalcina (OC) de maneira dependente da dose e tempo do tratamento, sugerindo que esses processos sejam mediados pelo TR β nessas células. Nas MC3T3-E1, o T3 inibiu a proliferação a partir do sexto dia de tratamento, e também induziu a diferenciação celular, enquanto o GC-1 promoveu os mesmos efeitos, mas o fez de uma maneira mais modesta, sugerindo que esses eventos dependem da participação tanto do TR α quanto do TR β . A expressão do mRNA do TR β foi estimulada pelo T3 e GC-1 em ambas as linhagens celulares; enquanto a expressão gênica do TR α foi inibida por ambos os ligantes nas MC3T3-E1. Esses estudos mostram que as células MC3T3-E1 e ROS17/2.8 são responsivas ao GC-1 e que o tratamento com esse tiromimético provavelmente modula a responsividade dos osteoblastos ao hormônio tiroideano e a ele mesmo.

Palavras-Chave: T3, GC-1, osteoblastos, TR α , TR β , osteocalcina, fosfatase alcalina, proliferação osteoblástica, diferenciação osteoblástica.

ABSTRACT

BEBER, E. H. **Effect of The Thyroid Hormone Receptor-Beta Agonist GC-1 on Proliferation and Differentiation of Osteoblastic Cells.** 2006. 87f . Master thesis (Morpho-Functional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Thyroid hormone (T3) has important effects on bone tissue. Most of these effects are probably the result of T3 interaction with its nuclear receptors (TRs). Two genes encode TRs, α and β , which encode TR α 1, TR α 2, TR β 1 and TR β 2 by alternative splicing. All these receptors, except TR β 2, are expressed in osteoblasts and osteoclasts, however, the functional roles of these TR isoforms in mediating the effects of T3 on the skeleton are not known. A few years ago, GC-1, a TR β -selective T3 analog that is selective for both binding and activation functions of TR β 1 over TR α 1 was developed. In the present study, our aim was to investigate whether rat (ROS17/2.8) and mouse (MC3T3-E1) osteoblastic cells are responsive to GC-1, through the analysis of the effects of this thyromimetic on cellular proliferation and differentiation. In ROS17/2.8 cells, both T3 and GC-1 equally inhibited cellular proliferation after six days of treatment, and equally stimulated the expression of osteocalcin (OC) mRNA in a dose and time dependent fashion, suggesting that TR β mediates these processes in these cells. In MC3T3-E1, T3 inhibited cellular proliferation after six days of treatment, and stimulated differentiation, while GC-1 had the same effect, but in a more modest fashion, suggesting that both TR α and TR β are involved in these processes. The TR β mRNA expression was stimulated by T3 and GC-1 in both cell lineages, while the TR α mRNA expression was inhibited by both ligands in MC3T3-E1 cells. These studies show that ROS17/2.8 and MC3T3-E1 cells are responsive to GC-1, and that the treatment with this thyromimetic probably modulates the responsiveness of osteoblasts to T3 and to itself.

Key Words: T3, GC-1, osteoblasts, TR α , TR β , osteocalcin, alkaline phosphatase, osteoblast proliferation, osteoblast differentiation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP - fosfatase alcalina

BMC - conteúdo mineral ósseo

BMD - densidade mineral óssea

BrdU - 5-Bromo-2'-deoxyuridine

Col I - colágeno tipo I

CSS - *charcoal stripped serum* (FBS tratado com carvão ativado)

Ct - threshold cycle

D1 - enzima 5'-desiodase do tipo I

D2 - enzima 5'-desiodase do tipo II

DAPI - fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBD - domínio de ligação ao DNA

DR+0 - uma das formas de nTRE caracterizada por ser dois octâmeros seguidos sem intervalo entre eles

DR4 ou DR+4 - uma das formas de pTRE caracterizada pela repetição direta dos dois hexâmeros com um intervalo de quatro pares de base entre eles

FBS - soro de feto bovino

GH - hormônio do crescimento

HAT - *histone acetyl transferase* (atividade acetil-transferase sobre as histonas)

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

IP6 ou Inv+6 - uma das formas de pTRE caracterizada pela repetição inversa dos dois hexâmeros com um intervalo de seis pares de bases entre eles

LBD - domínio de ligação ao ligante

MC - meio completo

MCSS - meio contendo FBS previamente tratado com carvão ativado (CSS)

mRNA - RNA mensageiro

MSS - meio sem soro

NcoR - nuclear receptor corepressor

nTRE - elemento responsivo ao hormônio tiroideano negativo

OC - osteocalcina

OP - osteopontina

PAL0 ou pal - uma das formas de pTRE caracterizada por ser um palíndromo sem intervalo

pTRE - elemento responsivo ao hormônio tiroideano positivo

RTH - síndrome de resistência ao hormônio tiroideano

RXR e RAR - receptores do ácido retinóico

SEM - erro padrão da média

SMRT - silencing mediator for RAR and TR

SRC-1 - steroid receptor coactivator-1

T3 - triiodotironina

T4 - tiroxina

TR - receptor do hormônio tiroideano

TRAPs - TR associated proteins

TRE - elemento responsivo ao hormônio tiroideano

TRH - hormônio Liberador de Tirotropina

TSH - hormônio Estimulante da Tiróide

VDR - receptor da Vitamina D₃

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 - Os receptores de hormônio tiroideano (TRs) como membros da super-família de receptores nucleares.....	5
2.2 - Isoformas de TRs.....	9
2.3 - O Análogo do T3, GC-1.....	11
2.4 - O hormônio tiroideano, os seus receptores e o tecido ósseo.....	13
2.5 - O ciclo de crescimento celular <i>In Vitro</i>	18
2.6 - O processo de maturação osteoblástica.....	18
2.7 – Utilização de linhagens de células osteoblásticas como modelo para o estudo dos efeitos do hormônio tiroideano.....	22
2.8 - Efeitos do hormônio tiroideano na maturação osteoblástica.....	22
3 - OBJETIVOS.....	24
3.1 - Objetivos específicos.....	24
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 - Estudo do ciclo do crescimento celular.....	25
4.2 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células ROS 17/2.8.....	26
4.3 -Avaliação do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células MC3T3-E1.....	26
4.3.1 - Tratamento do FBS com carvão ativado.....	26
4.3.2 - Determinação do meio sem soro das células MC3T3-E1.....	27
4.3.3 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células MC3T3-E1, utilizando meio suplementado com FBS tratado com carvão ativado (MCSS).....	27

4.4 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 na proliferação celular por incorporação de BrdU.....	28
4.4.1 - Imunocitoquímica por reação de imunofluorescência.....	29
4.4.2 - Quantificação de incorporação de BrdU.....	30
4.5 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 na viabilidade celular.....	30
4.6 - Avaliação do efeito de doses crescentes de T3 e GC-1 na expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico.....	31
4.7 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 na diferenciação osteoblástica e na expressão gênica dos receptores de hormônio tiroideano (TRs).....	32
4.7.1 - Extração do RNA total das células e PCR em tempo real (Real-Time PCR).....	32
4.7.2 - Determinação da eficiência das reações de amplificação do TR α e TR β	33
4.8 - Análise Estatística.....	34
5 - RESULTADOS.....	36
5.1 - Estudo do ciclo do crescimento celular.....	36
5.2 - Efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular das células ROS 17/2.8.....	38
5.3 - Efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular das células MC3T3-E1.....	39
5.3.1 - Estudo do ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 utilizando meio suplementado com FBS tratado com carvão ativado (MCSS).....	39
5.3.2 - Efeito do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células MC3T3-E1, utilizando meio suplementado com FBS tratado com carvão ativado (MCSS)....	40
5.4 - Efeito do T3 e GC-1 na proliferação celular por incorporação de BrdU.....	42
5.5 - Efeito do T3 e GC-1 na viabilidade celular.....	44

5.6 - Efeito de doses crescentes de T3 e GC-1 na expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico.....	46
5.6.1 - Osteocalcina.....	46
5.6.2 - Fosfatase Alcalina.....	49
5.6.3 - Colágeno tipo I.....	50
5.7 - Efeito do T3 e GC-1 na diferenciação osteoblástica.....	51
5.7.1 - Osteocalcina.....	51
5.7.2 - Fosfatase Alcalina.....	54
5.7.3 - Colágeno tipo I.....	55
5.8 - Efeito do T3 e GC-1 na expressão relativa do mRNA do TR α e TR β nas ROS17/2.8.....	56
5.9 - Efeito do T3 e GC-1 na expressão relativa do mRNA do TR α e TR β nas MC3T3-E1.....	58
5.10 - Comparação da expressão relativa do mRNA do TR α vs. TR β nas ROS17/2.8.....	59
5.11 - Comparação da expressão relativa do mRNA do TR α vs. TR β nas MC3T3-E1.....	61
5.12 - Comparação da expressão relativa do mRNA do TR α nas ROS17/2.8 vs. MC3T3-E1.....	62
5.13 - Comparação da expressão relativa do mRNA do TR β nas ROS17/2.8 vs. MC3T3-E1.....	64
6 - DISCUSSÃO.....	66
7 - CONCLUSÃO.....	73
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1 - INTRODUÇÃO

O hormônio tiroideano (T3) exerce uma ampla variedade de efeitos no organismo, que variam desde ações no desenvolvimento embrionário e pós-natal, até a manutenção da taxa metabólica em adultos (Bianco & Kimura, 1999). Em excesso, o T3 gera efeitos deletérios, tais como taquicardia, arritmia cardíaca, perda de massa muscular, fadiga, nervosismo e perda de massa óssea (Motomura & Brent, 1998). No entanto, alguns efeitos do excesso de hormônio tiroideano podem ser desejáveis, como aumento da taxa metabólica basal, lipólise, diminuição do colesterol e aumento da contratilidade cardíaca.

A grande maioria dos efeitos do T3 ocorre em função da sua interação com os seus receptores nucleares, os TRs. Os TRs por sua vez são fatores de transcrição pertencentes a uma super-família de receptores nucleares, que abrange os receptores dos hormônios esteróides (hormônios do córtex da adrenal, sexuais e a vitamina D₃) e não-esteróides (retinóides e hormônio tiroideano) (Evans, 1988; Lazar, 1993).

Existem dois genes que codificam TRs, o gene α , localizado no cromossomo 17, e o gene β , localizado no cromossomo 3. Por *splicing* alternativo, esses genes codificam quatro isoformas clássicas de TRs, o TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2 (Brent et al, 1991; Lazar, 1993). Dentre essas isoformas, apenas o TR α 2 não permite a ligação do T3 e atua, pelo menos *in vitro*, como um antagonista dos outros TRs (Katz & Lazar, 1993).

Os TRs são expressos basicamente em todos os tecidos, mas a distribuição das diferentes isoformas não é homogênea. Um exemplo é a alta expressão do TR α 1 no tecido cardíaco, com praticamente níveis indetectáveis de TR β 1, ou a predominância da isoforma TR β 1 no cérebro, fígado e rins (Koenig et al, 1988; Hodin et al, 1990; Gloss et al, 2001).

Estudos com camundongos, que apresentam inativação ou mutação das isoformas de TRs (Flamant et al, 2002; Fowler et al, 1996; Fraichard et al, 1997; Gauthier et al, 2001; Gothe et al, 1999; Johansson et al, 1998; Wikstrom et al, 1998), e com pacientes portadores da síndrome de resistência ao hormônio tiroideano (RTH) (Cheng, 2005; Refetoff, 2003) sugerem que as diferentes isoformas de TRs medeiam ações tecido-específicas do T3. Desta maneira, o TR α 1

parece estar relacionado a efeitos do T3 no coração, enquanto o TR β 1 parece mediar efeitos do T3 no colesterol e na secreção do TSH (Baxter et al, 2004).

Uma vez que o hormônio tiroideano em excesso pode gerar efeitos terapêuticos desejáveis, é de fundamental importância que se estude a participação de cada uma das isoformas de TR na mediação dos efeitos do T3, o que pode contribuir para o desenvolvimento de drogas que estimulem apenas os efeitos desejáveis do T3, ao mesmo tempo em que evitam os efeitos deletérios.

Há alguns anos, foi desenvolvido um análogo do T3 seletivo pela isoforma TR β 1, o GC-1, cujas características chave incluem uma ligação com metileno ao invés de uma ligação éter, uma cadeia lateral do ácido oxiacético ao invés de uma cadeia lateral alanina e grupos metil ou isopropil no lugar dos iodetos. O GC-1 liga-se ao TR β 1 com a mesma afinidade que o T3, mas com uma afinidade 10 vezes menor pelo TR α 1, quando comparado ao T3 (Chiellini et al, 1998). O hormônio tiroideano, entretanto, não expressa tal seletividade e liga-se ao TR α 1 e TR β 1 com a mesma afinidade.

Acredita-se que alguns efeitos do GC-1 dependam do reconhecimento específico dos genes pelo TR β . É possível que isso ocorra, por exemplo, no sistema nervoso central (Manzano et al, 2003; Morte et al, 2004), tecido adiposo marrom (Ribeiro et al, 2001), hepatócitos e células acinares do pâncreas (Columbano et al, 2006), uma vez que os efeitos do GC-1 foram limitados a apenas alguns efeitos biológicos do T3 dentro desses tecidos ou células. Por outro lado, os efeitos do GC-1 também podem estar relacionados com a distribuição tecido-específica das diferentes isoformas de TR pelo corpo. O GC-1 praticamente não apresenta efeito na função cardíaca, onde há predominantemente a expressão de TR α 1, mas diminui os níveis séricos de colesterol e triglicérides, o que está de acordo com a alta expressão de TR β 1 no fígado (Trost et al, 2000). É possível, ainda, que a seletividade biológica do GC-1 ocorra em função da distribuição heterogênea desse análogo pelos tecidos. Foi demonstrado, por exemplo, que há maior acúmulo de GC-1 do fígado do que no coração, o que poderia explicar a alta capacidade do GC-1 de diminuir os níveis séricos de colesterol e a inabilidade do GC-1 de afetar a função cardíaca (Trost et al, 2000).

O tecido ósseo é um importante alvo do hormônio tiroideano, sofrendo severas alterações em situações de excesso ou falta de T3. 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 impedimento da diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas. Por outro lado, o excesso de hormônio tiroideano resulta em maturação esquelética acelerada, fechamento prematuro das placas de crescimento e subsequente diminuição do crescimento dos membros e do peso corporal (Gouveia, 2004). O hormônio tiroideano também tem efeito no osso adulto, sendo importante para a manutenção do metabolismo ósseo. O T3 estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea, regulando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Em condições de excesso de hormônio tiroideano, 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 (Mosekilde & Mesen, 1978; Gouveia et al, 1997). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que o hormônio tiroideano atua na inibição da proliferação e na indução da diferenciação de células osteoblásticas (Williams et al, 1994; Fratzl-Zelman et al, 1997; Varga et al, 1997; Gouveia et al, 2001).

Embora a importância do hormônio tiroideano 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 (Rizzoli et al, 1986; Sato et al, 1987; LeBron et al, 1989; Kasono, 1988), osteoclásticas (Allain et al, 1996; Abu et al, 1997) e nos condrócitos das placas epifisárias de crescimento (Abu et al, 1997; Robson et al, 2000), bem como a responsividade dessas células ao hormônio tiroideano em culturas isoladas, evidenciam uma ação direta do T3 no tecido ósseo, porém a importância funcional dessas diferentes isoformas de TR no esqueleto é praticamente desconhecida.

Modelos animais que apresentam inativação dos genes dos TRs têm contribuído para o entendimento do papel dos TRs no desenvolvimento esquelético. Camundongos com inativação do TR β (Forrest et al, 1996) e TR α 1 (Wikstrom et al, 1998) apresentam desenvolvimento ósseo normal. Entretanto, a deleção combinada do TR α 1 e TR β [camundongos com duplo *knockout*, TR α 1^{-/-}/TR β ^{-/-} (Gothe et al, 1999)] ou de ambas as isoformas de TR α (camundongos TR α ^{-/-}) (Fraichard et al, 1997) resultam em um número de defeitos ósseos, incluindo atraso na

ossificação e disgênese das placas epifisárias de crescimento. Esses estudos sugerem uma redundância funcional do TR α 1 e TR β no desenvolvimento ósseo.

Freitas et al (2003) demonstraram que altas doses de T3 causaram perda de massa óssea generalizada em ratas adultas, mas não detectaram efeitos do GC-1 nesse processo, sugerindo que o TR α 1 é a principal isoforma a mediar os efeitos osteopênicos do T3 e que o tecido ósseo é pouco responsivo ao GC-1. Isso está de acordo com a maior expressão de TR α versus TR β no fêmur e tíbia de camundongos (O'Shea et al, 2003). Por outro lado, foi observado que o GC-1 é capaz de aumentar a taxa de mineralização óssea em ratas adultas, um processo mediado pelos osteoblastos (dados não publicados). Além disso, demonstrou-se que o GC-1 parcialmente reverte os efeitos do hipotireoidismo na maturação e desenvolvimento ósseo de ratas (Freitas et al, 2005), o que sugere que o TR β contribui para o desenvolvimento ósseo e que o esqueleto é, de fato, responsivo ao GC-1.

Considerando-se que o tecido ósseo é um importante alvo do hormônio tiroideano, o presente estudo teve como objetivo estudar a responsividade de células osteoblásticas de ratos (ROS17/2.8) e camundongos (MC3T3-E1) ao GC-1, avaliando os efeitos desse tiromimético na proliferação e diferenciação celular e, ainda, na expressão do TR α 1 e TR β 1.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

A tiroxina (T4), produto primário da glândula tiróide, é relativamente inativa e é convertida à forma ativa do hormônio, a triiodotironina (T3), pela enzima 5'-desiodase do tipo I e II (D1 e D2). Praticamente todas as ações do hormônio tiroideano são primariamente resultado da sua interação com seus receptores nucleares de T3, os TRs. A ligação do T3 nos TRs causa uma série de efeitos que variam desde ações no desenvolvimento embrionário a ações na homeostase energética em adultos (Motomura & Brent, 1998).

2.1 - Os receptores de hormônio tiroideano (TRs) como membros da super-família de receptores nucleares

Os receptores do hormônio tiroideano (TRs) são fatores de transcrição pertencentes a uma super-família de receptores nucleares, que abrange os receptores dos hormônios esteróides (hormônios do córtex da adrenal, sexuais e a vitamina D₃), não-esteróides (retinóides e hormônio tiroideano) e receptores órfãos, cujos ligantes são desconhecidos (Evans, 1988; Lazar, 1993; Eckey et al, 2003; Gloss et al, 2005).

Todos os receptores da super-família de receptores nucleares apresentam similaridades quanto à sua estrutura e mecanismos de ação. Estruturalmente (Fig. 1), os receptores nucleares apresentam uma extremidade amino-terminal (NH₂), seguida pelos domínios A/B, C, D, E/F e, por fim, por uma extremidade carboxi-terminal (COOH).

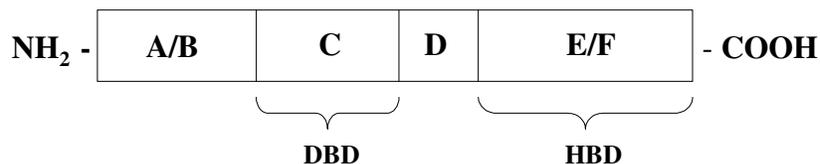


Figura 1. Esquema de um receptor nuclear com seus domínios.

O domínio A/B ainda não tem função estabelecida, porém, sabe-se que, na sua ausência, a regulação da transcrição gênica pelo T3 não é afetada (Lazar, 1993). O domínio C, também conhecido como domínio de ligação ao DNA (*DNA Binding Domain*; DBD), é o mais conservado dentro da super-família e é responsável basicamente pela ligação do receptor a uma seqüência específica do DNA (Lazar, 1993). Este domínio é constituído por aminoácidos essenciais que formam duas estruturas conhecidas como dedos de zinco (quatro resíduos de cisteína que interagem com o íon Zn^{2+}), sendo que o primeiro dedo é funcional para a ligação do receptor ao DNA e o segundo, funcional para a ligação com outros receptores, formando dímeros (Evans, 1988; Williams and Brent, 1995; Eckey et al, 2003). O domínio D, também conhecido como “hinge domain”, une o domínio C ao E/F, mas também parece ser importante no endereçamento do receptor recém sintetizado no citoplasma para o núcleo da célula (Lazar, 1993; Eckey et al, 2003). O domínio E/F, também conhecido como domínio de ligação ao ligante (*Ligand Binding Domain*; LBD) ou como domínio de ligação ao hormônio (*Hormone Binding Domain*, HBD) (Lazar, 1993; Chassande, 2003), é a porção do receptor que se ligará ao hormônio/ligante. É constituído por 12 α -hélices dispostas de maneira que formam um bolso para receber o ligante. É importante dizer que a hélice 12 é crucial para ativação do receptor, sendo que, na sua ausência, mesmo com a ligação do ligante, o receptor permanece silenciado (Eckey et al, 2003).

Os TRs atuam como repressores ou ativadores de transcrição gênica, tanto na presença quanto na ausência do seu ligante, o T3, como será explicado a seguir (Eckey et al, 2003).

Classicamente essa regulação envolve alguns passos. Primeiramente, é necessário que o TR ligue-se, com alta afinidade, a regiões específicas do gene alvo, através do seu domínio C. Essas regiões do DNA reconhecidas pelos TRs recebem o nome de elementos responsivos ao hormônio tiroideano (TREs) (Williams and Brent, 1995; Bassett et al, 2003). Os TREs podem ser classificados como positivos (pTRE) ou negativos (nTRE). Um TRE é considerado positivo quando o complexo T3-TR-TRE induz a transcrição gênica, por outro lado, é considerado negativo quando o complexo T3-TR-TRE inibe a transcrição gênica (Eckey et al, 2003).

Estudos revelaram que um pTRE é constituído por dois hexâmeros ou “half sites” (AGGTCA), que podem estar arrançados de três formas principais (Fig. 2): a primeira e mais comum forma de pTRE consiste numa repetição direta dos dois hexâmeros com um intervalo de quatro pares de

base entre eles (DR4 ou DR+4); a segunda forma consiste numa repetição inversa dos dois hexâmeros com um intervalo de seis pares de bases entre eles (IP6 ou Inv+6); e a terceira e menos comum forma de pTRE é um palíndromo sem intervalo (PAL0 ou pal) (Lazar, 1993; Williams and Brent, 1995; Eckey et al, 2003; Bassett et al, 2003).

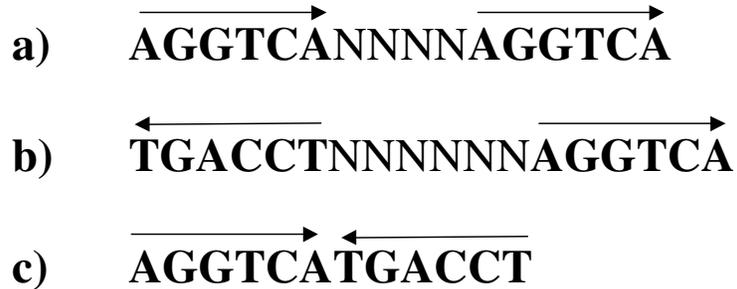


Figura 2. Conformação das principais formas de pTREs. (a) DR4 (b) IP6 (c) PAL0.

Como foi dito anteriormente, o segundo dedo de zinco do LBD é importante para formação de dímeros, ou seja, para a associação do TR com outros receptores, sejam eles outros TRs (homodímeros) ou outros receptores nucleares (heterodímeros). É possível que apenas um TR sozinho ligue-se em um hexâmero (monômero) ou ainda que dois TRs liguem-se de maneira independente a cada hexâmero (dois monômeros) (Lazar, 1993). A ligação do TR em forma de monômero ou homodímero é relativamente fraca, levando a uma rápida dissociação do complexo TR-TRE. Porém, foi visto que o TR liga-se de forma muito estável ao DNA quando está associado a outro receptor nuclear, ou seja, na forma de heterodímero. Os homodímeros somente são formados num excesso de TR, quando a formação de heterodímeros está saturada. Os principais receptores nucleares que associam-se ao TR para formar heterodímeros são os do ácido retinóico (RXR e RAR) e da Vitamina D₃ (VDR). Entretanto foi visto que tanto as ligações com RAR ou VDR são mais fracas que a ligação com RXR (Lazar, 1993; Williams and Brent, 1995).

Os nTREs foram descritos primeiramente nos genes do Hormônio Estimulante da Tiróide (TSH) e do Hormônio Liberador de Tirotrópina (TRH). Possuem uma estrutura diferente e também menos complexa que dos pTREs. Enquanto a maioria dos pTREs possuem dois ou mais

hexâmeros, os nTREs geralmente apresentam apenas um sítio de ligação, mas é possível encontrar nTREs na forma de dois octâmeros seguidos sem intervalo entre eles (TCAGGTCATCAGGTCA) (DR+0) (Williams and Brent, 1995).

Neste momento, é importante discutir uma propriedade singular dos TRs. Esses receptores, diferentemente dos demais receptores nucleares, ligam-se ao DNA independentemente do ligante. Além disso, essa ligação estimula ou inibe a transcrição, dependendo do TRE. Um TR ligado ao DNA na ausência do ligante é chamado de aporreceptor, o qual não é inativo. Uma vez ligado a um TRE, o aporreceptor normalmente exerce um efeito antagônico ao do holorreceptor, ou seja, quando um TR (aporreceptor) liga-se a um pTRE, ocorre uma inibição da transcrição e, quando liga-se a um nTRE, ocorre uma estimulação da transcrição. No caso de um pTRE, a simples ligação do hormônio reverte a ação do aporreceptor e o gene volta a ter sua transcrição estimulada. Por analogia, no caso de um nTRE, a ligação do hormônio faz com que o gene volte a ser inibido, porém, estudos demonstram que essa regulação por aporreceptores em nTREs não é tão simples como acontece com os pTREs. Alguns genes regulados negativamente pelo T3, como as sub-unidades α e β do TSH, apresentam apenas um sítio de ligação ao receptor, e, mesmo quando ocorre a ligação do aporreceptor, a transcrição permanece inibida, sugerindo que o efeito aporreceptor do TR seja dímero dependente, ou ainda que este sítio de ligação seja permissivo somente ao receptor ligado ao T3 e não a um receptor vazio (Brent et al, 1991; Williams and Brent, 1995).

A quantidade de aporreceptores pode variar em função dos estágios do desenvolvimento, e pode ser tecido-específica. Estudos sugerem que é preciso que ocorra um balanço preciso dos níveis de aporreceptores e holorreceptores para o desenvolvimento normal e para manutenção da homeostase dos tecidos (Chassande, 2003).

Além da formação do complexo T3-TR-TRE, outras proteínas, ou seja, fatores de transcrição, chamados de cofatores, participam do processo de regulação da transcrição. Dentre os cofatores, há os co-repressores e os co-ativadores. Os co-repressores são proteínas que ligam-se às hélices 3 e 5 do LBD do TR e causam uma mudança conformacional na cromatina deixando-a não permissiva aos fatores de transcrição, desta forma, os co-repressores inibem diretamente a transcrição basal do gene (Bassett et al, 2003). Muitos co-repressores de TR foram identificados,

mas os classicamente conhecidos são os dois que foram primeiramente descobertos, o *SMRT* (*silencing mediator for RAR and TR*) e o *NcoR* (*nuclear receptor corepressor*). Ambos apresentam semelhanças em estrutura e funcionalidade, causando uma deacetilação das histonas no nucleossomo, tornando assim a cromatina muito condensada e, portanto, inviável para o acoplamento da maquinaria regulatória da transcrição (Eckey et al, 2003). Entretanto, o *NcoR* parece ser preferencialmente recrutado pelo TR (Eckey et al, 2003). Este co-repressor parece estabilizar os homodímeros de TR, prevenindo a dissociação do complexo TR-TRE. Já com o heterodímero RXR/TR, tanto o *NcoR* como *SMRT* parecem se ligar fortemente ao RXR e de maneira branda ao TR (Makowski et al, 2003), diminuindo o silenciamento basal do gene (Yoh and Privalsky, 2001). A ligação do hormônio faz com que esses co-repressores se dissociem do TR e recrutem novas proteínas, os co-ativadores, que, por sua vez, remodelam a cromatina deixando-a permissiva aos fatores de transcrição (Bassett et al, 2003). Um conhecido co-ativador de TR é o *SRC-1* (*Steroid receptor coactivator-1*) que possui uma atividade acetil-transferase sobre as histonas (*histone acetyl transferase* - HAT), causando descondensamento dos nucleossomos e conseqüente exposição do DNA aos fatores de transcrição. Além disso, o *SRC-1* também atua como uma proteína adaptadora para a RNA polimerase II e para as demais proteínas envolvidas na regulação basal do gene. Um segundo grupo de co-ativadores são as TRAPs (*TR associated proteins*) que também promovem a ligação da RNA polimerase II ao DNA (Rosenfeld and Glass, 2001). A existência de aparentemente dois grupos distintos de co-ativadores sugere uma ativação gênica em etapas, onde primeiramente atua o *SRC-1*, com sua atividade HAT, e depois atuam as TRAPs, servindo de âncora para toda maquinaria necessária para regulação gênica (Bassett et al, 2003).

2.2 - Isoformas de TRs

Os primeiros estudos de clonagem de TRs sugeriram a existência de diferenças estruturais entre os clones. Um primeiro clone de TR foi obtido a partir de uma biblioteca de fígado de embrião de galinha (Sap et al, 1986), enquanto outro foi clonado de uma biblioteca de placenta humana (Weinberger et al, 1986). Uma grande disparidade nas sequências de aminoácidos foi observada principalmente no domínio A/B, deixando claro que estas diferenças não eram apenas variações entre as espécies e sim referentes a diferentes isoformas de TR (Lazar, 1993).

Quando a isoforma homologa a do embrião de galinha foi descoberta em ratos, um mapeamento genético foi feito para a espécie humana e descobriu-se que o gene desta isoforma localizava-se no cromossomo 17, enquanto que o gene da isoforma derivada da placenta localizava-se no cromossomo 3. A isoforma derivada do embrião de galinha, bem como seu respectivo gene, receberam a terminação α e a isoforma derivada da placenta humana e seu gene receberam a terminação β (Thompson, 1987).

O gene α além de codificar a isoforma funcional TR α 1, que se liga ao DNA e ao T3, pode sofrer *splicing* alternativo resultando em duas outras isoformas que não permitem a ligação do T3, mas ligam-se ao DNA, TR α 2 e TR α 3.

A isoforma TR α 2 não permite a ligação do T3, provavelmente por não apresentar os 40 aminoácidos finais no domínio E/F, existentes na isoforma TR α 1. Além disso, o domínio E/F apresenta 120 aminoácidos a mais em humanos e 122 a mais em ratos, os quais não apresentam homologia a nenhuma outra seqüência conhecida (Lazar, 1993). O TR α 2 funciona, pelo menos *in vitro*, como um antagonista da transcrição gênica mediada pelos outros TRs (Katz & Lazar, 1993).

A isoforma TR α 3, cuja função é desconhecida, também não apresenta os 40 aminoácidos finais do domínio E/F existentes na isoforma TR α 1. Além disso, não apresenta 39 aminoácidos presentes naquela seqüência de 120-122 aminoácidos, única da isoforma TR α 2 (Mitsubishi, 1988).

O gene TR α também pode codificar, por *splicing* alternativo, outras duas isoformas truncadas, o TR $\Delta\alpha$ 1 e o TR $\Delta\alpha$ 2. Essas isoformas, além de não permitirem a ligação do T3, também não se ligam ao DNA, provavelmente por não apresentarem aminoácidos importantes no domínio C, e atuam como antagonistas negativos dominantes (Bassett et al, 2003, Eckey et al, 2003). É digno de nota que os mecanismos desse antagonismo negativo ainda não foram elucidados.

O gene TR β codifica a isoforma funcional TR β 1, que se liga ao DNA e ao T3 normalmente. A ativação de um promotor alternativo do gene TR β , tecido-específico, resulta na isoforma TR β 2, também funcional e similar a isoforma TR β 1, porém com um domínio A/B único (Brent et al,

1991; Lazar, 1993). Esta isoforma é encontrada quase que exclusivamente na adenohipófise (Hodin et al, 1989), no hipotálamo, no corpo estriado e no hipocampo em desenvolvimento (Cook et al, 1992).

Outras duas variações de TR β foram descritas sendo resultado de *splicing* alternativo, a isoforma TR β 3 e a isoforma truncada TR $\Delta\beta$ 3. A primeira atua como um receptor funcional normal, ligando-se ao DNA e ao T3 normalmente e difere das isoformas β 1 e β 2 pelos aminoácidos exclusivos no domínio A/B, já a segunda atua como um antagonista negativo dominante, ligando-se ao T3 normalmente, mas não ao DNA (Eckey et al, 2003).

Os TRs são expressos basicamente em todos os tecidos, embora a distribuição desses receptores seja heterogênea. O TR α 1 é altamente expresso no músculo esquelético, tecido adiposo marrom (Mitsubishi et al, 1988), tecido cardíaco (Gloss et al, 2001), cerebelo (Forrest et al, 1990) e é ainda encontrado em células de osteossarcoma de ratos (Williams et al, 1994), osteoblastos humanos (Abu et al, 1997) e de camundongos (Gruber et al, 1999), osteoclastos (Allain et al, 1996) e condrócitos da placa de crescimento de humanos (Abu et al, 1997) e de ratos (Ballock et al, 1999). O TR α 2 é muito expresso no cérebro (Mitsubishi et al, 1989), mas também é encontrado no coração, testículos, rins, tecido adiposo marrom e músculo esquelético (Hodin et al, 1990; Mitsubishi et al, 1989; Murray et al, 1988). Assim como o TR α 1, o TR α 2 também é encontrado nos osteoblastos, osteoclastos e condrócitos (Williams et al, 1994; Allain et al, 1996; Abu et al, 1997). O TR β 1 é a isoforma mais homogeneamente distribuída, porém, é encontrada em altas concentrações no cérebro, fígado e rins (Koenig et al, 1988; Hodin et al, 1990). A isoforma TR β 2, como já foi dito, é encontrada quase que exclusivamente no eixo hipotálamo/hipófise e no SNC (Hodin et al, 1989). A isoforma TR β 3, ainda pouco estudada, possui uma distribuição homogênea pelos tecidos (Bassett et al, 2003). Considerando as diferentes isoformas de TR e a sua complexidade de ação, é desafiador tentarmos elucidar o papel de cada uma dessas isoformas nos tecidos.

2.3 - O Análogo do T3, GC-1

Chiellini et al (1998) desenvolveram o GC-1, um análogo do T3 cujas características chaves incluem uma ligação com metileno ao invés de uma ligação éter, uma cadeia lateral do ácido

oxiacético ao invés de uma cadeia lateral alanina e grupos metil ou isopropil no lugar dos iodetos. O GC-1 liga-se ao TR β 1 com a mesma afinidade que o T3, mas com uma afinidade 10 vezes menor pelo TR α 1, quando comparado ao T3. Isso provavelmente ocorre devido à capacidade do ácido oxiacético de fazer pontes de hidrogênio com os resíduos de Asparagina encontrados na porção polar do bolso receptor de ligante do TR β , porção essa que difere entre o TR α (o qual tem uma Serina no local da Asparagina) e TR β (Baxter et al, 2001; Wagner et al, 2001).

As propriedades de ativação gênica do GC-1 foram testadas em células de mamíferos através da transfecção de plasmídeos repórteres que continham TREs e, também, através da transfecção de plasmídeos que expressavam TR α 1 e TR β 1. Experimentos de transativação celular do tipo dose-resposta demonstram que o GC-1 é um agonista total do TR com potência similar ao T3, entretanto, a sua capacidade de ativação gênica é aproximadamente 20 vezes maior na presença de TR β 1 do que na presença de TR α 1. Assim sendo, o GC-1 exerce seletividade pelo TR β nas suas funções de ligação ao receptor e de ativação gênica (Chiellini et al, 1998). O hormônio tiroideano, entretanto, não expressa tal seletividade e liga-se ao TR α 1 e TR β 1 com a mesma afinidade.

A propriedade seletiva do GC-1 pelo TR β faz com que esse análogo seja útil em estudos animais que têm o objetivo de investigar os papéis relativos do TR α 1 e TR β 1 na mediação das ações do hormônio tiroideano. Os diferentes efeitos do GC-1 no sistema nervoso central (Manzano et al, 2003; Morte et al, 2004), tecido adiposo marrom (Ribeiro et al, 2001), hepatócitos e células acinares do pâncreas (Columbano et al, 2006) e na metamorfose dos girinos (Furlow et al, 2004) possivelmente dependem do reconhecimento específico dos genes pelo TR β . Por outro lado, os efeitos do GC-1 podem também estar relacionados com a distribuição das diferentes isoformas de TR pelo corpo, a qual se dá de maneira tecido-específica. O GC-1 praticamente não tem efeito na função cardíaca, onde há, predominantemente, a expressão de TR α 1, mas diminuiu os níveis séricos de colesterol e triglicérides, o que está de acordo com a alta expressão de TR β 1 no fígado (Trost et al, 2000). Em um recente estudo do nosso grupo, Freitas et al (2003) demonstraram que altas doses de T3 causam perda de massa óssea generalizada em ratas, enquanto que o tratamento com doses equimolares de GC-1 não apresentou efeito, sugerindo que o TR α 1 é a principal isoforma a mediar os efeitos osteopênicos do T3. Isso está de acordo com estudos que mostraram

que o mRNA do TR α 1 é 10-12 vezes mais expresso que do TR β 1 no fêmur e tibia de camundongos (O'Shea et al, 2003). Entretanto, a co-expressão de TR α 1 e TR β 1 no tecido ósseo e cartilagem, e ainda, a evidência de um efeito compensatório do TR β 1 no esqueleto de camundongos deficientes do TR α 1, sugerem que tanto o TR β 1 quanto o TR α 1, desempenham papéis fisiológicos no tecido ósseo.

2.4 - O hormônio tiroideano, os seus receptores e o tecido ósseo

O hormônio tiroideano 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 impedimento da diferenciação de condrócitos proliferativos em hipertróficos, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas. Por outro lado, o excesso de hormônio tiroideano resulta em maturação esquelética acelerada, fechamento prematuro das placas de crescimento e subsequente diminuição do crescimento dos membros e do peso corporal (Gouveia, 2004).

O hormônio tiroideano também tem efeito no osso adulto, sendo importante para a manutenção do metabolismo ósseo. Este estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea por regular a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Em condições de excesso de hormônio tiroideano, 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 (Mosekilde & Melsen, 1978; Gouveia et al, 1997). Por outro lado, no hipotireoidismo, o metabolismo ósseo é reduzido com inalteração ou pequeno aumento da massa óssea (Vestergaard et al, 2000). Porém, estudos mostram aumento do risco de fraturas na deficiência do hormônio tiroideano, o que pode ser explicado pela redução na qualidade óssea, em função da sua menor renovação, ou pelo aumento do risco de quedas, o que também é observado nesta condição (Vestergaard et al, 2002).

Embora a importância do hormônio tiroideano no desenvolvimento e metabolismo ósseos seja clara, pouco se sabe a respeito dos mecanismos que medeiam os efeitos desse hormônio 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. O GH e T3 interagem na estimulação do crescimento ósseo longitudinal e na maturação óssea (Freitas et al, 2003; Gouveia, 2004).

A identificação das isoformas TR α 1, TR α 2 e TR β 1 em células osteoblásticas (Rizzoli et al, 1986; Sato et al, 1987; LeBron et al, 1989; Kasono, 1988) , osteoclásticas (Allain et al, 1996; Abu et al, 1997) e condrócitos das placas epifisárias de crescimento (Abu et al, 1997; Robson et al, 2000), bem como a responsividade dessas células ao hormônio tiroideano em culturas isoladas, evidenciam uma ação direta do T3 no tecido ósseo.

Apesar da identificação de TRs em células ósseas, a importância funcional das diferentes isoformas de TR é praticamente desconhecida no tecido ósseo. Williams et al (1994) demonstraram que as isoformas TR α 1 e TR β 1 estão presentes, funcionalmente e em proporções variadas, em três linhagens de células de osteosarcoma que expressam fenótipos de fibroblasto, preosteoblasto, e osteoblasto maduro (ROS25/1, UMR 106 e ROS17/2.8, respectivamente). Neste estudo foi demonstrado que as células ROS17/2.8 expressam dez vezes mais as isoformas TR α 2 e TR β 1 em comparação a isoforma TR α 1, enquanto que as células ROS25/1 expressam predominantemente as isoformas TR α 1 e 2 com baixíssimos níveis de mRNA de TR β 1. Esses achados sugerem uma possível mudança na ação do hormônio tiroideano durante o desenvolvimento ósseo.

Abu et al (1997) demonstraram uma variação da expressão das isoformas de TR dependendo da localização/atividade de células ósseas humanas. Em locais de remodelamento ósseo, TR α 1, TR α 2 e TR β 1 foram amplamente expressos em osteoblastos, mas em superfícies de formação óssea, por ossificação intramembranosa, apenas TR α 2 e TR β 1 foram detectados. Em superfícies de reabsorção óssea, TR β 1 e TR α 2 foram encontrados em osteoclastos, enquanto TR α 1 foi detectado apenas raramente. Em regiões de ossificação endocondral, TR α 1 e TR β 1 foram identificados em condrócitos indiferenciados e TR α 2 e TR β 1 foram identificados em condrócitos proliferativos, maduros e hipertróficos, enquanto que TR α 1 foi raramente identificado nessas células.

A inativação (*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 T3. Esses modelos também têm sido importantes para a identificação dos tecidos alvos nos quais o hormônio tiroideano tem papel fundamental.

Um estudo de Fraichard et al (1997) mostrou que o knockout do TR α (TR $\alpha^{-/-}$), que não expressa TR α 1 e TR α 2, mas mantém a expressão das isoformas truncadas TR $\Delta\alpha$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2, apresenta retardo no crescimento, atraso na ossificação endocondral e mineralização, redução da massa óssea, desorganização da placa epifisária de crescimento e redução do número de condrócitos hipertróficos. Esses camundongos são deficientes de GH e apresentam um *status* endócrino de hipotireoidismo. Num primeiro momento, considerou-se que o retardo no crescimento desses mutantes fosse devido aos baixos níveis de GH/IGF-I. No entanto, o knockout completo do TR α (TR $\alpha^{0/0}$), que não expressa as formas truncadas, apresenta as mesmas alterações fenotípicas do TR $\alpha^{-/-}$, porém com um *status* endócrino de eutireoidismo e com níveis normais de GH/IGF-I, sugerindo efeitos diretos do hormônio tiroideano no esqueleto, independentes do eixo GH/IGF-I (Gauthier et al, 2001).

Os knockouts do TR β (TR $\beta^{-/-}$) e do TR β 2 (TR β 2 $^{-/-}$) não apresentaram nenhum efeito fenotípico no esqueleto (Forrest et al, 1996; Abel et al, 1999), nem retardo no crescimento, sugerindo que o TR α seria a isoforma funcional no tecido ósseo. Porém, sabe-se que mutações (knockin) no gene TR β levam à síndrome denominada Resistência ao Hormônio Tiroideano (RTH). Uma dessas mutações do TR β é denominada PV (TR β PV). O TR β PV não é capaz de ligar T3, sendo um dos mais potentes mutantes negativo-dominantes do TR β . Os portadores dessa síndrome apresentam elevados graus de TSH, T3 e T4, além de distúrbios de aprendizado, retardo mental e de crescimento, defeitos auditivos e severas alterações esqueléticas como uma idade óssea avançada e craniossinostose (Kaneshige et al, 2000; Bassett and Williams, 2003).

A inativação simultânea de ambos os receptores α e β (TR $\alpha^{-/-}$ TR $\beta^{-/-}$) (Gauthier et al, 1999) e do α 1 e β (TR α 1 $^{-/-}$ TR β 1 $^{-/-}$) (Gothe et al, 1999) gerou praticamente o mesmo fenótipo de retardo no crescimento e na maturação óssea, similar ao que ocorre no TR $\alpha^{-/-}$. Os camundongos TR α 1 $^{-/-}$ /TR β 1 $^{-/-}$ apresentaram severa diminuição no comprimento do fêmur, tíbia e sexta vértebra lombar, bem como placas de crescimento desorganizadas e atraso na ossificação das epífises. Esses camundongos apresentam baixos níveis de GH e IGF-I enquanto que o mesmo não é

observado para os camundongos $TR\alpha^{-/-}TR\beta^{-/-}$. Esses estudos mostram a importância dos TRs para o desenvolvimento ósseo.

É digno de nota que camundongos deficientes do $TR\alpha1$ ($TR\alpha1^{-/-}$), assim como o $TR\beta^{-/-}$, não apresentam nenhum efeito fenotípico no esqueleto, nem retardo no crescimento. Esse achado indica que o $TR\beta$ pode compensar a falta do $TR\alpha1$ e vice-versa (Gouveia, 2004). Além disso, a falta de alterações fenotípicas nos camundongos $TR\alpha1^{-/-}$ e a presença de importantes alterações nos camundongos $TR\alpha^{-/-}$ e $TR\alpha^{0/0}$ sugerem que a isoforma $TR\alpha2$, que não liga T3, é importante para modular a ação dos outros receptores (Bassett and Williams, 2003).

De fato, mostrou-se que o knockout do $TR\alpha2$ ($TR\alpha2^{-/-}$) apresenta uma super-expressão do $TR\alpha1$ e um fenótipo complexo com baixos níveis séricos de T3 e T4 livres e níveis normais de TSH, além de redução dos níveis séricos de IGF-I com níveis normais de GH. Esses camundongos apresentam diminuição do peso corporal, aumento da frequência cardíaca e aumento da temperatura corporal. Em relação às alterações esqueléticas, esses animais apresentam uma mineralização anormal, diminuição do conteúdo mineral ósseo (BMC) do osso cortical da tíbia e diminuição da densidade mineral óssea (BMD) do fêmur, vértebra e do osso trabecular da tíbia proximal (Salto et al, 2001). Assim sendo, os camundongos $TR\alpha2^{-/-}$ apresentam um fenótipo misto de hiper e hipotiroidismo, causado pela super-expressão do $TR\alpha1$, ou falta do $TR\alpha2$.

Recentemente gerou-se camundongos com inativação do gene *Pax8* ($Pax8^{-/-}$) (Pasca di Magliano et al, 2000), que é responsável pela diferenciação das células tiroideanas (tirócitos). Dessa forma, esses animais não são capazes de sintetizar hormônio tiroideano, mas expressam todas as isoformas de TRs (Mansouri et al, 1998). O fenótipo desses mutantes é semelhante ao dos camundongos $TR\alpha^{-/-}/TR\beta^{-/-}$, porém muito mais severo (alto retardo no crescimento, mineralização reduzida, diminuição do tamanho do baço e desenvolvimento prejudicado do intestino). Os camundongos $Pax8^{-/-}$ são inviáveis e morrem no momento do desmame, no entanto, o tratamento com T4 nesse período recupera o crescimento e possibilita que esses animais atinjam a idade adulta (Flamant et al, 2002).

O fenótipo inviável apresentado pelos camundongos $Pax8^{-/-}$ sugere uma forte ação deletéria dos aporreceptores no desenvolvimento pós-natal e ainda deixa claro a importância da presença do

hormônio tiroideano nesse momento do desenvolvimento. No entanto, foi demonstrado que um estado de tirotoxicose nesse mesmo período gera retardo no crescimento, maturação óssea acelerada e taquicardia (Glinoeer, 2000) indicando que é necessário haver um balanço entre aporreceptores e holorreceptores para um desenvolvimento normal (Chassande et al, 2003).

O knockout $Pax8^{-/-}TR\alpha^{0/0}$ apresentaram praticamente os mesmos defeitos esqueléticos do $Pax8^{-/-}$, só que menos severos, o que permitiu que os animais atingissem a idade adulta (Flamant et al, 2002). Esse achado sugeriu uma fraca ação aporreceptoras do $TR\beta$ (Bassett and Williams, 2003). Já os animais $Pax8^{-/-}TR\beta^{-/-}$ apresentaram o mesmo fenótipo inviável dos $Pax8^{-/-}$, sugerindo uma forte atividade aporreceptora do $TR\alpha$ (Flamant et al, 2002; Chassande, 2003).

Estudos em desenvolvimento no nosso laboratório que utilizam o GC-1 têm sido importantes para elucidar o papel dos TRs no desenvolvimento e metabolismo ósseo *in vivo* e *in vitro*. Nós identificamos, por exemplo, que o GC-1, ao contrário do T3, não é capaz de induzir osteopenia. Esse achado parcialmente sugere que o $TR\alpha$, e não o $TR\beta$, está envolvido na perda de massa óssea induzida pelo hormônio tiroideano (Freitas et al, 2003). Por outro lado, observamos que o GC-1 é capaz de aumentar a taxa de mineralização óssea, um processo mediado pelos osteoblastos, o que sugere que o $TR\beta$ medeia efeitos estimulatórios do T3 sobre a atividade osteoblástica (dados não publicados).

Em recente estudo do nosso grupo, Freitas et al (2005) demonstraram que o GC-1 parcialmente reverteu os efeitos do hipotireoidismo na maturação e desenvolvimento ósseo, sendo incapaz de impedir a desorganização nas colunas de condrócitos proliferativos, não afetando os níveis séricos de IGF-I nem afetando o crescimento longitudinal do corpo. Em contrapartida, nesse mesmo estudo, o GC-1 induziu a ossificação, a expressão de mRNA de colágeno tipo II e X e promoveu um ganho no BMD da tíbia e fêmur total, o que sugere que o $TR\beta$ medeia importantes ações no desenvolvimento ósseo.

Sendo assim, os diferentes fenótipos desenvolvidos pelos camundongos mutantes ("knockout" e "knockin") e pelos ratos tratados com GC-1, sugerem que uma complexa interação das diferentes isoformas de TR com os seus genes alvo, medeia os efeitos do hormônio tiroideano no

desenvolvimento e maturação ósseos, apontando o esqueleto como um importante tecido alvo do T3.

2.5 - O ciclo de crescimento celular *In Vitro*

O ciclo de crescimento celular *in vitro* é dividido em três fases distintas: Lag, Log e Platô. A fase Lag é a fase que vem logo depois da inoculação, com uma pequena ou nula evidência de aumento do número de células. Isso ocorre por ser um período de adaptação, onde cada célula repõe os elementos do glicocálice perdidos na tripsinização, adere ao substrato e se expande. Além disso, o citoesqueleto reaparece, o que, provavelmente, é um fator determinante da expansão celular (Freshney, 1994). A fase seguinte, fase Log, é caracterizada por um aumento exponencial do número de células logo após a fase de adaptação. A duração da fase Log depende da densidade de células no plaqueamento, do ritmo de crescimento das células e da densidade celular necessária para inibir a proliferação. Nesta fase, a cultura tem um crescimento de 90-100% e está na sua forma mais reprodutiva. A última fase é a Platô, onde a cultura se torna confluenta e o ritmo de crescimento se reduz entre 0-10%. Essa fase não representa simplesmente a parada da proliferação celular, mas representa um estado de equilíbrio entre a divisão celular e a morte celular. Acredita-se que esse estado de equilíbrio possa ser parcialmente explicado pela "inibição por contato". No momento em que as células apresentam um contato intenso umas com as outras, elas apresentam uma diminuição da sua motilidade, a membrana plasmática apresenta um menor número de dobras e as células apresentam uma menor área de superfície em contato com o meio (Abercrombie et al, 1954). Isso, provavelmente, limita as trocas de nutrientes e metabólitos com o meio, prejudicando o crescimento celular. Além disso, é possível que o contato estimule a produção e liberação de fatores que inibem a proliferação celular e estimulam a morte celular.

Entretanto, a densidade e o contato são também fundamentais para o crescimento exponencial na fase Log. Acredita-se que esse contato celular estimule a liberação de fatores estimulatórios da proliferação celular (Abercrombie et al, 1954).

2.6 - O processo de maturação osteoblástica

A maturação osteoblástica *in vitro* e *in vivo* é um processo altamente regulado, caracterizado por três fases distintas nas quais genes específicos são expressos. Esses genes, justamente por

apresentarem especificidade temporal de expressão, são considerados marcadores fenotípicos ou de diferenciação osteoblástica, sendo bastante úteis em estudos nessa área. A primeira fase da maturação osteoblástica é a de proliferação celular, onde as células apresentam um padrão logarítmico de crescimento. A segunda fase é a de maturação e deposição da matriz extracelular, e por fim, a terceira corresponde à mineralização dessa matriz (Quarles et al, 1992 ; Lynch et al, 1995).

Nos primeiros dias em cultura, durante a fase de proliferação, são expressos genes envolvidos na regulação do ciclo celular (histonas H1 e H4), e no crescimento celular (*c-myc*, *c-fos* e *c-jun*). Nessa fase, ainda observa-se uma elevada expressão de genes associados à formação da matriz extracelular, como fibronectina, TGF- β e colágeno tipo I (Col I), a proteína mais abundante e fundamental para a formação da matriz extracelular (Stein et al, 1989 ; Owen et al, 1990). Owen et al (1990) demonstraram a importância da expressão do Col I nesta fase através da utilização de hidroxíurea. A hidroxíurea inibiu a proliferação celular reduzindo o período de síntese de Col I, comprometendo a mineralização e a posterior expressão de genes relacionados ao processo.

Lynch et al (1995), em estudos com osteoblastos cultivados em placas tratadas com um filme de colágeno I (para simular o Col I da matriz extracelular), corroboraram os achados de Owen et al (1990) demonstrando a importância da síntese de Col I durante a proliferação. Nesse estudo, eles observaram que osteoblastos cultivados em um filme de colágeno I tiveram uma proliferação levemente reduzida, redução de 50-75% no mRNA do Col I e uma expressão precoce e aumentada de proteínas não colágenas da matriz, como fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OP), osteocalcina (OC) e osteonectina; sugerindo que o Col I da matriz é essencial para os eventos pós-proliferativos da maturação osteoblástica.

A segunda fase, a de maturação da matriz, é iniciada com o fim da proliferação, com uma expressiva redução na expressão dos genes proliferativos e associados à formação da matriz, além de uma alta e imediata expressão da fosfatase alcalina (ALP), uma proteína que está envolvida na preparação da matriz, de forma que os minerais sejam depositados de maneira ordenada (Owen et al, 1990). Estudos sugerem uma íntima relação entre o fim da fase de proliferação e a expressão da ALP não sendo esta dependente da confluência, pois quando a proliferação é inibida com hidroxíurea, mesmo em culturas sub-confluentes, a expressão de ALP é rapidamente aumentada (Stein et al 1989 ; Quarles et al, 1992 ; Stein et al 1993).

Na transição da fase de maturação para a de mineralização, é expresso o gene da osteopontina (OP), uma proteína que juntamente com a osteocalcina (OC), está envolvida com o início e manutenção do processo de mineralização (Owen et al, 1990).

Na última fase da maturação osteoblástica, ocorre a mineralização da matriz extracelular, onde inicia-se a formação de nódulos de ossificação. Nesta fase, a expressão de ALP é praticamente inexistente, a osteopontina é expressa no início, e somente o gene da OC é altamente expresso durante toda mineralização. A OC é uma proteína que se liga fortemente aos cristais de hidroxiapatita da matriz e que possivelmente coordena a deposição do cálcio nos mesmos (Stein et al, 1993). Liu et al (1994), estudando osteoblastos em diferentes estágios de maturação, demonstraram, por PCR, que a OC não é expressa em fibroblastos nem em osteoblastos imaturos, é pouco expressa em osteoblastos diferenciados e altamente expressa em osteoblastos maduros com o osteóide já sendo mineralizado.

Stein et al (1989) e Owen et al (1990) descreveram dois momentos, denominados pontos de restrição, em que o processo de maturação osteoblástica não pode prosseguir sem sinais apropriados. O primeiro ponto é o final da fase de proliferação, no qual genes reguladores do ciclo celular e do crescimento celular são inibidos, e genes de maturação da matriz começam a ser expressos. Esta fase de transição entre proliferação/maturação é considerada um ponto de restrição, pois os genes de maturação como ALP e OP somente começam a ser expressos quando a fase de proliferação se encerra completamente.

O segundo ponto de restrição é o início da mineralização. Owen et al (1990) demonstraram que se não houver um acúmulo correto de minerais na segunda fase, os genes de mineralização (OC) não são expressos e com isso a mineralização não ocorre. Portanto este também é um ponto de restrição, pois mesmo com a expressão de ALP e OP na segunda fase, se não houver um acúmulo de minerais a terceira fase não se completa.

Assim sendo, o processo de proliferação/diferenciação osteoblástica é muito bem regulado, apresentando uma expressão precisa e temporal de seus genes, onde o desenvolvimento normal das fases seguintes depende da completa conclusão das anteriores. Um resumo das fases de maturação osteoblástica, bem como os principais genes expressos em cada uma delas, e dos pontos de restrição está representado na Fig. 3.

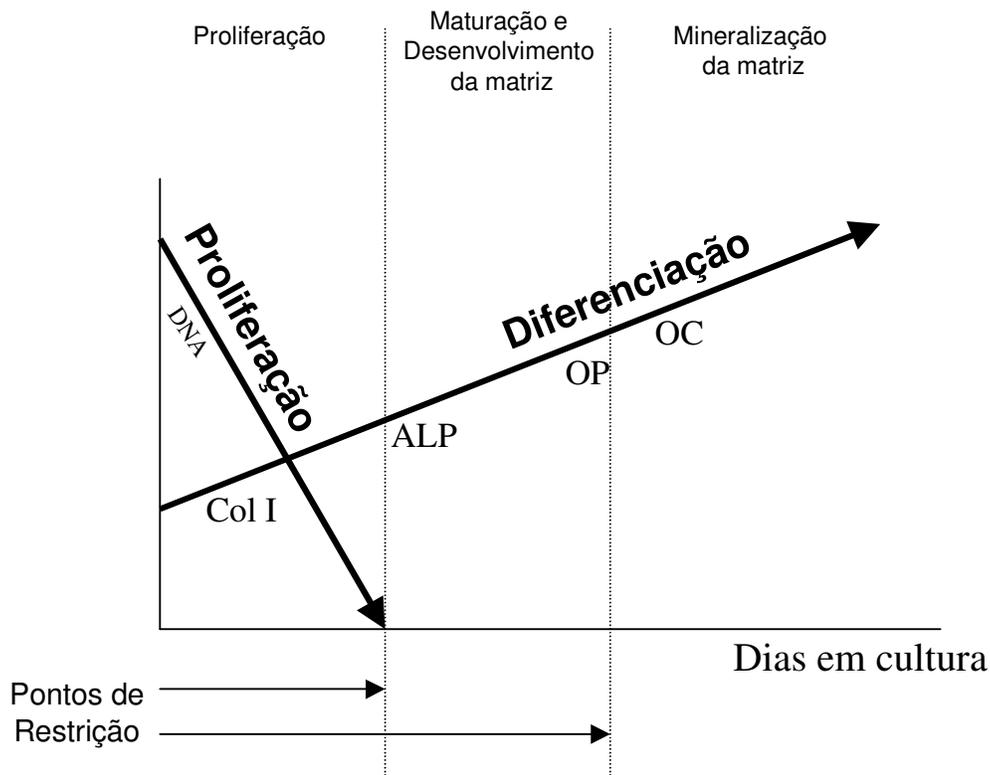


Figura 3. Processo de maturação osteoblástica com os principais genes expressos em cada fase. (Owen et al, 1990).

2.7 – Utilização de linhagens de células osteoblásticas como modelo para o estudo dos efeitos do hormônio tiroideano

O fato das células ósseas expressarem TRs funcionais sugere que o T3 atue diretamente no tecido ósseo. Dentre as diversas linhagens de células osteoblásticas, duas são muito comumente utilizadas em estudos dos efeitos do hormônio tiroideano em osteoblastos, uma vez que são responsivas ao T3 e expressam TR α 1, TR α 2 e TR β 1. Essas linhagens são as ROS17/2.8 e as MC3T3-E1. No presente estudo, utilizamos essas duas linhagens pelo motivo de ambas apresentarem peculiaridades interessantes. As células ROS17/2.8 são derivadas de osteosarcoma de rato e expressam o fenótipo de osteoblastos maduros desde os primeiros dias em cultura,

expressando genes marcadores da maturação osteoblástica, como a Osteocalcina (Stein et al, 1993).

As células MC3T3-E1, derivadas da calvária de camundongos, expressam o fenótipo de pré-osteoblastos nos primeiros dias em cultura, mas sofrem uma seqüência progressiva de proliferação e diferenciação ao longo do cultivo, até atingirem o fenótipo de osteoblastos maduros (Quarles et al, 1992).

2.8 - Efeitos do hormônio tiroideano na maturação osteoblástica

Utilizando células ROS17/2.8 como modelo, Fusinita et al (1993) mostraram que o aumento da densidade celular resulta na inibição da expressão de genes específicos da proliferação celular, tais como a histona H4 e H2B, com concomitante aumento da expressão de genes fenotípicos dos osteoblastos. Posteriormente, Ohishi et al (1994) viram que, em células derivadas da calvária de ratos, o T3 suprime a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, mas aumenta a atividade funcional de osteoblastos maduros, aumentando de forma dose-dependente a expressão do mRNA da OC. Neste mesmo estudo, também foi demonstrado que o T3 gerou uma diminuição na quantidade de DNA após as células atingirem confluência.

Kasono et al (1988) também mostraram efeitos inibitórios na proliferação utilizando T4, o qual também estimulou a atividade da ALP de maneira dependente da dose em células osteoblásticas MC3T3-E1, derivadas da calvária de camundongos. Nessas mesmas células, Klaushofer et al (1995), demonstraram que o tratamento por 24 horas com T3 inibiu a proliferação celular de culturas confluentes, provavelmente por ter inibido a expressão do gene da histona H4. Nesse estudo, o T3 estimulou a atividade da ALP de maneira tempo-dependente, mas não alterou a expressão do seu mRNA.

Outros pesquisadores compartilharam dos mesmos resultados, mostrando que o T3 inibe a expressão de genes relacionados à proliferação (histona H4, *c-fos* e *c-jun*) em culturas confluentes de osteoblastos MC3T3-E1, e estimula tanto a atividade da ALP como a expressão da OC, sendo esta última de maneira dose e tempo-dependente (Fratzl-Zelman et al, 1997 ; Varga et al,1997).

Gouveia et al (2001), ao estudarem as células osteoblasto-*like* ROS17/2.8, mostraram que a expressão do mRNA da OC é baixa em culturas subconfluentes e que, à medida que a confluência aumenta, ocorre aumento da expressão do mRNA da OC, sugerindo uma certa diferenciação celular em função do aumento da confluência. Além disso, mostraram que a indução da expressão da OC pelo T3 foi mais intensa em culturas subconfluentes. Esses achados indicam que o T3 acelera o processo de maturação osteoblástica e corroboram os estudos que mostram que o hormônio tiroideano estimula a diferenciação celular.

Em contrapartida, Williams et al (1995), em células pré-osteoblásticas UMR 106 e em osteoblastos maduros ROS17/2.8 tratados por 24 horas com diferentes doses de T3, não encontraram nenhuma alteração na expressão do mRNA de ALP, OP, Col I e OC. Apenas com 48 horas de tratamento, o T3 induziu somente o mRNA da OC.

Estudos em osteoblastos maduros humanos também apresentaram efeitos na proliferação e diferenciação quando tratados com 10^{-8} M de T3. Essas células apresentaram um aumento na proliferação nas primeiras 24h, mas uma forte inibição da proliferação com 48h e 72h (Pepene et al, 2003). Com relação à diferenciação, o T3 aumentou a atividade da ALP nessas células.

Apesar de muitos efeitos do hormônio tireoideano já terem sido descritos nos osteoblastos, não se sabe quais isoformas de TRs os medeiam. O tratamento de células osteoblásticas com o análogo seletivo do TR β , o GC-1, poderia contribuir para o entendimento do papel dos TRs nessas células. Entretanto, não se sabe se os osteoblastos são responsivos ao GC-1 *in vitro* e se os efeitos do GC-1 diferem dos do T3.

3 - OBJETIVOS

Avaliar a responsividade de células osteoblásticas, derivadas de rato (ROS 17/2.8) e camundongo (MC3T3-E1), ao GC-1 através do estudo dos efeitos desse tiromimético na proliferação e diferenciação dessas células e na expressão gênica do TR α 1 e TR β 1.

3.1 - Objetivos específicos

Para ambas linhagens, os objetivos específicos foram:

- (i) Estudar o efeito do T3 e GC-1 no ciclo de crescimento celular;
- (ii) Estudar o efeito do T3 e GC-1 na proliferação e morte celular;
- (iii) Estudar o efeito do T3 e GC-1 na expressão do mRNA de genes marcadores da diferenciação osteoblástica (osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I);
- (iv) Estudar o efeito do T3 e GC-1 na expressão do mRNA do TR α 1 e TR β 1.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Estudo do ciclo do crescimento celular

As células ROS17/2.8 (passagens 7-9) foram semeadas em três placas de 24 poços (Corning, NY, USA). Na primeira placa, adicionou-se 10^4 células por poço; na segunda placa, 2.6×10^4 células por poço e, na terceira placa, 5×10^4 células por poço. Para essas inoculações, as células foram suspensas em meio completo (MC), composto por Ham's F-12 [(meio Ham's F-12 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (vol/vol) de soro de feto bovino (FBS, Gibco-BRL)], dentro de tubos Falcon de 50 ml, nas concentrações de 10^4 , 2.6×10^4 e 5×10^4 células/ml. Nas placas correspondentes, adicionou-se 1 ml de suspensão de células por poço com uma micropipeta de 1000 μ l (Gilson-Rainin Instrument Co., Emeryville, C.A., USA). A cada adição, a suspensão de células era cuidadosamente agitada para evitar o acúmulo de células no fundo do tubo e permitir, assim, a manutenção da homogeneidade do número de células por toda a suspensão. Dessa forma, procurou-se garantir que praticamente o mesmo número de células fosse adicionado em cada poço de cada placa. O dia da inoculação (plaqueamento) foi considerado o dia zero. Nos dias um, dois, três, quatro, seis e dez após o plaqueamento, as células foram coletadas e contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer (Improved Neubauer). Em cada dia de contagem, contou-se três poços por placa (três poços/dia). A partir das contagens, calculou-se o número total de células por poço. Dos três poços de cada ponto, foi calculada a média do número total de células e os resultados foram plotados em gráficos.

O estudo do ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 (passagens 5-8) foi feito da mesma maneira como para as ROS17/2.8. As mesmas três densidades foram testadas (10^4 , 2.6×10^4 e 5×10^4 células por poço), porém para essas inoculações, as células foram suspensas em MC, composto por α -MEM [(meio α -modified Eagle's medium (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (vol/vol) de soro de feto bovino (FBS; CULTILAB)], dentro de tubos Falcon de 50 ml, nas concentrações de 10^4 , 2.6×10^4 e 5×10^4 células/ml. Nas placas correspondentes, adicionou-se 1 ml de suspensão de células por poço como descrito para as

células ROS17/2.8. As células foram coletadas e contadas nos dias um, dois, três, cinco, oito, dez, quatorze e vinte e um após o plaqueamento. Assim como para as ROS17/2.8, em cada dia de contagem, três poços por placa foram contados (três poços/dia). O número total de células por poço foi determinado e uma média dos três poços de cada ponto foi calculada para em seguida os resultados serem plotados em gráficos.

4.2 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células ROS 17/2.8

As células ROS 17/2.8 (passagem 7-9) foram semeadas numa densidade de 2.6×10^4 células/poço, em três placas de 24 poços (Corning, NY, USA). Uma placa controle (sem tratamento hormonal); outra tratada com T3 e a terceira tratada com GC-1. O dia do plaqueamento foi considerado dia zero. As células permaneceram em MC até o terceiro dia da cultura quando, então, foram transferidas para meio sem soro (MSS) [meio Ham's F-12 suplementado com Insulina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), Transferrina (Gibco-BRL) e Seleneto de sódio (Sigma Chemical Co., Poole, UK), nas concentrações de 5 µg/ml, 5 µg/ml e 5 ng/ml, respectivamente, além de Penicilina-Streptomicina (Gibco-BRL), em uma concentração de 50-50 u/ml]. Neste dia, células de um poço de cada placa foram contadas. Após 24 horas em MSS (dia quatro de estudo, e dia zero de tratamento), células de mais um poço de cada placa foram contadas e, nos poços restantes, foi iniciado o tratamento hormonal com 10^{-8} M de T3 (Sigma Chemical Co.) e 10^{-8} M de GC-1 (gentilmente cedido pelo Dr. Thomas Scanlan da University of California, Los Angeles, USA). Foram realizadas contagens do número de células por poço, de três poços de cada placa, nos dias 1, 2, 3, 4, 6 e 8 de tratamento; e de dois poços por placa nos dias 10 e 12 de tratamento. Os meios de cultura foram trocados a cada 24 horas a partir do início do tratamento hormonal.

4.3 -Avaliação do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células MC3T3-E1

4.3.1 - Tratamento do FBS com carvão ativado

Como as células MC3T3-E1 apresentaram baixa sobrevivência em MSS, foi necessário utilizar FBS tratado com carvão ativado [*charcoal stripped serum* (CSS)]. O tratamento do soro com carvão ativado é utilizado basicamente para retirar lípidos, esteróides e hormônio tiroideano do soro, mantendo fatores essenciais para proliferação e sobrevivência das células. Para tanto, foram adicionados 6,5 g de carvão ativado (Merck - Germany) para cada 100 ml de FBS (CULTILAB). Essa mistura foi mantida em um agitador magnético por 12 horas, a 4°C. Após esse período, o

soro foi centrifugado em uma ultra-centrifuga (SORVALL Ultra pro 80, Kendro Laboratory Products – Newtown, Connecticut- USA) por 1 hora, a 48000 G, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado novamente. Esse procedimento foi repetido três vezes. Ao final de todas as centrifugações, o CSS, foi esterilizado por filtração utilizando-se um filtro de seringa com poro de 0.22µm (Fisherbrand, Ireland). Após esse tratamento, o CSS apresentou níveis indetectáveis de T3 e T4 por radioimunoensaio (SCHERING AS, Cis Bio International – France, adquirido da REM).

4.3.2 - Determinação do meio sem soro das células MC3T3-E1

Para a determinação da menor porcentagem de CSS no meio de cultura que permitisse que as células proliferassem e sobrevivessem, foi realizado um estudo do ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 cultivadas em meio contendo diferentes porcentagens de CSS (10%, 5%, 2,5% e 1,25%). Inicialmente, as células foram plaqueadas numa placa de 24 poços (Corning, NY, USA) a uma densidade de 10^4 células/poço e foram cultivadas em meio contendo FBS (CULTILAB) a 10% por 48 horas. Após esse período, iniciou-se o cultivo com as diferentes porcentagens de FBS depletado (CSS). Havia 4 poços para cada porcentagem testada e mais 4 poços que continuaram em meio completo, com FBS a 10%, que serviram como controle. Um poço de cada porcentagem foi contado nos dias 2,7,15 e 21 após o início do cultivo com meio contendo FBS depletado (MCSS) e os resultados foram plotados em um gráfico.

4.3.3 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células MC3T3-E1, utilizando meio suplementado com FBS tratado com carvão ativado (MCSS)

As células MC3T3-E1 foram plaqueadas numa densidade de $0,5 \times 10^4$ células/poço em três placas de 24 poços (Corning, NY, USA). Uma placa controle (sem tratamento hormonal), outra tratada com T3 e a terceira tratada com GC-1. O dia do plaqueamento foi considerado dia zero. As células permaneceram em MC até o quarto dia da cultura quando, então, foram transferidas para MCSS [meio α -MEM suplementado com 5% de CSS, Insulina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), Transferrina (Gibco-BRL) e Seleneto de sódio (Sigma Chemical Co., Poole, UK), nas concentrações de 5 µg/ml, 5 µg/ml e 5 ng/ml, respectivamente, além de Penicilina-Streptomicina (Gibco-BRL), em uma concentração de 50-50 u/ml]. Neste dia, células de um poço de cada placa foram contadas. Após 24 horas em MCSS (dia cinco de estudo, e dia zero de tratamento), células

de mais um poço de cada placa foram contadas e nos poços restantes, foi iniciado o tratamento hormonal com 10^{-8} M de T3 (Sigma Chemical Co.) e 10^{-8} M de GC-1 (gentilmente cedido pelo Dr. Thomas Scanlan da University of California, Los Angeles, USA). Foram realizadas contagens do número de células por poço, de dois poços de cada placa, no dia 1 e 2, e de três poços por placa nos dias 4, 9, 11, 13 e 14 de tratamento. Os meios de cultura foram trocados a cada 24 horas a partir do início do tratamento hormonal.

4.4 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 na proliferação celular por incorporação de BrdU

Em uma placa de petri de 100mm (Corning, NY, USA), foram distribuídas nove lamínulas de vidro. Em cada lamínula, foram plaqueadas 10^4 células ROS17/2.8 ou MC3T3-E1/40 μ l de meio completo. Após o plaqueamento, as células permaneceram em uma incubadora de umidade controlada a 37°C e 5% CO₂ por 1 hora. Em seguida, 12ml de meio completo foram adicionados vagarosamente nas paredes da placa de petri. Após permanecerem por 48 horas em meio completo, as células ROS17/2.8 foram transferidas para meio sem soro (MSS) e as MC3T3-E1, para meio contendo 5% de FBS tratado com carvão ativado (MCSS). Para isso, todo meio completo foi retirado cuidadosamente da placa e, logo em seguida, foram adicionados 12 ml de PBS de Dulbecco (Gibco-BRL) para lavagem das células. As células foram então transferidas para uma nova placa de petri de 100mm, contendo 12 ml de PBS para uma segunda lavagem das células. Ao transferir as células de uma placa para a outra, sempre foi tomado o cuidado para que a face da lamínula que continha as células ficasse voltada para cima. Após a segunda lavagem, todo PBS foi retirado e 12 ml de MSS ou MCSS foram adicionados na parede da placa. O próximo passo foi transferir as lamínulas para uma placa de 6 poços (COSTAR - Corning) colocando 3 lamínulas/poços (cada poço correspondeu a um tratamento: Controle, T3 e GC-1). Novamente, durante a transferência, foi tomado o cuidado para que a face da lamínula com células ficasse voltada para cima. As células foram mantidas por 24 horas em MSS ou MCSS e, em seguida, iniciou-se o tratamento hormonal com T3 e/ou GC-1 a 10^{-8} M. A incorporação de 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma-Germany) foi feita após 1 dia e após 6 dias de tratamento (experimentos separados). Para o experimento de 6 dias de tratamento, o meio de cultura, contendo 10^{-8} M de T3 ou GC-1 ou sem tratamento, foi trocado rigorosamente a cada 24 horas. Para ambos experimentos, exatamente 12 horas antes do final do período de tratamento, foi adicionado 100 μ M de BrdU diretamente no meio de cultura. Terminado o período de tratamento,

as células foram fixadas com Metanol gelado (MERCK-Germany). Para isso, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e, logo em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS a 37°C. Após a segunda lavagem, foi adicionado metanol gelado numa quantidade que cobrisse por completo as lamínulas. Passados 10 minutos, uma grande quantidade de PBS a temperatura ambiente foi adicionada diretamente ao metanol para reidratação. Em seguida, as células foram lavadas 3x com PBS a temperatura ambiente e permaneceram mais 15 minutos em PBS para plena reidratação antes do início da Imunocitoquímica.

4.4.1 - Imunocitoquímica por reação de imunofluorescência

Após ter deixado as células por 15 minutos em PBS, foi adicionado cerca de 2ml de HCl (1,5M) em cada poço, com agitação, por 30 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas três vezes (cinco minutos cada, com agitação) com PBS a temperatura ambiente. Uma tampa de placa de 24 poços (Corning, NY, USA) foi revestida com parafilme bem esticado e, no local correspondente a cada poço, foi colocado 40µl de Ab anti-BrdU (Anti-Bromodeoxyuridine + Nuclease; Amersham Biosciences - UK). As lamínulas foram retiradas das placas com uma pinça e colocadas com a face contendo as células para baixo, sobre o anti-BrdU onde permaneceram por 30 minutos a temperatura ambiente. Passados 30 minutos, as lamínulas foram desviradas e colocadas de volta nas placas com a face contendo as células para cima, para serem lavadas três vezes (cinco minutos cada, com agitação) com PBS a temperatura ambiente. Novamente, nos lugares correspondentes a cada poço, foi colocado 40µl de Ab IgG-FITC (1:50) (Anti-Mouse FITC Conjugate Fab specific; Sigma-Israel). As lamínulas foram retiradas das placas com uma pinça e colocadas com a face contendo as células para baixo, sobre o IgG-FITC onde permaneceram por uma hora a temperatura ambiente cobertas da luz. Passada uma hora, as lamínulas foram desviradas e colocadas de volta nas placas com a face contendo as células para cima, para serem lavadas, cobertas da luz, três vezes (cinco minutos cada, com agitação) com PBS a temperatura ambiente. Por fim, nos lugares correspondentes a cada poço, foi colocado 40µl de fluorocromo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) na concentração de 5µl/ml (Sigma-Germany) . As lamínulas foram retiradas das placas com uma pinça e colocadas com a face contendo as células para baixo, sobre o DAPI onde permaneceram por 20 minutos a temperatura ambiente cobertas da luz. Como nos procedimentos anteriores, após o período com DAPI, as lamínulas foram desviradas e colocadas de volta nas placas com a face contendo as células para

cima, para serem lavadas, cobertas da luz, quatro vezes (cinco minutos cada, com agitação) com PBS a temperatura ambiente. Para montar as lâminas, as lamínulas foram coladas (com as células para cima) com uma gota de Entellan (MERCK-Germany), e após deixar secar por aproximadamente 5 minutos, uma gota de óleo mineral Nujol (Schering-Plough; Brasil) foi pingada sobre as células para posterior adição de lamínulas de montagem, as quais foram fixadas com gotas de esmalte nas quatro pontas. Finalmente, o material foi mantido no escuro em geladeira até ser analisado.

4.4.2 – Quantificação de incorporação de BrdU

As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico com fluorescência (LEICA-DMR - Alemanha), utilizando-se uma objetiva com grid, no aumento de 200x.. Em cada uma das três lamínulas de cada grupo, foram contadas, no mínimo, 500 células. Em seguida, uma razão entre as células marcadas com BrdU e as células marcadas com DAPI foi calculada. Sendo assim, obtivemos uma porcentagem de células que estavam em fase S do ciclo celular. Uma média das três lamínulas por grupo foi calculada e os resultados foram plotados em gráficos.

4.5 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 na viabilidade celular

Tanto para ROS17/2.8 quanto para as MC3T3-E1, a determinação da viabilidade celular foi feita utilizando-se todas as células de cada poço, ou seja, as células aderidas à placa e as células em suspensão no meio de cultura com descrito a seguir. Primeiramente, o meio de cultura de cada poço (contendo células em suspensão) foi retirado e armazenado em um tubo de microcentrífuga (tubo I) a temperatura ambiente. Em seguida, as células aderidas à placa foram lavadas duas vezes com PBS estéril e incubadas em Tripsina por cinco minutos em uma incubadora de umidade controlada a 37°C e 5% CO₂. As células foram, então, suspendidas em MC e transferidas para o tubo I. Esse tubo foi centrifugado a 1000 rpm, por 5 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em MSS (ou MCSS). Adicionou-se Azul de Tripán a 0.4% (Gibco-BRL), na diluição 1:2, à suspensão de células e, após cinco minutos de incubação em temperatura ambiente, as células foram contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer (Improved Neubauer, ARIENFELD, Germany).

Foram consideradas inviáveis (mortas), as células que apresentavam os seus citoplasmas corados de azul. Para a determinação da porcentagem de células viáveis (vivas), determinou-se o número total de células (viáveis + inviáveis) e o número apenas de células viáveis. O cálculo da porcentagem de células viáveis foi feito seguindo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{número de células viáveis (não coradas)}}{\text{número total de células (viáveis + inviáveis)}} \times 100$$

A determinação de células viáveis (vivas) e inviáveis (mortas) foi feita com base no experimento do efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular dessas células. Para as ROS17/2.8, a viabilidade foi acessada nos mesmos dias de contagem do número celular, e para as MC3T3-E1, a viabilidade foi acessada somente nos dias 1, 2, 13 e 14 de tratamento hormonal.

4.6 - Avaliação do efeito de doses crescentes de T3 e GC-1 na expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico

As células ROS17/2.8 e as MC3T3-E1 foram semeadas em placas de 6 poços (TPP, Switzerland), na densidade de 12×10^4 células/poço e cultivadas por 72 horas em meio completo contendo 5% de FBS, em uma incubadora de umidade controlada, a 37°C e 5% de CO₂. O pH do meio foi mantido entre 7.2-7.6. Após as 72 horas de cultivo, as células foram lavadas duas vezes com PBS de Dulbecco (Gibco BRL) e incubadas em MSS ou MCSS por 24 horas. Em seguida, iniciou-se o tratamento hormonal por 24 horas com concentrações variadas de T3 ou GC-1 (10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} M). Cada placa foi utilizada para uma molaridade, onde 3 poços foram tratados com T3 e os outros 3 poços com GC-1. Em uma outra placa, células de 3 poços não receberam tratamento, (permaneceram em MSS ou MCSS), servindo de controle. Ao final dos tratamentos, as células foram coletadas e processadas para a extração de RNA total para posterior estudo da expressão gênica por PCR em tempo real (item 4.7.1) da Osteocalcina (OC) nas ROS17/2.8 e MC3T3-E1, e do Colágeno tipo I (Col I) e Fosfatase Alcalina (ALP) somente nas MC3T3-E1.

4.7 - Avaliação do efeito do T3 e GC-1 na diferenciação osteoblástica e na expressão gênica dos receptores de hormônio tiroideano (TRs)

Para os estudos de diferenciação, as células foram semeadas em placas de 6 poços (TPP, Switzerland), na densidade de 12×10^4 células/ poço e cultivadas por 72 horas em meio completo contendo 5% de FBS, em uma incubadora de umidade controlada, a 37°C e 5% de CO₂. O pH do meio foi mantido entre 7.2-7.6. Após as 72 horas de cultivo, as células foram lavadas duas vezes com PBS de Dulbecco (Gibco BRL) e incubadas em MSS ou MCSS por 24 horas. Em seguida, iniciou-se o tratamento hormonal com 10^{-8} M de T3 ou GC-1. As ROS17/2.8 foram tratadas por 7h, 24h, 48h e 72 h (cada placa para cada tempo, sendo 3 poços tratados com T3 e os outros 3 poços com GC-1). Em outras duas placas de 6 poços, células não receberam tratamento (permaneceram em MSS), servindo de controle (3 poços de cada placa para cada tempo). As MC3T3-E1 foram tratadas por 1, 2, 6 e 9 dias (cada placa para cada tempo, sendo 3 poços tratados com T3 e os outros 3 poços com GC-1). Novamente em outras duas placas de 6 poços, células não receberam tratamento (permaneceram em MCSS), servindo de controle (3 poços de cada placa para cada tempo). Ao final dos tratamentos, as células foram coletadas e processadas para a extração de RNA total para posterior estudo da expressão gênica por PCR em tempo real da Osteocalcina (OC), TR α 1 e TR β 1 nas ROS17/2.8 e MC3T3-E1, e do Colágeno tipo I (Col I) e Fosfatase Alcalina (ALP) somente nas MC3T3-E1.

4.7.1 - Extração do RNA total das células e PCR em tempo real (Real-Time PCR)

O RNA total foi extraído das células utilizando o reagente TRizol (Gibco, BRL), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificado por espectrofotometria. Para cada amostra, 1 μ g de RNA total foi transcrito reversamente a cDNA utilizando-se oligo(dT) e transcriptase reversa *ReverAid-H-Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas, Hanover, MD, USA).

Os valores relativos à amplificação do RNA mensageiro (mRNA) referente a cada gene estudado foram avaliados através da mensuração da fluorescência, quantificada pelo sistema de detecção de seqüências ABI Prism 5700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Após padronização da quantidade de cDNA e da concentração dos *primers*, as reações foram realizadas em um volume total de 25 μ l com 40 ng de cDNA (*template*), 450 nM de *primers* e *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). O gene da β -actina foi selecionado com controle interno para

corrigir a variabilidade nas ampliações. Os *primers* foram desenhados para cruzar os limites intron-exon utilizando-se o software Primer Express (Applied Biosystems), com uma temperatura de anelamento entre 58-60°C, com 15-30 pares de base e mantendo uma porcentagem entre 30-80% de bases G e C. Todos os *primers* foram sintetizados especificamente para o PCR em tempo real (Imprint Genetix, Miami, FL, USA), e suas seqüências estão apresentadas na Tabela 1. O cDNA foi amplificado em duplicatas nas seguintes condições: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento). A quantificação relativa da expressão gênica foi expressa como indução em vezes e determinada pelo método do $\Delta\Delta C_t$ como previamente descrito por Livak (1997).

4.7.2 - Determinação da eficiência das reações de amplificação do TR α 1 e TR β 1

O método do $\Delta\Delta C_t$ se baseia numa amostra calibradora que serve de referência para o cálculo da expressão relativa de todas as outras amostras (Livak, 1997). Esse método considera o fato da eficiência da amplificação da amostra calibradora e das demais ser a mesma. Para a comparação da expressão relativa do mRNA do TR α 1 vs. TR β 1 em uma mesma linhagem, e para comparação da expressão de cada uma dessas isoformas entre ROS17/2.8 vs. MC3T3-E1, também utilizou-se o método do $\Delta\Delta C_t$. Para essas comparações, a quantificação relativa do TR α 1 foi determinada designando-se a expressão do TR β 1 como 1 (um), ou seja, a expressão do TR β 1 foi utilizada como a amostra calibradora. Entre as linhagens, considerou-se a expressão dos TRs nas células ROS17/2.8 como as amostras calibradoras. Para esses estudos, foi necessário determinar a eficiência das ampliações, uma vez que as comparações foram feitas entre genes distintos.

Para cada gene, foram realizadas ampliações utilizando-se 10, 20, 40 e 80 ng de cDNA como *template*. Em seguida, plotou-se a quantidade de cDNA (*template* em ng), em escala logarítmica, versus C_t . (threshold cycle) As regressões lineares entre esses dois parâmetros foram então determinadas e os *slopes* (inclinação das retas) das regressões foram calculados e comparados. De acordo com Liu & Saint (2002), os *slopes* (C_t vs. *template*) são considerados como parâmetros de eficiência das reações, ou seja, *slopes* iguais indicam que a eficiência de amplificação é a mesma. Com base nesse método, a Tabela 1 mostra que não houve diferença de eficiência entre as reações, uma vez que não houve diferença entre os *slopes*.

Tabela 1: Comparação da eficiência das reações de amplificação do TR α 1 e TR β 1 por PCR em tempo-Real.

Comparações	<i>Slope</i>	R ²	Comparação dos <i>slopes</i>
MC3T3-E1 TR α 1 TR β 1	-0.06 \pm 0.01 -0.04 \pm 0.007	0.9 0.94	N.S.
ROS17/2.8 TR α 1 TR β 1	-0.06 \pm 0.02 -0.04 \pm 0.002	0.9 0.999	N.S.
TRα1 ROS17/2.8 MC3T3-E1	-0.04 \pm 0.002 -0.04 \pm 0.008	0.999 0.94	N.S.
TRβ1 ROS17/2.8 MC3T3-E1	-0.06 \pm 0.02 -0.06 \pm 0.01	0.9 0.9	N.S.

N.S. - não significativo

Os *slopes* foram utilizados como uma medida de eficiência dos PCRs em Tempo-Real, e foram determinados por regressão linear, plotando-se a quantidade de cDNA (template em ng), em escala logarítmica, versus Ct.

4.8 - Análise Estatística

A significância estatística da diferença entre os valores médios dos diferentes tratamentos foi testada por análise de variância (ANOVA) ou pelo teste-t (*Student t-test*). ANOVA foi sempre seguida pelo teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls, para detectar quais tratamentos são significativamente diferentes entre si. Para todos os testes, foi admitido o limite de 5% para rejeição da hipótese de nulidade. Os resultados foram expressos como média \pm erro

padrão da média (SEM). Para a realização dos testes estatísticos, foi utilizado o *software* InStat Instant Biostatistics; para a construção de gráficos foi utilizado o *software* Prism (ambos proveniente da GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Tabela 2: Especificação dos *primers* para PCR em tempo real utilizados nos estudos

Espécie Animal	Gene	Seqüência do <i>Primer</i>	Acesso no GenBank
<i>Rattus norvegicus</i>	Osteocalcina	<i>F:</i> TCTGACCTGGCAGGTGCAA <i>R:</i> CCGGAGTCTATTCACCACCTTACT	M25490
<i>Mus musculus</i>	Osteocalcina	<i>F:</i> CTCACAGATGCCAAGCCCA <i>R:</i> CCAAGGTAGCGCCGGAGTCT	U11542
<i>Mus musculus</i>	Colágeno I	<i>F:</i> GCGAAGGCAACAGTCGCT <i>R:</i> CTTGGTGGTTTTGTATTCGATGAC	NM_007742
<i>Mus musculus</i>	Fosfatase Alcalina	<i>F:</i> TCCTGACCAAAAACCTCAAAGG <i>R:</i> TGCTTCATGCAGAGCCTGC	NM_007431
<i>Mus musculus</i>	TR α 1	<i>F:</i> GCTGTGCTGCTAATGTCAACAGA <i>R:</i> GCCTCCTGACTCTTCTCGATCTT	NM_178060
<i>Mus musculus</i>	TR β 1	<i>F:</i> AAGCCACAGGGTACCACTATGG <i>R:</i> GGAGACTTTTCTGAATGGTTCTTCTAA	NM_009380
<i>Rattus norvegicus</i>	β -Actina	<i>F:</i> AAGATTTGGCACCACACTTCTACA <i>R:</i> CGGTGAGCAGCACAGGGT	NM_031144

F: Forward primer ; *R:* Reverse primer

Os primers do TR α 1, TR β 1 e β -Actina foram utilizados tanto para as células de rato (ROS17/2.8) como para as de camundongo (MC3T3-E1) por apresentarem 100% de homologia com os genes das duas espécies..

5 - RESULTADOS

5.1 - Estudo do ciclo do crescimento celular

Em um primeiro momento, estudamos o ciclo de crescimento das células ROS17/2.8 e MC3T3-E1, plaqueadas em diferentes densidades, para que pudéssemos definir o número ideal de células que seria plaqueado nos estudos, e também para determinar pontos-chave no ciclo de crescimento em que as células deveriam ser tratadas e coletadas.

A Fig. 4A mostra o gráfico do ciclo de crescimento das células ROS17/2.8 inoculadas a diferentes densidades. Podemos observar que as células plaqueadas a uma densidade de 10^4 células/placa apresentaram uma fase Lag de aproximadamente 3 dias. Essas células atingiram 100 % de confluência apenas no dia 8. As células inoculadas a uma densidade de 2.6×10^4 células por poço apresentaram uma fase Lag de aproximadamente 1,5 dias. Essas células atingiram 100 % de confluência no dia 5 e apresentaram um tempo de dobra, observada na fase Log, de aproximadamente 24 horas. Apesar dessas células não apresentaram uma fase de Platô clara, o tempo de dobramento aumentou para 48 horas entre os dias 4 e 6 de cultura, próximo a confluência de 100 %. A velocidade de crescimento celular tendeu a reduzir ainda mais entre o sexto e décimo dia de cultura, quando o número de células apenas triplicou. As células inoculadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço apresentaram uma fase Lag de aproximadamente 1 dia. Essas células atingiram 100 % de confluência no dia 3 e apresentaram um tempo de dobra, observado na fase Log, de aproximadamente 24 horas, entre os dias 1 e 2. Após esse período, o crescimento celular diminuiu. Do dia 2 ao 3, houve um crescimento de 1.5 vezes; do dia 4 ao 6, um crescimento de 2 vezes; e do dia 6 ao 10, um crescimento de apenas 2.7 vezes. Nota-se claramente que as células inoculadas na densidade intermediária (2.6×10^4 células) apresentaram uma curva de crescimento também intermediária às demais. Essas células apresentaram uma fase Lag menor do que aquelas inoculadas na densidade de 10^4 células, uma maior fase Log e um maior tempo para atingirem a confluência de 100 % quando comparadas às células inoculadas na densidade de 5×10^4 células. Assim sendo, a densidade inicial de 2.6×10^4 células/poço foi selecionada para os experimentos de investigação do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células ROS 17/2.8.

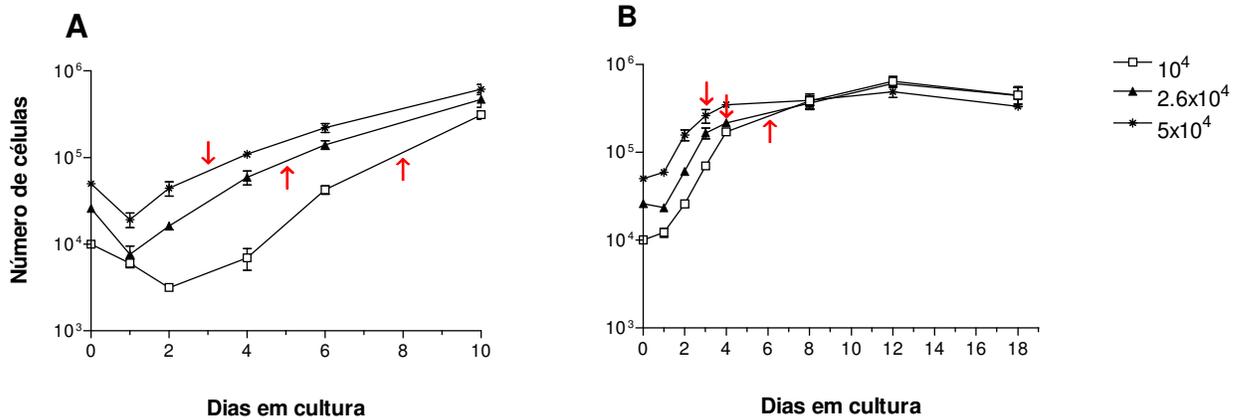


Figura 4. (A) Ciclo de crescimento das células ROS17/2.8 inoculadas em três densidades diferentes: 10^4 , 2.6×10^4 e 5×10^4 células/poço. **(B)** Ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 inoculadas em três densidades diferentes: 10^4 , 2.6×10^4 e 5×10^4 células/poço. As setas vermelhas indicam o dia em que as culturas atingiram 100% de confluência. Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços.

A Fig. 4B mostra o gráfico do ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 inoculadas a diferentes densidades. Podemos observar que as células plaqueadas a uma densidade de 10^4 células/placa apresentaram uma fase Lag com duração de 1 dia. A fase Log durou 3 dias, onde a cada 24 horas o número de células aumentou em média 2,4 vezes. Do dia 4 ao 8 o ritmo de crescimento celular diminuiu e o número de células aumentou apenas 2,2 vezes, já caracterizando uma transição da fase Log para a Platô. Essas células atingiram 100 % de confluência no sexto dia de cultura. Após o oitavo dia em cultura o ritmo de proliferação diminuiu ainda mais, apresentando até uma pequena redução do número de células após o dia 12, o que é bem característico da fase Platô. As células inoculadas a uma densidade de 2.6×10^4 células por poço apresentaram uma fase Lag bem característica com duração de 1 dia. A fase Log durou 2 dias onde a cada 24 horas o número de células aumentou em média 2,7 vezes. Do terceiro para o quarto dia (quando as células atingiram 100% de confluência) o ritmo de proliferação diminuiu para 1,3 vezes, já caracterizando uma transição da fase Log para a Platô. Do quarto para o oitavo dia, houve um aumento do número de células de apenas 1,6 vezes. Após o oitavo dia em cultura, o ritmo de proliferação manteve-se em 1,6 vezes até o dia 12 e depois diminuiu, apresentando

uma pequena redução do número de células. As células inoculadas a uma densidade de 5×10^4 células por poço apresentaram uma fase Lag de aproximadamente 1 dia. Essas células atingiram 100 % de confluência no dia 3 e apresentaram uma fase Log de apenas 24 horas, entre os dias 1 e 2 onde o número de células aumentou 2,6 vezes. Após esse período, o crescimento celular diminuiu para 1,6 vezes no terceiro dia e para 1,3 no quarto dia. Do dia 4 ao 8, houve um discreto crescimento de apenas 1.1 vezes que manteve-se até o dia 12. Após esse dia, assim como nas outras densidades, também houve uma diminuição do número de células. Nota-se claramente que as células MC3T3-E1 proliferam muito rapidamente e isso fez com que a densidade inicial de 10^4 células/poço fosse selecionada para os experimentos de investigação do efeito T3 e GC-1 no crescimento celular. Entretanto, em estudos posteriores, notamos que nessa densidade, muitas células, principalmente as controles, desprendiam-se do fundo dos poços ao longo dos dias em cultura. Assim sendo, reduzimos essa densidade inicial pela metade ($0,5 \times 10^4$ células/poço).

5.2 - Efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular das células ROS 17/2.8

A Fig. 5 mostra o gráfico da curva de crescimento das células ROS17/2.8 submetidas ao tratamento com T3 e GC-1. Neste gráfico, não se pode observar a fase Lag porque não houve contagem de células entre os dias 0 e 3. Do dia da inoculação (dia zero), até o dia do carenciamento, ou seja, transferência das células para MSS (dia 3), o número de células duplicou ($5,3 \times 10^4$ células/poço). Após 24 horas em MSS, as células apresentaram uma redução do ritmo de crescimento, totalizando $5,56 \times 10^4$ células/poço. Como era de se esperar, do primeiro ao sexto dia de tratamento hormonal, houve aumento exponencial do número de células nas três placas. Entretanto, nesse período, não houve diferença significativa do número de células entre as três placas. Após 8 dias de tratamento, as células controle continuaram a apresentar aumento do seu número, enquanto as células tratadas com T3 pararam de apresentar crescimento e as células tratadas com GC-1 continuaram a apresentar crescimento, porém em um menor ritmo do que as células controle. Neste ponto da curva, não houve diferença significativa do número de células entre as placas T3 e GC-1, por outro lado, ambas apresentaram menor número de células do que as placas controles ($p < 0,05$). No décimo dia de tratamento, todas as três placas apresentaram o número máximo de células/poço. Nesta etapa, as placas T3 e GC-1 apresentaram praticamente o mesmo número de células (30×10^4 células/poço) e continuaram a diferir significativamente da

placa controle ($p < 0,05$). No último dia de estudo, décimo segundo dia de tratamento, as três placas apresentaram queda do número de células sem apresentar diferenças significativas entre si, porém, houve uma tendência das placas controles (40×10^4 células/poço) conterem mais células que as tratadas com T3 e GC-1 (aproximadamente 25×10^4 células/poço).

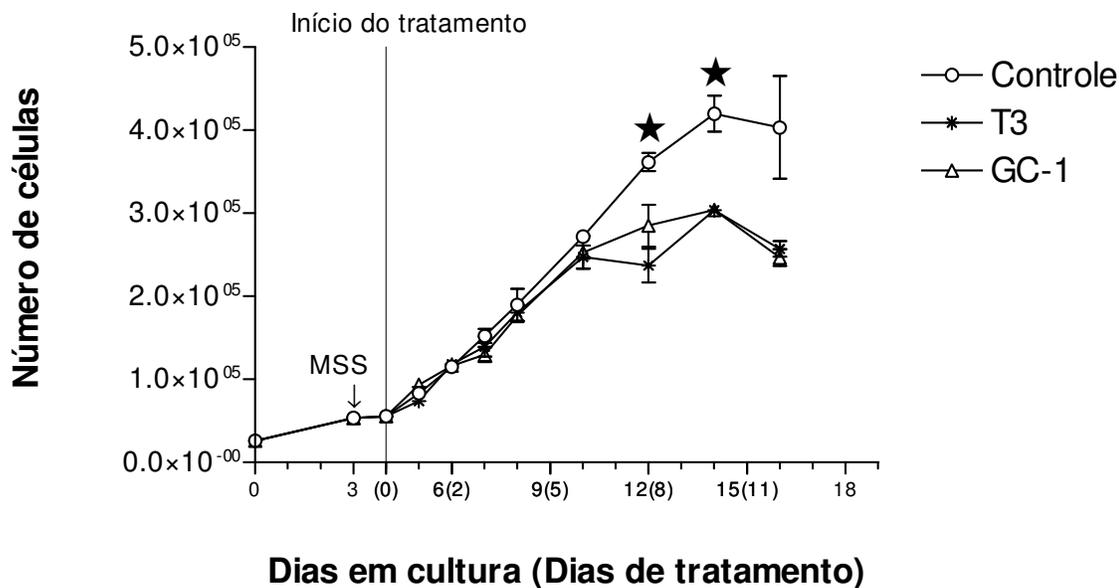


Figura 5. Ciclo de crescimento das células ROS17/2.8. As células foram inoculadas a uma densidade de 2.6×10^4 células/poço e mantidas em meio completo até o terceiro dia do estudo. No dia 3, foram transferidas para meio sem soro (MSS) e, no dia 4 (linha pontilhada), foi iniciado o tratamento com 10^{-8} M de T3 ou GC-1 em MSS. Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. ★ indica que houve diferença significativa entre as células controle vs. T3 e GC-1 ($p < 0.05$ para ambos) pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.3 - Efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular das células MC3T3-E1

5.3.1 - Estudo do ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 utilizando meio suplementado com FBS tratado com carvão ativado (MCSS)

A Fig. 6 mostra o gráfico das curvas de crescimento das células MC3T3-E1 cultivadas em meio contendo diferentes porcentagens de CSS. A curva com MC contendo 10% de FBS serviu como

controle, uma vez que o objetivo deste estudo foi determinar a menor porcentagem de FBS tratado com carvão ativado (“charcoal stripped serum”) que permitisse que as células apresentassem um ritmo de crescimento similar àquele das células mantidas em MC. As células cultivadas em MCSS a 1,25% e 2.5% apresentaram uma proliferação muito baixa. Já as células cultivadas em MCSS a 5% e 10 % apresentaram ritmos de crescimento bastante similares. Assim sendo, optamos por utilizar MCSS a 5%.

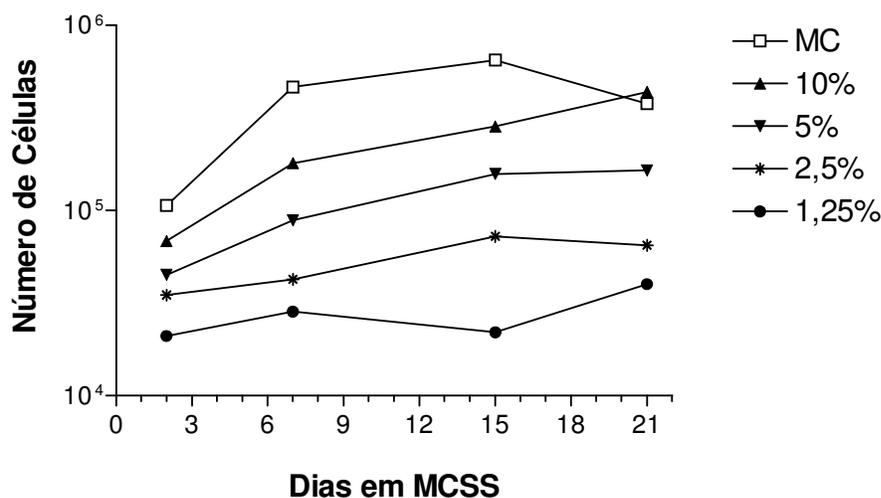


Figura 6. Curvas do ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 cultivadas em meio contendo diferentes porcentagens (10%, 5%, 2,5% e 1,25%) de FBS tratado com carvão ativado (MCSS) e em meio completo (MC), contendo 10% de FBS. 10^4 células/poço foram plaqueadas e cultivadas em MC por 48 horas. Em seguida, iniciou-se o cultivo com as diferentes porcentagens de MCSS. Cada ponto corresponde a quantidade de células de um poço.

5.3.2 - Efeito do efeito do T3 e GC-1 no crescimento das células MC3T3-E1, utilizando meio suplementado com FBS tratado com carvão ativado (MCSS)

A Fig. 7 mostra o gráfico da curva de crescimento das células MC3T3-E1 submetidas ao tratamento com T3 e GC-1. Neste gráfico, não se pode observar a fase Lag porque não houve contagem de células entre os dias 0 e 4. Do dia da inoculação (dia zero), até o dia da transferência das células para MCSS (dia 4), o número de células aumentou 22 vezes (11×10^4 células/poço).

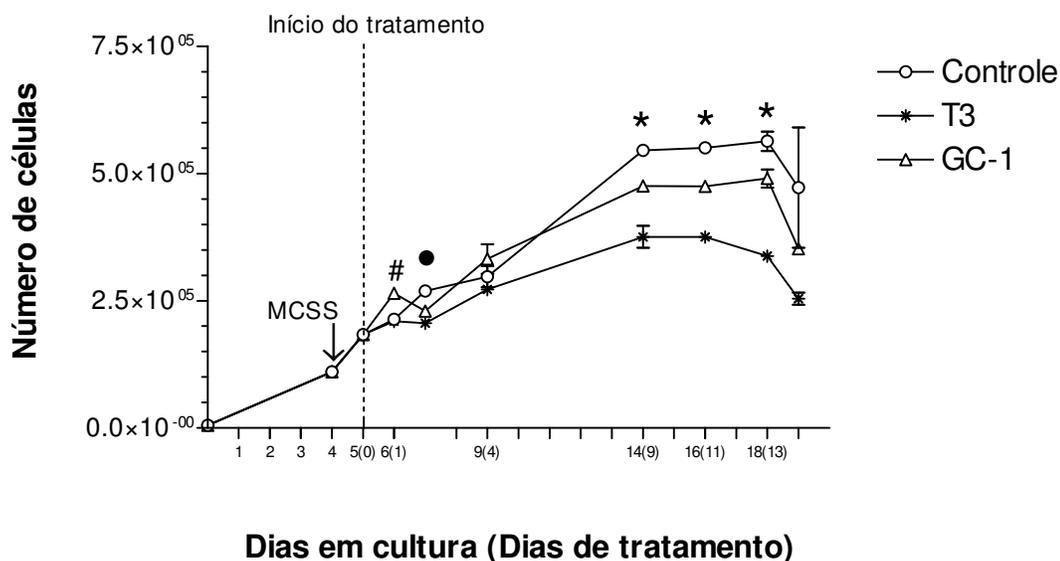


Figura 7. Ciclo de crescimento das células MC3T3-E1. As células foram inoculadas a uma densidade de $0,5 \times 10^4$ células/poço e mantidas em MC FBS10% até o quarto dia do estudo. No dia 4, foram transferidas para MCSS e, no dia 5 (linha pontilhada), foi iniciado o tratamento com 10^{-8} M de T3 ou GC-1 em MCSS. Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. # indica que houve diferença significativa entre as células GC-1 vs. controle e T3 ($p < 0,01$; $p < 0,05$ respectivamente). ● indica que houve diferença significativa entre as células controle vs. T3 e GC-1 ($p < 0,05$ para ambos). * indica que todas as células foram diferentes entre si (dias 9, 11 e 13 respectivamente: controle vs. GC-1 $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,05$. controle vs. T3 $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,001$. T3 vs. GC-1 $p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,01$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

Após 24 horas em MCSS, as células proliferaram 1,66 vezes, totalizando $18,3 \times 10^4$ células/poço. Após 24 horas de tratamento hormonal, o número de células controle e T3 não diferiu, porém o número de células GC-1 foi significativamente maior ($p < 0,01$ vs controle e $p < 0,05$ vs T3). No segundo dia de tratamento, as células tratadas com T3 e GC-1 apresentaram um menor número do que as células controle ($p < 0,05$ vs controle para ambos os tratamentos). Nos dias 9, 11 e 13 de tratamento, o número das células tratadas com T3 foi significativamente menor que do que o das células controle ($p < 0,01$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$; respectivamente) e tratadas com GC-1 ($p < 0,05$; $p < 0,001$ e $p < 0,01$; respectivamente). As células GC-1 nesses dias apresentaram um número de

células intermediário, sendo significativamente menor que ao das células controle ($p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$; respectivamente) e significativamente maior que ao das tratadas com T3. No último dia de tratamento, todos os grupos apresentaram queda do número de células sem apresentar diferenças significativas entre si, porém a tendência de o T3 ser o grupo com menor número de células, o controle com o maior e o GC-1 intermediário foi mantida.

5.4 - Efeito do T3 e GC-1 na proliferação celular por incorporação de BrdU

A Fig. 8A mostra o gráfico da porcentagem das células ROS17/2.8 que apresentaram incorporação de BrdU, ou seja, estavam em fase S do ciclo celular, após 1 dia de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M. Nota-se claramente que não houve diferença significativa na porcentagem de incorporação de BrdU entre os grupos, (34.8%, 39.9% e 33.6%; controle, T3 e GC-1, respectivamente). Esse resultado está de acordo com o efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular (Fig. 5), onde, após um dia de tratamento, não houve praticamente nenhuma diferença entre o número de células dos três grupos.

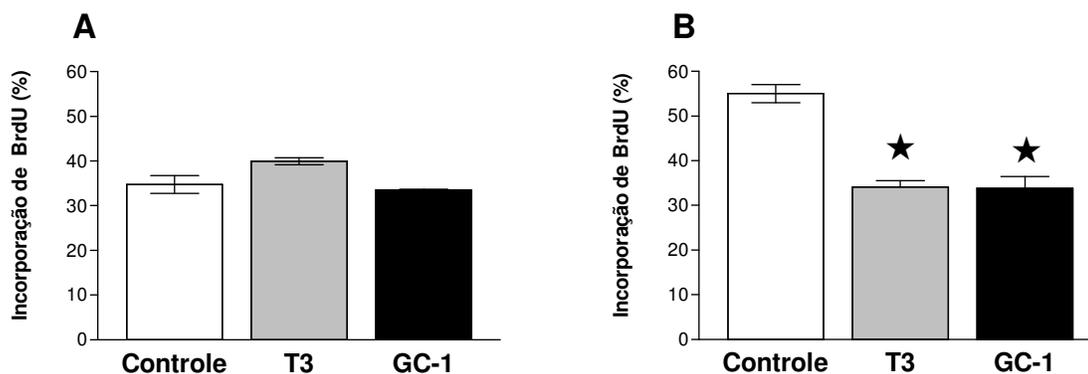


Figura 8. (A) Incorporação de BrdU (expressa em porcentagem) após 1 dia de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M em células ROS17/2.8. **(B)** Incorporação de BrdU (expressa em porcentagem) após 6 dias de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M em células ROS17/2.8. Cada barra representa a média \pm SEM de três lamínulas. ★ indica diferença significativa entre controle vs. GC-1 ($p < 0,01$) e controle vs. T3 ($p < 0,01$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

A Figura 8B mostra o gráfico da porcentagem de células ROS17/2.8 que apresentaram incorporação de BrdU após 6 dias de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M. Esse período de tratamento resultou numa significativa redução na porcentagem de incorporação de BrdU nos grupos T3 e GC-1 em relação ao controle. Após seis dias de tratamento, 55% das células controle apresentaram incorporação de BrdU. Em contrapartida, apenas 34.2 % das células do grupo T3 ($p < 0,01$ vs. controle) e 33.8 % das células do grupo GC-1 ($p < 0,01$ vs. controle) apresentaram incorporação de BrdU. Esses achados evidenciam um efeito negativo do T3 e GC-1 na proliferação celular e estão de acordo com o menor número de células observado a partir do sexto dia de tratamento entre o grupo controle e os grupos tratados (Fig. 5).

A Figura 9A mostra o gráfico da porcentagem de células MC3T3-E1 que apresentaram incorporação de BrdU, ou seja, estavam em fase S do ciclo celular, após 1 dia de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M. Nota-se claramente que não houve diferença significativa na porcentagem de incorporação de BrdU entre os grupos, sendo que no grupo controle 25.5 % das células controle estavam na fase S, no grupo T3, 23.3 % e, no grupo GC-1, 18.8 %.

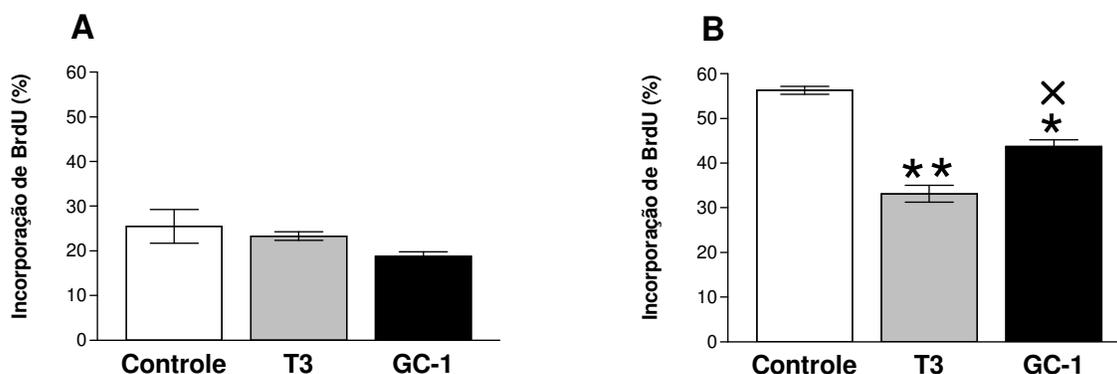


Figura 9. (A) Incorporação de BrdU (expressa em porcentagem) após 1 dia de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M em células MC3T3-E1. **(B)** Incorporação de BrdU (expressa em porcentagem) após 6 dias de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M em células MC3T3-E1. * $p < 0,01$ vs controle; ** $p < 0,001$ vs controle; X $p < 0,01$ vs T3, pelo teste Student-Newman-Keuls.

A Figura 9B mostra o gráfico da porcentagem de células MC3T3-E1 que apresentaram incorporação de BrdU após 6 dias de tratamento com T3 ou GC-1 a 10^{-8} M. O grupo T3 apresentou menor incorporação de BrdU do que o grupo controle (33.1% vs 56.3%, $p<0.001$). As células tratadas com GC-1 apresentaram uma incorporação de BrdU significativamente menor do que as células controle (43.7% vs 56.3%, $p<0.01$) e significativamente maior do que as células tratadas com T3 (43.7% vs 33.1%, $p<0.01$). Esse resultado está de acordo com o resultado do efeito do T3 e GC-1 no ciclo de crescimento das células MC3T3-E1 (Fig. 7), onde o tratamento com T3 resultou em um menor número de células em relação aos demais grupos e o tratamento com GC-1 resultou em um número de células intermediário ao das células controle e T3.

5.5 - Efeito do T3 e GC-1 na viabilidade celular

A Fig. 10 mostra o gráfico da viabilidade das células ROS17/2.8 avaliada com base nos dias de contagem do número de células do experimento do efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular (item 4.2). Nos dias 3 e 4 de experimento, como as três placas estavam sob as mesmas condições, a viabilidade das células foi a mesma. No dia 3, quando as células estavam em MC, a viabilidade foi de aproximadamente 95% e, no dia 4, quando as células ficaram 24 horas em MSS, a viabilidade foi de aproximadamente 91%. No segundo dia de tratamento (sexto dia em cultura), a placa controle manteve sua viabilidade em torno de 91 % e as placas T3 e GC-1 apresentaram viabilidade de 96 % e 94 %, entretanto, não houve diferença estatística entre as placas. Este mesmo padrão foi observado até o sexto dia de tratamento (décimo dia em cultura). No oitavo dia de tratamento (décimo segundo dia em cultura), as células controle e T3 apresentaram praticamente a mesma viabilidade (aproximadamente 96 %), enquanto que as células GC-1 apresentaram uma viabilidade de aproximadamente 98 % e significativamente maior que as demais células (GC-1 vs. controle, $p<0,05$ e GC-1 vs. T3, $p<0,01$). No décimo dia de tratamento (décimo quarto dia em cultura), todas as placas apresentaram queda na sua viabilidade. As células controle, T3 e GC-1 apresentaram a viabilidade em torno de 94,3 %. No último dia de tratamento, houve uma diminuição ainda maior da viabilidade de todas as células, com exceção das células tratadas com GC-1. A viabilidade das células controle e T3 foi de 92,5% e 90%, respectivamente, e das células GC-1 foi de 94,25%. Neste último, as células tratadas com T3 foram significativamente menos viáveis que as demais ($p<0,05$). Ao analisarmos individualmente

cada um dos grupos durante os três últimos dias de tratamento (8, 10 e 12), notamos que a viabilidade das células tratadas com T3 diminuiu significativamente dia após dia (dia 8 vs. dia 10, $p < 0,01$; dia 10 vs. dia 12, $p < 0,01$ e dia 8 vs. dia 12, $p < 0,001$). O grupo controle, apesar de sua viabilidade também ter decaído dia após dia, apresentou diferença significativa somente entre o dia 8 e o dia 12 ($p < 0,05$). Finalmente, o grupo GC-1 apresentou uma queda significativa na viabilidade entre o dia 8 e o dia 10 ($p < 0,01$) e entre o dia 8 e o dia 12 ($p < 0,01$), sendo que a viabilidade entre os dias 10 e 12 para este grupo manteve-se constante.

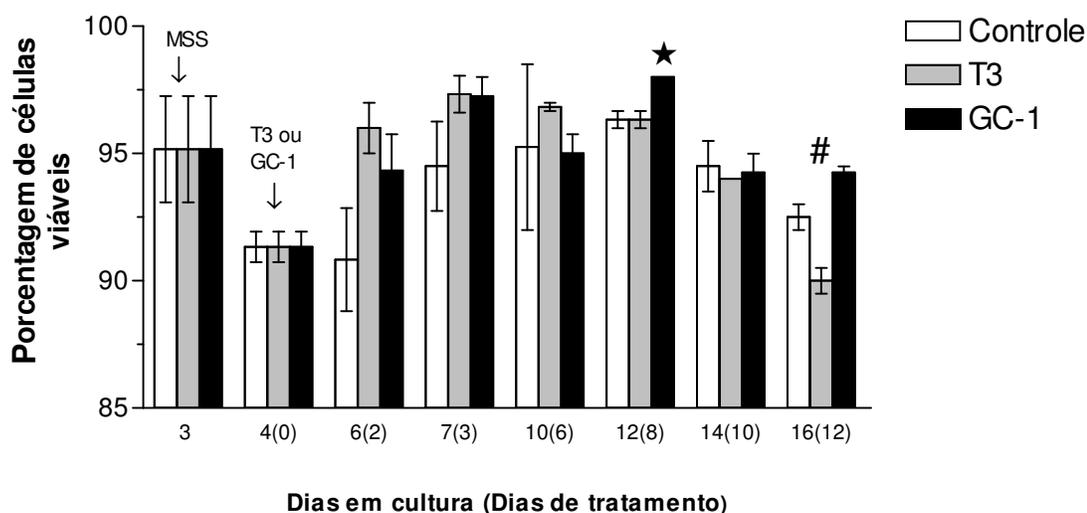


Figura 10. Viabilidade das células ROS17/2.8 (expressa em porcentagem). Nos dias 3 e 4 a viabilidade entre os grupos foi a mesma pois as células estavam sob as mesmas condições em cultura. Cada barra representa a média \pm SEM de três poços. ★ indica que houve diferença significativa entre GC-1 vs. controle, $p < 0,05$ e GC-1 vs. T3, $p < 0,01$. # Indica que houve diferença significativa entre controle e GC-1 vs. T3, $p < 0,05$ pelo teste Student-Newman-Keuls.

A Fig. 11 mostra o gráfico da viabilidade das células MC3T3-E1 nos dias 1, 2, 13 e 14 de tratamento. Não houve diferença de viabilidade celular entre os grupos em nenhum dos dias analisados, tão pouco dentro de cada grupo. As células controle mantiveram uma viabilidade de

97% do início ao fim do tratamento, as células T3 oscilaram de 97% (dia 2) a 94,5% (dia 14) mas sem diferença significativa, e as células GC-1 oscilaram de 97,75% (dia 2) a 91% (dia 13) também sem diferença significativa. Esse resultado mostra que o tratamento hormonal não interferiu na viabilidade dessas células.

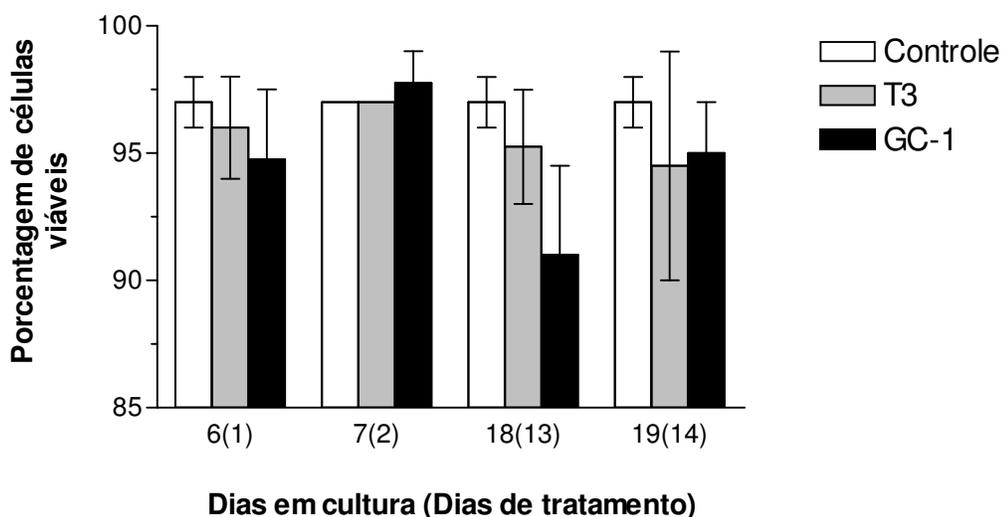


Figura 11. Viabilidade das células MC3T3-E1 (expressa em porcentagem). Cada barra representa a média \pm SEM de três poços. Não houve diferenças significativas entre os grupos, pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.6 - Efeito do T3 e GC-1 em diferentes doses na expressão de genes marcadores do fenótipo osteoblástico

5.6.1 - Osteocalcina

Nas células ROS17/2.8, a análise da expressão gênica da OC por PCR em tempo-real mostrou que o tratamento por 24h tanto de T3 quanto de GC-1 induziram o mRNA da OC de maneira dependente da dose (Fig. 12). A dose de T3 de 10^{-10} M não induziu significativamente o mRNA da OC, mas sim as doses de 10^{-8} e 10^{-6} M. Corroborando estudos anteriores (Gouveia et al, 2000), a indução estabilizou-se com a dose de T3 de 10^{-8} M (3,25 vezes vs. controle); a dose de 10^{-6} M de T3 induziu o mRNA da OC de maneira semelhante à dose de 10^{-8} M, ambas

significativamente superiores a dose de 10^{-10} M ($p < 0,01$). Todas as doses de GC-1 utilizadas induziram a expressão do mRNA da OC de maneira significativa (Fig.12). A dose de 10^{-10} foi a que menos induziu o mRNA da OC (1,74 vezes vs. controle), no entanto as doses de 10^{-8} e 10^{-6} M induziram a expressão da OC de maneira semelhante (3,33 e 3,82 vezes vs. controle, respectivamente; $p < 0,001$ vs. 10^{-10} M).

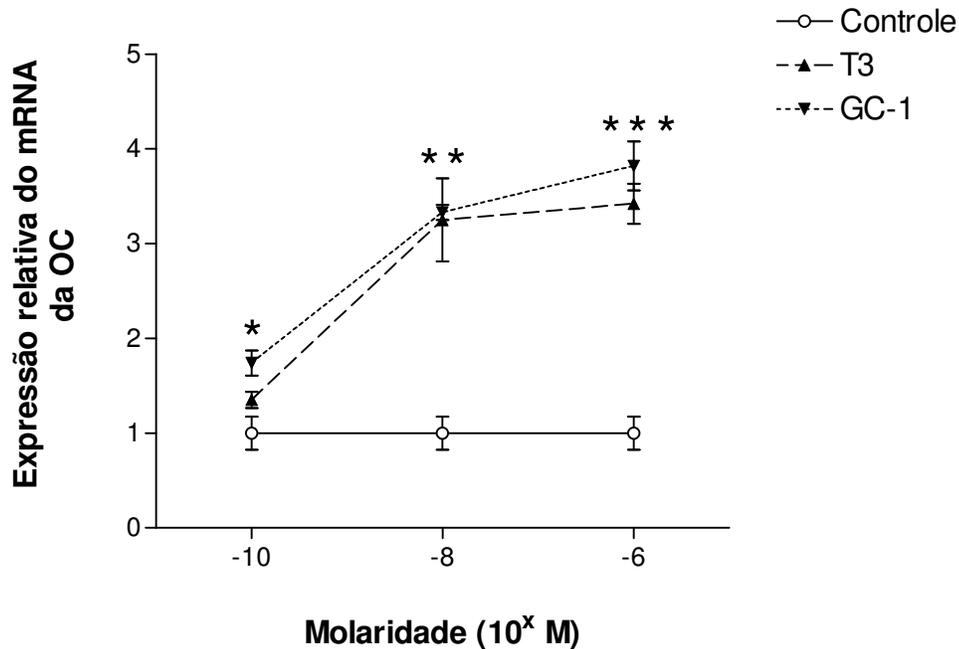


Figura 12. Estudo dose-resposta da indução do mRNA da OC em células ROS17/2.8 tratadas com T3 e GC-1. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas com T3 ou GC-1 (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) por 24 horas. A expressão relativa do mRNA foi analisado por PCR em tempo real e os valores foram corrigidos pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA da OC nas células tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. * GC-1 vs controle ($p < 0,05$); ** T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,01$); *** T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,001$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

A análise da expressão gênica da OC por PCR em tempo-real mostrou que o T3 induz a expressão desse gene de maneira dependente da dose também nas células MC3T3-E1. Todas as

doses de T3 utilizadas aumentaram significativamente a expressão da OC em relação ao controle (Fig.13), entretanto, a dose que promoveu a maior indução do mRNA da OC (106.83 vezes vs. controle) foi 10^{-6} M. As doses de T3 de 10^{-8} e 10^{-10} M promoveram induções de 27 e 1.74 vezes vs. controle, respectivamente. A dose de 10^{-6} M promoveu uma indução significativamente superior que a dose de 10^{-8} M ($p < 0,001$) e que a de 10^{-10} M ($p < 0,001$); além disso, a indução promovida pela dose de 10^{-8} M também foi significativamente superior que a de 10^{-10} M ($p < 0,05$).

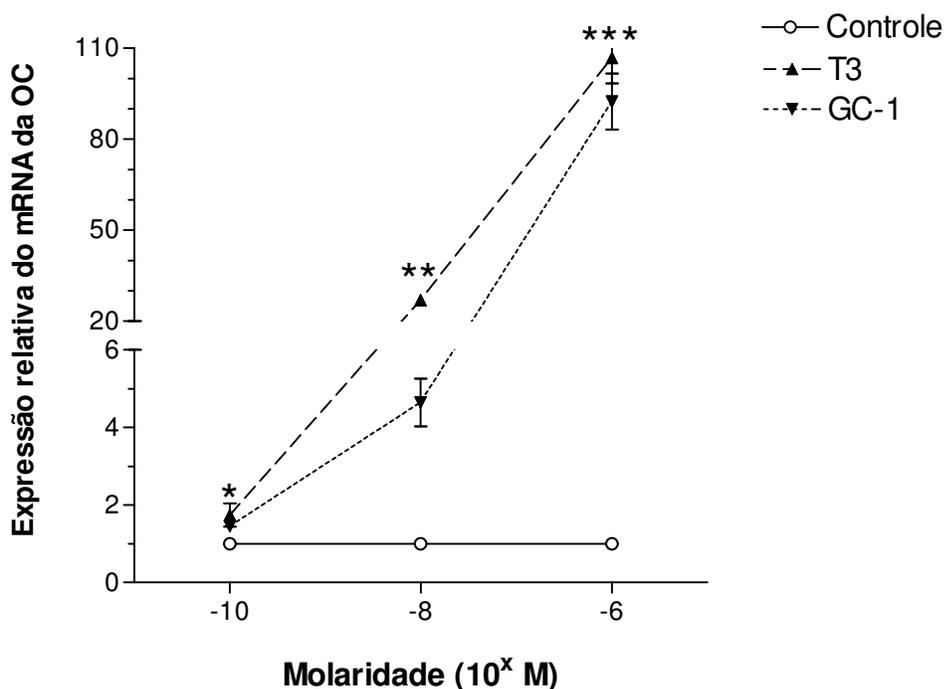


Figura 13. Estudo dose-resposta da indução do mRNA da OC em células MC3T3-E1 tratadas com T3 e GC-1. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas com T3 ou GC-1 (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) por 24 horas. A expressão relativa do mRNA foi analisado por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA da OC nas células tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. * GC-1 vs controle ($p < 0,05$) e T3 vs controle ($p < 0,01$); ** GC-1 vs controle ($p < 0,01$); T3 vs controle ($p < 0,001$) e T3 vs GC-1 ($p < 0,001$); *** T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,001$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

O GC-1, assim como o T3, aumentou a expressão do mRNA da OC de maneira dependente da dose (Fig.13). Tanto a dose de 10^{-6} M (92.43 vezes vs. controle) quanto a de 10^{-10} M (1,45 vezes vs. controle) promoveram um padrão de indução muito semelhante ao T3, no entanto a dose de 10^{-8} M (4.64 vezes vs. controle) induziu significativamente menos que o T3 ($p<0,001$). A dose de 10^{-6} M promoveu uma indução significativamente superior que a dose de 10^{-8} M ($p<0,001$) e que a de 10^{-10} M ($p<0,001$); porém a indução promovida pela dose de 10^{-8} M, apesar de significativa versus controle, não foi significativamente diferente que a de 10^{-10} M.

5.6.2 - Fosfatase Alcalina

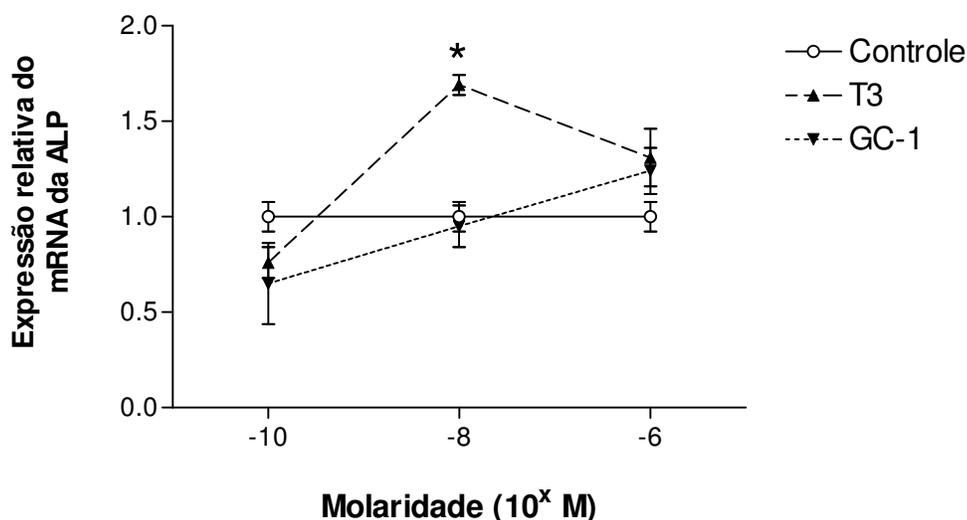


Figura 14. Estudo dose-resposta da indução do mRNA da ALP em células MC3T3-E1 tratadas com T3 e GC-1. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas com T3 ou GC-1 (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) por 24 horas. A expressão relativa do mRNA foi analisado por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA da ALP nas células tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. * T3 vs controle ($p<0,001$) e T3 vs GC-1 ($p<0,01$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

Nas MC3T3-E1 a análise por PCR em tempo-real mostrou que a única dose de T3 que induziu significativamente o mRNA da ALP foi a de 10^{-8} M (1.7 vezes vs. controle) (Fig.14). É importante notarmos que, ainda nesta dose, a indução do T3 também foi significativamente maior que a do GC-1 (1.8 vezes), o qual em nenhuma dose afetou a expressão do mRNA da ALP de maneira significativa.

A dose de 10^{-8} M de T3 foi a que promoveu maior indução do mRNA da ALP ($p < 0,01$ vs. 10^{-10} M; $p < 0,05$ vs. 10^{-6} M). Apesar de não terem estimulado a expressão em relação ao controle, as doses de 10^{-10} e 10^{-6} M diferiram entre si ($p < 0,01$). No entanto, além de não terem estimulado a expressão em relação ao controle, nenhuma dose de GC-1 diferiu entre si, reforçando a ausência de efeito deste tratamento na expressão gênica da ALP em 24 horas.

5.6.3 - Colágeno tipo I

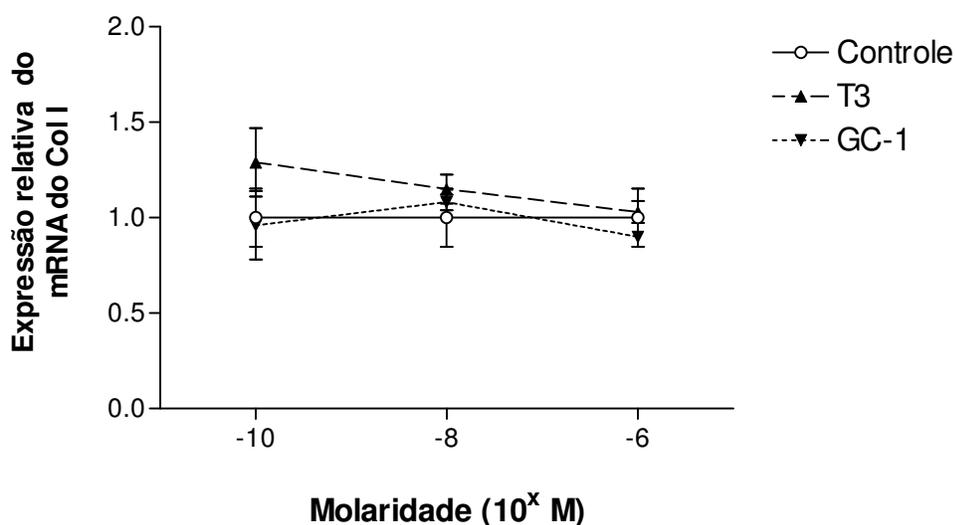


Figura 15. Estudo dose-resposta da indução do mRNA do Col I em células MC3T3-E1 tratadas com T3 e GC-1. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas com T3 ou GC-1 (10^{-10} , 10^{-8} e 10^{-6} M) por 24 horas. A expressão relativa do mRNA foi analisado por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do Col I nas células tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços.

A análise por PCR em tempo-real mostrou que nenhuma dose de T3 nem de GC-1 afetaram de forma significativa a expressão do mRNA do Col I nas células MC3T3-E1 (Fig.15).

5.7 - Efeito do T3 e GC-1 na diferenciação osteoblástica

5.7.1 - Osteocalcina

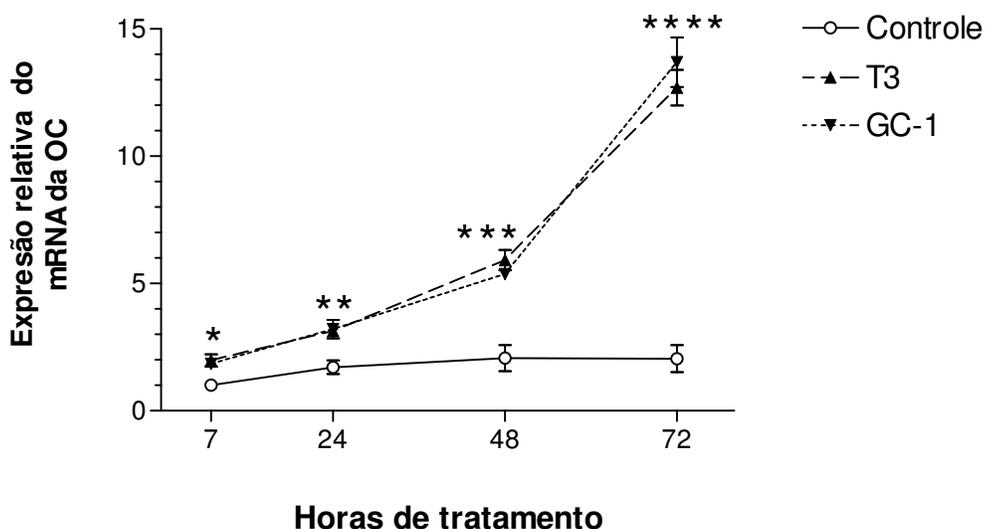


Figura 16. Expressão do mRNA da OC em células ROS17/2.8 tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 7, 24, 48 e 72 horas. A expressão relativa do mRNA foi analisada por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA da OC nas células controle (24, 48 e 72 horas) e tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle de 7 horas como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. * T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,05$); ** T3 vs controle ($p < 0,01$), e GC-1 vs controle ($p < 0,05$); *** T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,01$); **** T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,001$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

Nas células ROS17/2.8, a análise da expressão gênica da OC por PCR em tempo-real mostrou que o tratamento com 10^{-8} M de T3 e GC-1 igualmente induziram o mRNA da OC em todos os pontos analisados e de maneira dependente do tempo de tratamento (Fig. 16). Tanto o T3 quanto o GC-1 promoveram a maior indução da OC após 72 horas de tratamento (T3 - 6.2 vezes vs. controle; e GC-1 - 6.7 vezes vs. controle). As induções de 48 horas foram menores do que aquelas de 72 horas (aproximadamente 2.3 vezes menor, $p < 0,001$) e maiores do que as de 24 horas (aproximadamente 1.8 vezes maior; T3 $p < 0,01$ e GC-1 $p < 0,05$). É digno de nota que, com apenas 7 horas de tratamento, já observamos induções significativas do T3 e do GC-1 em relação ao controle (2 e 1.85 vezes, respectivamente). Entretanto, as induções observadas em 7 e 24 horas não diferiram de forma significativa entre si.

Nas células MC3T3-E1, a análise da expressão gênica da OC por PCR em tempo-real mostrou que o T3 induz fortemente a expressão desse gene de maneira dependente do tempo. Em todos os dias analisados, o T3 aumentou significativamente a expressão da OC em relação ao controle (Fig. 17), tendo a maior indução com 9 dias de tratamento (67.3 vezes vs. controle). É interessante notarmos que, com apenas 1 dia de tratamento, o T3 induziu 30 vezes o mRNA da OC, enquanto que com o mesmo tempo, nas células ROS17/2.8, essa indução foi de 1.83 vezes versus controle (aproximadamente 16 vezes menos). A indução promovida no dia 9 foi significativamente maior que nos demais ($p < 0,001$ vs. dias 1 e 2; $p < 0,05$ vs. dia 6); a indução do dia 6 foi significativamente maior ($p < 0,001$) que dos dias 1 e 2, e por fim a indução do segundo dia foi significativamente maior que a do primeiro ($p < 0,05$).

O GC-1 também induziu o mRNA da OC de forma tempo-dependente porém de uma maneira mais modesta que o T3 (Fig. 17). Com 9 dias de tratamento o GC-1 promoveu sua maior indução no mRNA da OC, 24 vezes versus o controle, cerca de 2.8 vezes menos que o T3 no mesmo tempo. Com 1 dia de tratamento, o GC-1 induziu 4.6 vezes o mRNA da OC, enquanto a indução promovida nas ROS17/2.8 foi de 1.9 vezes versus controle, ressaltando a diferença do efeito dos tratamentos nas duas linhagens. A indução promovida pelo GC-1 no dia 9 foi significativamente maior que nos demais ($p < 0,001$); a indução do sexto dia foi significativamente maior que dos dias 1 ($p < 0,01$) e 2 ($p < 0,05$), e por fim a indução do segundo dia foi significativamente maior que a do primeiro dia ($p < 0,01$).

Como esperado as células controle também tiveram a expressão da OC aumentada a partir do segundo dia, atingindo o máximo de 6.7 vezes no nono dia (Fig. 17). A expressão da OC nas células controle observada no dia 9 foi significativamente maior que nos demais dias ($p<0,001$), e a expressão do dia 6 foi significativamente maior ($p<0,01$) que nos dias 1 e 2, os quais não diferiram entre si.

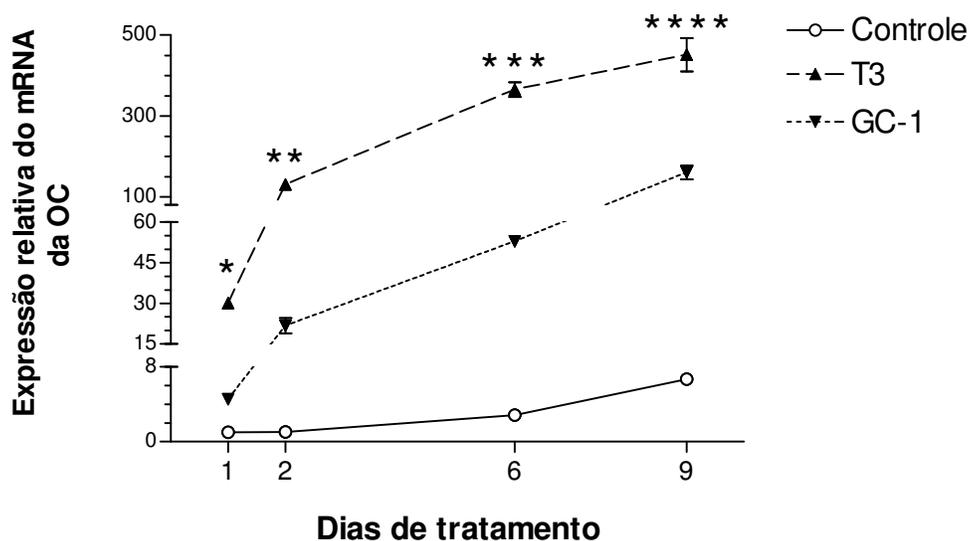


Figura 17. Expressão do mRNA da OC em células MC3T3-E1 tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 1, 2, 6 e 9 dias. A expressão relativa do mRNA foi analisada por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA da OC nas células controle (2, 6 e 9 dias) e tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle de 1 dia como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. * T3 vs controle ($p<0,001$); GC-1 vs controle ($p<0,05$), e T3 vs GC-1 ($p<0,001$); ** T3 vs controle ($p<0,001$); GC-1 vs controle ($p<0,05$), e T3 vs GC-1 ($p<0,001$); *** T3 vs controle ($p<0,001$); GC-1 vs controle ($p<0,05$), e T3 vs GC-1 ($p<0,001$); **** T3 vs controle ($p<0,001$); GC-1 vs controle ($p<0,01$), e T3 vs GC-1 ($p<0,001$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.7.2 - Fosfatase Alcalina

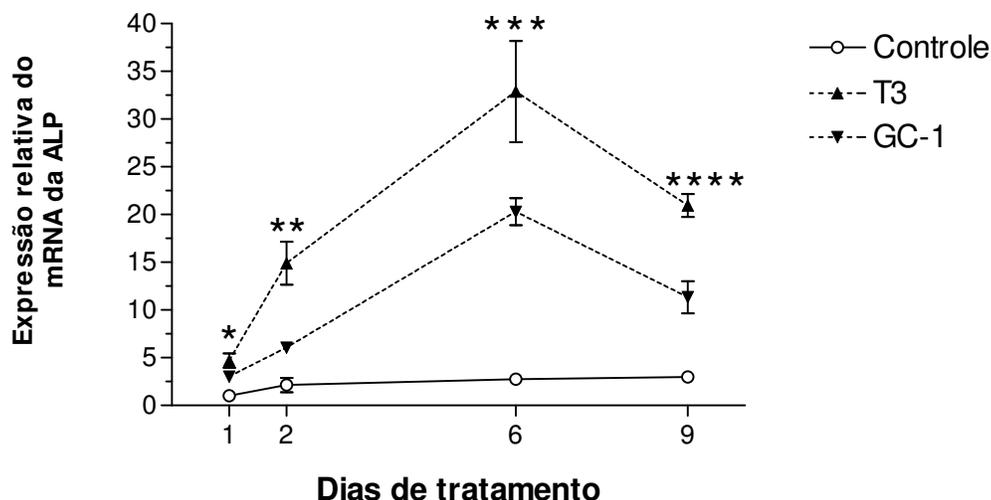


Figura 18. Expressão do mRNA da ALP em células MC3T3-E1 tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 1, 2, 6 e 9 dias. A expressão relativa do mRNA foi analisada por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA da ALP nas células controle (2, 6 e 9 dias) e tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle de 1 dia como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. * T3 vs controle ($p < 0,05$); ** T3 vs controle ($p < 0,01$); T3 vs GC-1 ($p < 0,05$); *** T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,01$); T3 vs GC-1 ($p < 0,05$); **** T3 vs controle ($p < 0,01$); GC-1 vs controle ($p < 0,05$), e T3 vs GC-1 ($p < 0,01$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

A análise por PCR em tempo-real mostrou que o T3 também induz a expressão do mRNA da ALP de maneira dependente do tempo nas células MC3T3-E1 (Fig. 18), induzindo significativamente o mRNA em todos os dias analisados. No primeiro dia, a indução versus o controle foi de 4.7 vezes; no segundo, foi de 7 vezes; no sexto, ocorreu a máxima indução (12 vezes vs. controle) e, no nono dia, foi novamente de 7 vezes. A indução do sexto dia foi significativamente maior que dos demais ($p < 0,001$ vs. 1 dia, $p < 0,01$ vs. 2 dias, $p < 0,05$ vs. 9 dias). As induções dos dias 2 e 9 não foram diferentes significativamente entre si, porém ambas diferiram da indução do dia 1 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente).

O GC-1 também induziu o mRNA da ALP de forma tempo-dependente porém de uma maneira mais modesta que o T3 (Fig.18). Nos dias 1 e 2, a indução não foi significativamente diferente do controle, porém, no sexto dia de tratamento, assim como o T3, o GC-1 promoveu sua maior indução no mRNA da ALP versus controle (7.4 vezes). No nono dia, a indução foi de 3.8 vezes versus o controle, e significativamente maior que as induções promovidas pelo GC-1 nos dias 1 e 2 ($p<0,05$), as quais não diferiram entre si.

Apesar da tendência, a expressão da ALP nas células controle não aumentou significativamente em função do tempo de cultura (Fig. 18).

5.7.3 - Colágeno tipo I

A análise da expressão gênica do Col I por PCR em tempo-real mostrou novamente que nenhuma dose de T3 nem de GC-1 afetaram de forma significativa a expressão do mRNA ao longo do tempo (Fig. 19). Entretanto, como era esperado, a expressão do Col I, dentro dos diferentes grupos (controle, T3 e GC-1), foi aumentando de forma tempo-dependente. No grupo controle, a expressão do Col I nos dias 2, 6 e 9 não foram significativamente diferentes entre si, porém as três diferiram da expressão do dia 1 ($p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,05$, respectivamente). O grupo T3 apresentou um padrão de expressão muito semelhante ao grupo controle, onde também as expressões dos dias 2, 6 e 9 não foram significativamente diferentes entre si, mas as três diferiram da expressão do dia 1 ($p<0,05$). Por fim, no grupo GC-1, as expressões do Col I, nos dias 2, 6 e 9, novamente não apresentaram diferenças significativas entre si; somente as expressões do sexto e nono dia foram significativamente maiores ($p<0,05$) que do primeiro dia (dia 2 vs. dia 1 não significativo). Esses achados mostram que o gene do colágeno tipo I não foi regulado pelo hormônio tiroideano nessas células.

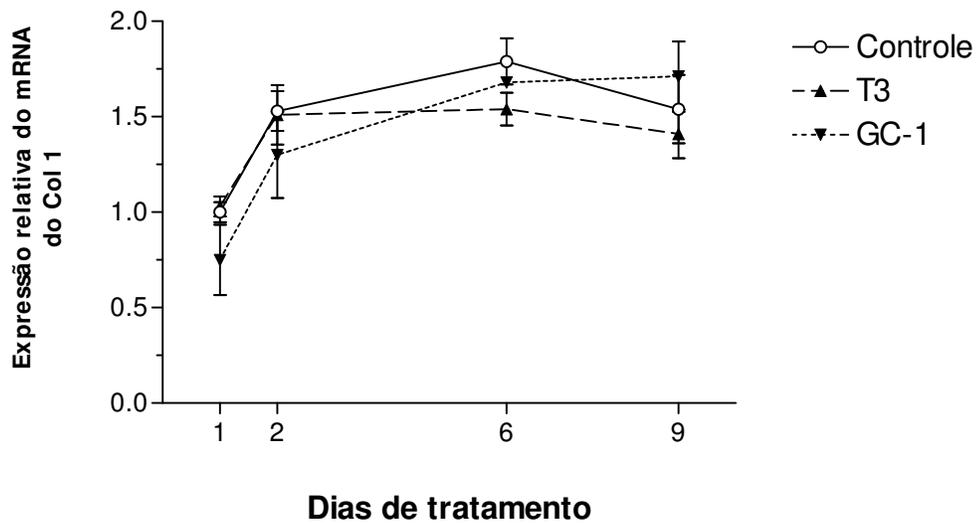


Figura 19. Expressão do mRNA do Col I em células MC3T3-E1 tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 1, 2, 6 e 9 dias. A expressão relativa do mRNA foi analisada por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do Col I nas células controle (2, 6 e 9 dias) e tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle de 1 dia como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços.

5.8 - Efeito do T3 e GC-1 na expressão relativa do mRNA do TR α e TR β nas ROS17/2.8

A análise por PCR em tempo-real da expressão do mRNA do TR α nas células ROS17/2.8 mostrou que em nenhum momento estudado, o tratamento com T3 e GC-1 alterou a expressão em relação ao controle (Fig. 20A). A expressão do TR α aumentou em função do tempo de cultura (7h vs. 48h $p < 0,05$; 7h vs. 72h $p < 0,01$; 24h vs. 48h $p < 0,05$; 24h vs. 72h $p < 0,01$) nas células controle, mas não nas células tratadas com T3. Nas células tratadas com GC-1, houve um aumento da expressão do TR α apenas nas primeiras 24 horas de tratamento (7h vs. 24h, 48h e 72h $p < 0,01$), mantendo-se estável após esse período (Fig. 20A).

Com relação à expressão do TR β nas ROS17/2.8 (Fig. 20B), houve indução significativa em relação ao controle ($p < 0,05$) com 7 horas de tratamento com T3, mas não com GC-1. No entanto,

a partir de 24 horas de tratamento, as induções promovidas pelo T3 e GC-1 foram semelhantes e significativamente diferentes do controle. Nota-se que, independente do tratamento, a expressão do TR β aumenta mais do que a do TR α ao longo do tempo. Nas células controle, a expressão do TR α aumenta 1.4 vezes entre 7 e 72 horas; enquanto que a do TR β aumenta 1.8 vezes. Além disso, o tratamento com T3 causou uma grande indução da expressão do TR β nas primeiras 24 horas; após esse período, a expressão manteve-se estável (7h vs. 24h e 72h $p<0,05$; 7h vs. 48h $p<0,01$). A indução da expressão do TR β pelo GC-1 foi estabilizada somente a partir de 48 horas, como podemos notar na figura 20B (7h vs. 24h, 48h e 72h $p<0,001$; 24h vs. 48h e 72h $p<0,05$).

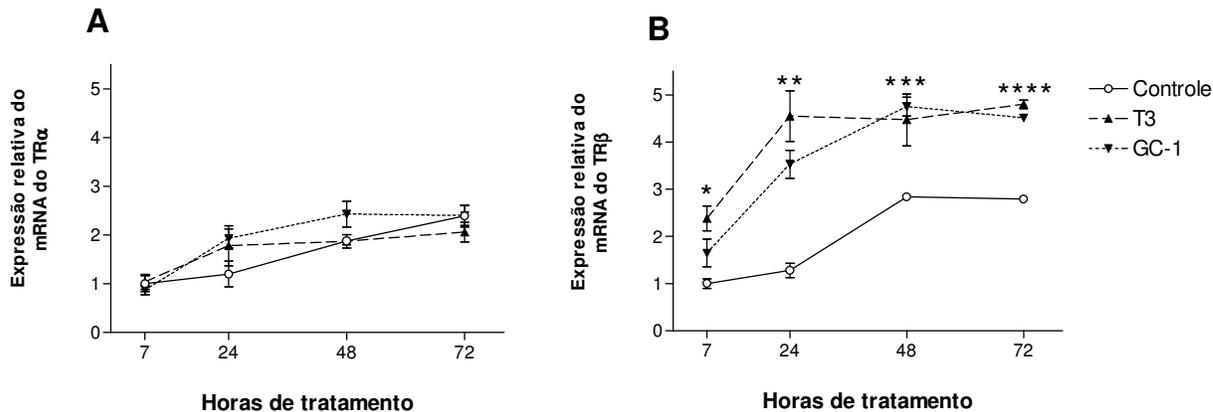


Figura 20. Expressão relativa do mRNA do TR α e TR β em células ROS17/2.8 tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 7, 24, 48 e 72 horas. A expressão relativa do mRNA foi analisada por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do TR α e TR β nas células controle (7, 24 e 48 horas) e tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle de 7 horas como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. **(A)** Expressão relativa do mRNA do TR α . **(B)** Expressão relativa do mRNA do TR β . * T3 vs controle ($p<0,05$); ** T3 vs controle ($p<0,01$); GC-1 vs controle ($p<0,05$); *** T3 e GC-1 vs controle ($p<0,05$); **** T3 e GC-1 vs controle ($p<0,001$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

5.9 - Efeito do T3 e GC-1 na expressão relativa do mRNA do TR α e TR β nas MC3T3-E1

A Fig. 21A mostra que a expressão do mRNA do TR α nas células MC3T3-E1 pouco foi alterada pelo tratamento hormonal nos dias testados. Apenas no dia 2, o GC-1 induziu a expressão do TR α de forma significativa em relação ao controle e ao T3. Em contrapartida, no dia 9, tanto o GC-1 quanto o T3 inibiram a expressão do TR α em relação ao controle. A expressão do TR α não variou em função do tempo; mantendo-se estável do início ao fim do estudo nas células controle.

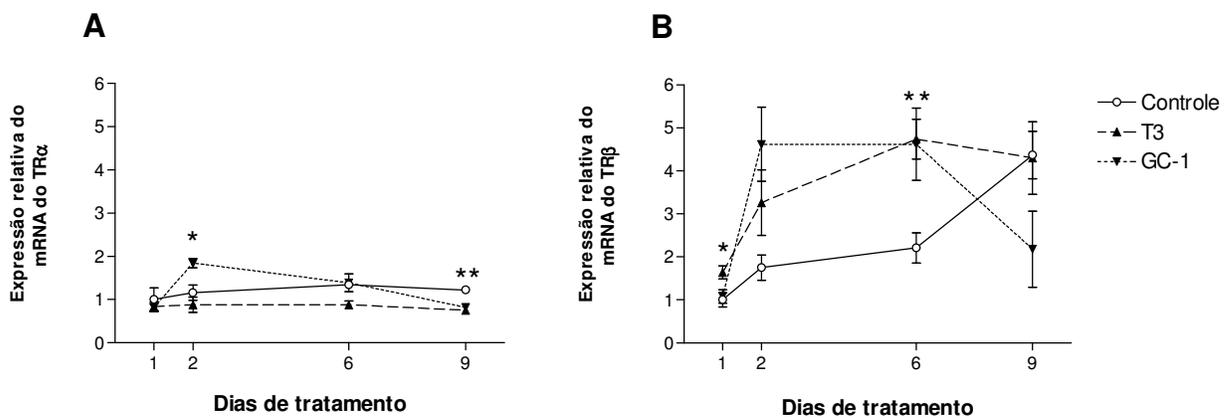


Figura 21. Expressão do mRNA do TR α e TR β em células MC3T3-E1 tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 1, 2, 6 e 9 dias. A expressão relativa do mRNA foi analisada por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do TR α e TR β nas células controle (2, 6 e 9 dias) e tratadas foi determinada designando-se a expressão das células controle de 1 dia como 1 (um). Cada ponto representa a média \pm SEM de três poços. **(A)** Expressão relativa do mRNA do TR α . * GC-1 vs controle e T3 ($p < 0,05$); ** controle vs T3 e GC-1 ($p < 0,01$) **(B)** Expressão relativa do mRNA do TR β . * T3 vs controle ($p < 0,05$); ** T3 e GC-1 vs controle ($p < 0,05$), pelo teste Student-Newman-Keuls.

A Fig. 21B mostra a expressão do mRNA do TR β nas células MC3T3-E1. Diferentemente do TR α , o TR β tem sua expressão afetada pelo tempo. Nas células controle, a expressão aumentou

significativamente a cada dia estudado (1 dia vs. 9 dias $p<0,001$; 2 dias vs. 9 dias $p<0,01$; 6 dias vs. 9 dias $p<0,01$). Nas células tratadas com T3, também houve aumento da expressão tempo-dependente até o sexto dia; a partir desse ponto, a expressão foi estabilizada (1 dia vs. 6 e 9 dias $p<0,05$). Nas células GC-1, assim como para o TR α , a expressão máxima do TR β foi observada depois de 2 dias, mantendo-se estável até o sexto dia, e retornando aos valores iniciais no dia 9 (1 dia vs. 2 e 6 dias $p<0,05$) (Fig. 21B). Nota-se que, com 1 dia de tratamento, o T3 induziu de maneira significativa a expressão do TR β em relação ao controle ($p<0,05$). No sexto dia de tratamento, tanto o T3 quanto o GC-1 induziram significativamente e de forma ampla (2.15 e 2.1 vezes vs controle, respectivamente) a expressão do TR β .

5.10 - Comparação da expressão relativa do mRNA do TR α vs. TR β nas ROS17/2.8

A Fig. 22 mostra a diferença de expressão relativa entre TR α e TR β nas células ROS17/2.8. Nas células controle (Fig. 22A), a expressão de TR α foi sempre maior do que a de TR β , nota-se, porém, que essa diferença diminuiu a cada hora estudada, caindo de 14.3 vezes (7 horas) para 10.8 vezes (72 horas). Nas células tratadas com T3 (Fig. 22B), também houve maior expressão de TR α , entretanto, essa a diferença foi menor do que aquela das células controle, apenas cerca de 5.5 vezes mais TR α do que TR β em todas as horas avaliadas. Nas células tratadas com GC-1 (Fig. 22C), também há maior expressão de TR α (cerca de 6.8 vezes).

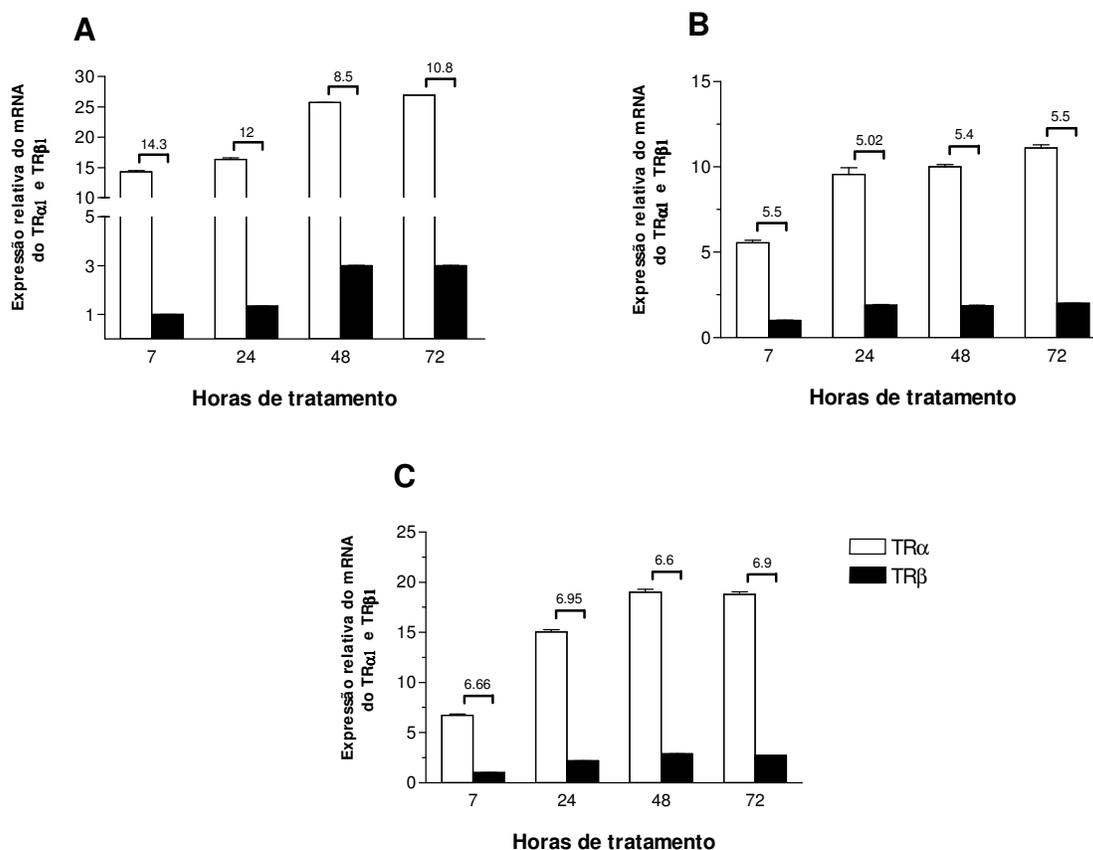


Figura 22. Expressão relativa do TR α 1 vs. TR β 1 nos três grupos. As células ROS17/2.8 foram tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 7, 24, 48 e 72 horas. A expressão relativa do mRNA foi analisado por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do TR β 1 (24, 48 e 72 horas) e TR α 1 foi determinada designando-se a expressão das células TR β 1 de 7 horas como 1 (um). Cada barra representa a média \pm SEM de três poços. **(A)** Expressão relativa do mRNA do TR α 1 vs TR β 1 em células controle. **(B)** Expressão relativa do mRNA do TR α 1 vs TR β 1 em células tratadas com T3. **(C)** Expressão relativa do mRNA do TR α 1 vs TR β 1 em células tratadas com GC-1. Os valores sobre as barras representam a diferença em vezes da expressão do TR α 1 vs. TR β 1. Houve diferença significativa entre a expressão dos TRs em todos os tempos analisados ($p < 0.05$ por *Student t-test*).

5.11 - Comparação da expressão relativa do mRNA do TR α vs. TR β nas MC3T3-E1

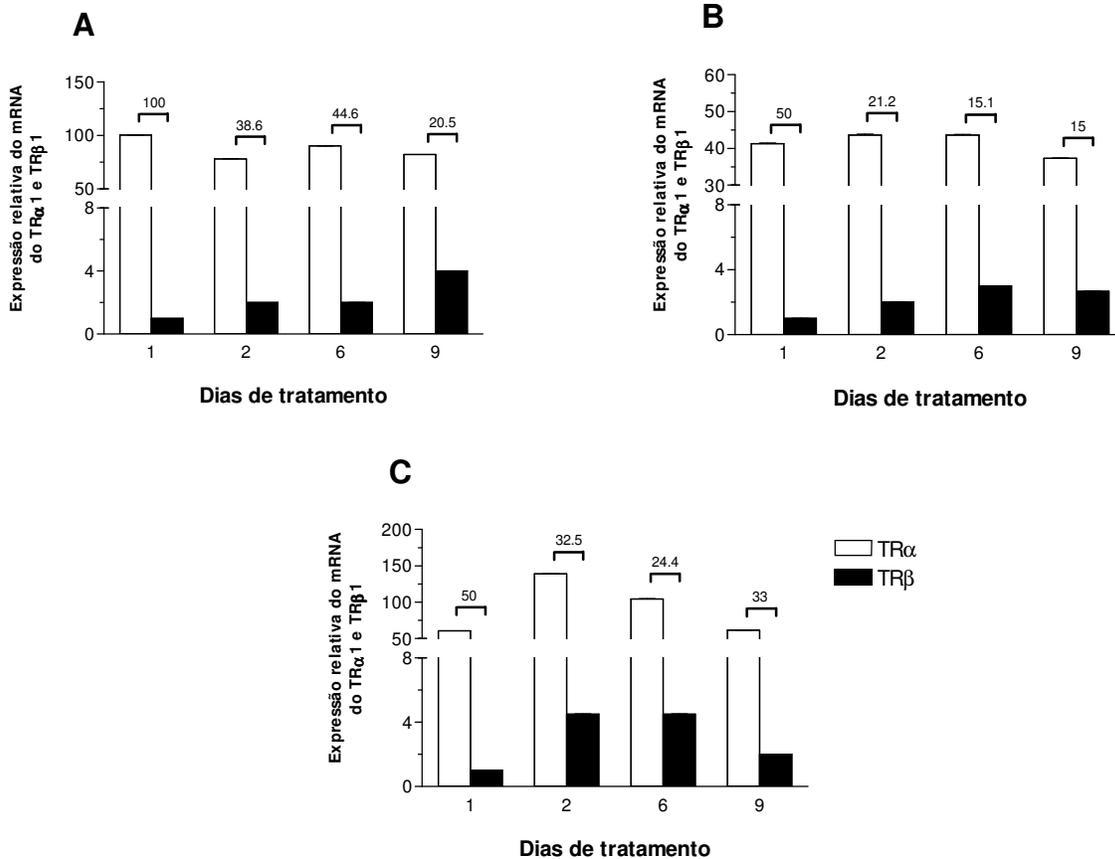


Figura 23. Expressão relativa do TR α 1 vs. TR β 1 nos três grupos. As células MC3T3-E1 foram tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. Culturas de células foram mantidas em meio sem soro e tratadas por 1, 2, 6 e 9 dias. A expressão relativa do mRNA foi analisada por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do TR β 1 (2, 6 e 9 dias) e TR α 1 foi determinada designando-se a expressão das células TR β 1 de 1 dia como 1 (um). Cada barra representa a média \pm SEM de três poços. **(A)** Expressão relativa do mRNA do TR α 1 vs TR β 1 em células controle. **(B)** Expressão relativa do mRNA do TR α 1 vs TR β 1 em células tratadas com T3. **(C)** Expressão relativa do mRNA do TR α 1 vs TR β 1 em células tratadas com GC-1. Os valores sobre as barras representam a diferença em vezes da expressão do TR α 1 vs. TR β 1. Houve diferença significativa entre a expressão dos TRs em todos os tempos analisados ($p < 0.05$ por *Student t-test*).

Nas células MC3T3-E1 (Fig. 23), também há maior expressão de TR α do que TR β , sendo que essa diferença é ainda mais acentuada do que nas ROS17/2.8. Nas células controle, assim como nas ROS17/2.8, a diferença de expressão entre TR α e TR β diminuiu em função do tempo, caindo de 100 vezes no dia 1 (um), para 20.5 vezes no dia 9 (Fig. 23A). As Figs. 23B e 23C mostram a diferença de expressão entre TR α e TR β nas células tratadas com T3 e GC-1, respectivamente. O tratamento com T3 e GC-1 fez com que essa diferença diminuísse do início ao fim do estudo. As células tratadas com T3 expressaram 50 vezes mais TR α no dia 1 e apenas 15 vezes mais TR α no dia 9. Nas células tratadas com GC-1, a expressão do TR α foi de 50 vezes maior no dia 1 e decaiu para 33 vezes no dia 9.

5.12 - Comparação da expressão relativa do mRNA do TR α nas ROS17/2.8 vs. MC3T3-E1

Ao compararmos a expressão gênica dos TRs entre as duas linhagens, notamos que o TR α é altamente mais expresso nas células MC3T3-E1 do que nas ROS17/2.8. A Fig. 24A mostra essa diferença nas células controle num tempo de 1 e 2 dias em cultura. No dia 1, a expressão do TR α é 12.4 vezes maior nas MC3T3-1 do que nas ROS17/2.8 e, no dia 2, essa diferença caiu para 9.24 vezes; o que pode ser explicado pelo fato da expressão do TR α aumentar em função do tempo nas ROS17/2.8 e não nas MC3T3-E1. O tratamento com T3 (Fig. 24B) fez com que a diferença entre as linhagens caísse para aproximadamente 7 vezes. Nas células tratadas com GC-1, a diferença entre as linhagens foi de 6.2 vezes no dia 1, e de 11.2 vezes no dia 2, o que está de acordo com a indução da expressão do TR α pelo GC-1 nas MC3T3-E1 após dois dias de tratamento (Fig. 21B).

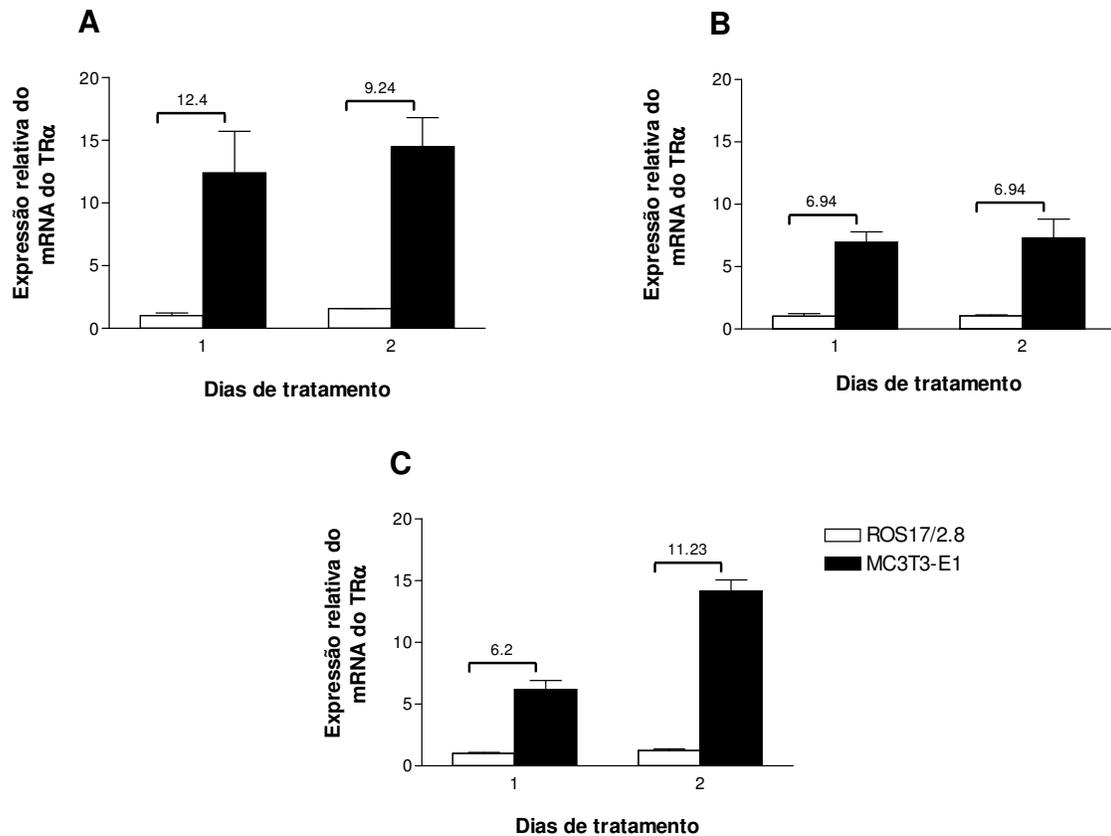


Figura 24. Expressão do TR α nas células ROS17/2.8 vs. MC3T3-E1 nos três grupos. As células foram tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. A expressão relativa do mRNA foi analisado por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do TR α nas ROS17/2.8 (2 dias) e nas MC3T3-E1 foi determinada designando-se a expressão das células ROS17/2.8 de 1 dia como 1 (un). Cada barra representa a média \pm SEM de três poços. **(A)** Expressão relativa do mRNA do TR α em células controle. **(B)** Expressão relativa do mRNA do TR α em células tratadas com T3. **(C)** Expressão relativa do mRNA do TR α em células tratadas com GC-1. Os valores sobre as barras representa a diferença em vezes da expressão do TR α nas MC3T3-E1 vs. ROS17/2.8. Houve diferença significativa entre a expressão do TR α em todos os tempos analisados ($p < 0.05$ por Student t-test).

5.13 – Comparação da expressão relativa do mRNA do TR β nas ROS17/2.8 vs. MC3T3-E1

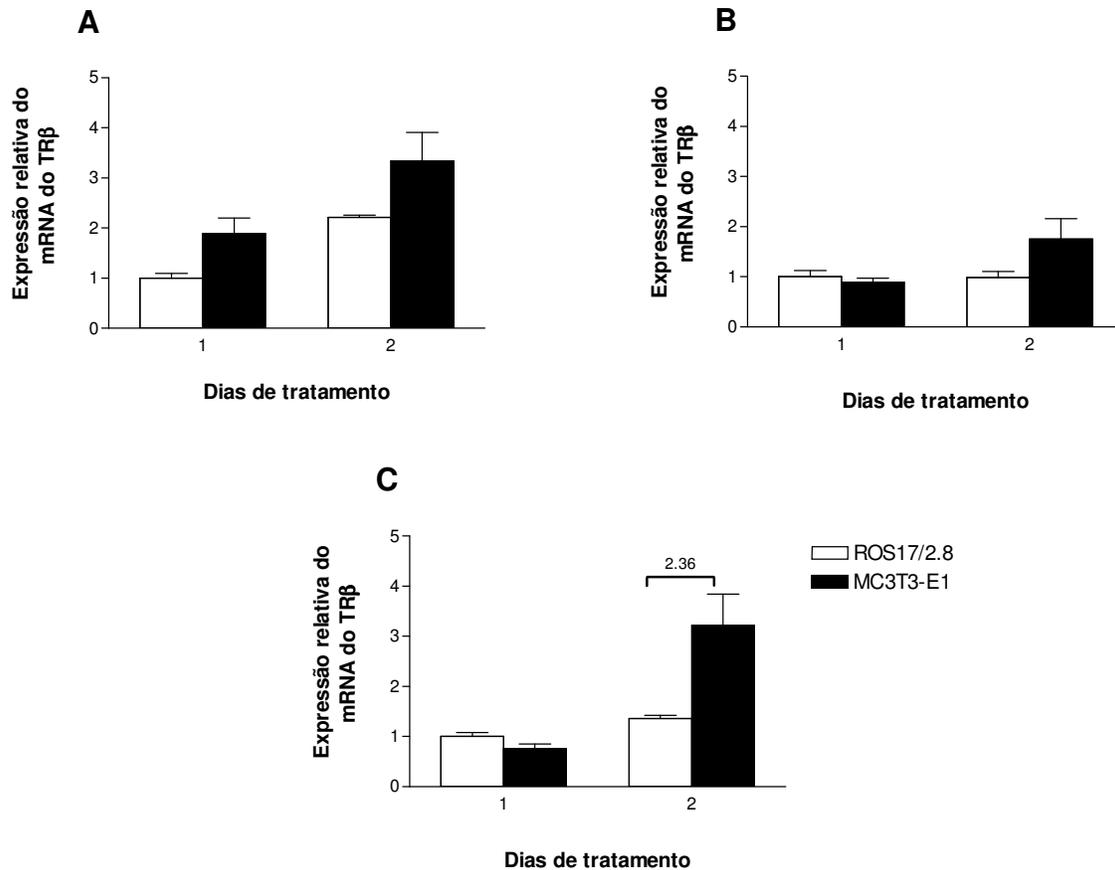


Figura 25. Expressão do TR β nas células ROS17/2.8 vs. MC3T3-E1 nos três grupos. As células foram tratadas com T3 e GC-1 a 10^{-8} M. A expressão relativa do mRNA foi analisado por PCR em tempo real e os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. A expressão relativa do mRNA do TR β nas ROS17/2.8 (2 dias) e nas MC3T3-E1 foi determinada designando-se a expressão das células ROS17/2.8 de 1 dia como 1 (um). Cada barra representa a média \pm SEM de três poços. **(A)** Expressão relativa do mRNA do TR β em células controle. **(B)** Expressão relativa do mRNA do TR β em células tratadas com T3. **(C)** Expressão relativa do mRNA do TR β em células tratadas com GC-1. O valor sobre as barras de 2 dias na figura C representa a diferença em vezes da expressão do TR β nas MC3T3-E1 vs. ROS17/2.8 ($p=0.04$ por Student t-test).

A Fig. 25 mostra que praticamente não há diferença na expressão de TR β entre as células ROS17/2.8 e MC3T3-E1. Notamos que há apenas uma tendência das células MC3T3-E1 expressarem mais TR β do que as ROS17/2.8. Apenas nas células tratadas por 2 dias com GC-1 é que observamos uma expressão significativamente maior de TR β nas células MC3T3-E1 (Fig. 25C).

6 – DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos os efeitos do GC-1 na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. Para isso, utilizamos duas linhagens celulares, as ROS17/2.8 e as MC3T3-E1. As ROS17/2.8 são células osteoblasto-*like*, derivadas de osteosarcoma de rato, que apresentam um fenótipo de osteoblastos maduros desde os primeiros dias em cultura, expressando genes característicos do estágio final do processo de diferenciação osteoblástica como, por exemplo, a osteocalcina e a osteopontina (Stein et al, 1993). As MC3T3-E1 são células derivadas da calvária de camundongos e são um ótimo modelo para o estudo da diferenciação osteoblástica, uma vez que se diferenciam em cultura, expressando, ao longo do tempo, o fenótipo de pré-osteoblastos, osteoblastos e osteoblastos maduros (Quarles et al, 1992). Além disso, ambas as linhagens representam modelos interessantes para o estudo dos efeitos do hormônio tiroideano em osteoblastos, uma vez que são responsivas ao T3 e expressam TRs funcionais, incluindo o TR α 1, TR α 2 e TR β 1 (Williams et al, 1994 ; Gruber et al 1999).

Em um primeiro momento, tivemos o cuidado de investigar o ciclo de crescimento das células ROS17/2.8 e MC3T3-E1. Com isso, foi possível definir o número de células que seriam plaqueadas nos estudos propriamente ditos, além de permitir a determinação dos pontos do ciclo de crescimento em que deveríamos coletar as células para avaliar a proliferação celular. Analisando a duração da fase Lag e principalmente da fase Log, optamos por plaquear 2.6×10^4 células/poço para as ROS17/2.8 e 10^4 células/poço para as MC3T3-E1, pois nessas densidades tivemos uma fase Log longa, sem comprometimento da cultura, e isso nos forneceu mais tempo, ou seja, mais pontos na curva de crescimento para a avaliação dos efeitos do T3 e GC-1 na proliferação celular. Durante o tratamento com T3 e GC-1, as células ROS17/2.8 foram mantidas em meio sem soro, uma vez que o mesmo não comprometeu a viabilidade dessas células, nos permitindo assim, melhor isolar as ações de cada ligante. Ao estudarmos as células MC3T3-E1 notamos que, em meio sem soro, essas células, além de não proliferarem, apresentaram baixa sobrevivência. Isso está de acordo com os estudos de Mogi et al (2004), que demonstraram que as células MC3T3-E1 na carência de soro, sofrem uma forte parada na fase G0/G1 do ciclo celular, seguida da ativação das caspases 2, 3, 8 e 9, desencadeando o processo de apoptose. Sendo assim,

optamos por utilizar meio contendo soro previamente tratado com carvão ativado (*charcoal stripped serum*-CSS). Esse tratamento permite a retirada de lipídios, esteróides e hormônio tireoideano do soro e a permanência de fatores essenciais para proliferação e sobrevivência das células. Após estudarmos o crescimento dessas células com diferentes porcentagens de CSS, notamos que as células cultivadas em meio contendo 1,25% e 2.5% de CSS apresentaram um ciclo de crescimento muito irregular, com aumentos e quedas do número de células, enquanto que as células cultivadas em meio contendo 5% e 10 % de CSS apresentaram ritmos de crescimento bastante regulares. Assim sendo, decidimos utilizar meio contendo 5% de CSS, uma vez que esta foi a menor porcentagem de CSS a resultar em uma curva de crescimento adequada aos estudos do efeito do T3 e GC-1 no crescimento celular (Fig. 6).

Nós mostramos que tanto o T3 como o GC-1 igualmente reduziram o crescimento das células ROS17/2.8 no final, mas não no início, da fase exponencial (Fig. 5). Em seguida, investigamos se esse efeito inibitório do T3 e GC-1 no crescimento celular ocorreu em função da inibição da proliferação celular ou devido à indução da morte celular. Para tanto, realizamos estudos de incorporação de BrdU em dois tempos de tratamento (após 24 horas e 6 dias de tratamento), como uma medida da proliferação celular. Além disso, utilizamos a marcação com azul de tripan para a avaliação de morte celular.

Nos estudos de incorporação de BrdU nas células ROS17/2.8, não observamos diferenças significativas entre os grupos controle, T3 e GC-1 nas primeiras 24h de tratamento; entretanto, após seis dias de tratamento, vimos que a porcentagem de células que incorporaram BrdU foi significativamente e igualmente reduzida pelo tratamento com T3 ou GC-1, sugerindo que esses dois ligantes inibem a proliferação celular.

Assim como nas células ROS17/2.8, o T3 inibiu significativamente o crescimento das células MC3T3-E1 a partir do sexto dia de tratamento, mas não nas primeiras 24h de tratamento. O estudo da incorporação de BrdU mostrou que não houve efeito do T3 nas primeiras 24h de tratamento, mas sim após seis dias de tratamento. Os nossos achados são corroborados por outros estudos que mostram efeitos negativos do T3 sobre a proliferação das células osteoblásticas MC3T3-E1 (Kasono et al, 1988; Fratzl-Zelman et al, 1997). Foi demonstrado que o tratamento de células MC3T3-E1 com T3 inibe a expressão do mRNA da histona H4, um marcador de

proliferação celular, e a expressão do mRNA do c-fos, um gene mitogênico, o que reflete o efeito anti-proliferativo do hormônio tiroideano (Klaushofer et al, 1995; Varga et al, 1997).

O GC-1 também inibiu significativamente o crescimento das células MC3T3-E1 no final da fase exponencial, no entanto, diferentemente do que ocorreu nas ROS17/2.8, essa inibição foi mais branda do que aquela promovida pelo T3 (Fig. 7). Isso também foi observado nos estudos com incorporação de BrdU, onde as células GC-1 proliferaram significativamente mais do que as T3 e menos que as controle (Fig. 9B).

A ausência de efeitos do T3 e GC-1, detectáveis pela técnica utilizada, na proliferação celular nas primeiras 24 horas de tratamento sugere que os efeitos do T3 nesse processo sejam primariamente genômicos, assim como a grande maioria dos efeitos desse hormônio já descritos (Bassett & Williams, 2003). De acordo com Bassett et al (2003), os efeitos genômicos clássicos do hormônio tiroideano podem demorar de horas a dias para ocorrer. É necessário que o T3 se ligue ao seu receptor no núcleo das células, que os co-repressores sejam descartados, que os co-ativadores sejam convocados, que haja mudanças conformacionais na cromatina e, somente após esses eventos, ocorrerá a transcrição e tradução. Assim sendo, é possível que 24 horas de tratamento não tenham sido suficientes para o acúmulo e/ou degradação de proteínas e/ou enzimas responsáveis por mediar os efeitos do T3 e GC-1 na proliferação celular.

Um outro fator que possa ter limitado os efeitos do T3 e GC-1 após 24 horas de tratamento é o fato das células se encontrarem em um estado de subconfluência. Achados de Klaushofer et al (1995) e Varga et al (1999) mostraram que o T3 inibiu significativamente a proliferação de células MC3T3-E1, de maneira independente do tempo de tratamento, mas dependente da confluência da cultura, ou seja, o T3 apenas apresentou esse efeito anti-proliferativo em culturas confluentes. Ohishi et al (1994), em culturas de células de calvária de ratos, também observaram que o T3 diminuiu a quantidade de DNA somente em culturas confluentes. De fato, o efeito anti-proliferativo do T3 e GC-1, observado no presente estudo, ocorreu em culturas confluentes (após seis dias de tratamento).

O fato de que o T3 e GC-1 praticamente não alteraram a viabilidade das células ROS17/2.8 e MC3T3-E1, mas reduziram igualmente e de forma significativa o número de células na fase S do ciclo celular, sugere fortemente que o T3 inibe o crescimento dessas células principalmente via

inibição da proliferação celular. Por outro lado, Fratzl-Zelman et al (1997), apesar de terem demonstrado um efeito anti-proliferativo do T3 em células MC3T3-E1, também mostrou que o T3 aumenta a frequência de células com núcleos apoptóticos. Varga et al (1999), através de uma combinação de técnicas bioquímicas e morfológicas, mostraram que o efeito inibitório do T3 no crescimento de células MC3T3-E1 está relacionado a um efeito estimulatório do T3 sobre a apoptose e não sobre a proliferação celular. A discrepância entre os nossos achados e os de Fratzl-Zelman et al (1997) e Varga et al (1999), pode estar relacionada a diferenças das condições de cultura, dos meios e de concentrações hormonais utilizadas no tratamento. No entanto, a técnica utilizada no presente estudo (azul de tripan) praticamente não detecta morte por apoptose, mas sim por necrose. Assim sendo, estudos adicionais e mais específicos para a avaliação dos efeitos do T3 e GC-1 na morte por apoptose deverão ser realizados no futuro.

Considerando-se a seletividade do GC-1 pelo TR β e que o T3 e GC-1 igualmente inibiram a proliferação das células ROS17/2.8, os nossos achados sugerem que essa isoforma tenha um papel chave na mediação dos efeitos inibitórios do T3 na proliferação dessas células. Por outro lado, os efeitos mais brandos do GC-1 em relação ao T3 na proliferação das células MC3T3-E1, sugere que tanto o TR α 1 quanto o TR β 1 medeiam os efeitos anti-proliferativos do T3 nas células de camundongos.

Para avaliarmos os efeitos do T3 e GC-1 na diferenciação das células osteoblásticas, investigamos os efeitos desses ligantes na expressão do mRNA da osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno do tipo I (todos genes marcadores do fenótipo osteoblástico).

Nas células ROS 17/2.8, avaliamos apenas a expressão gênica da OC, uma vez que o Col I e ALP não respondem ao T3 nessas células (Williams et al, 1995; Gouveia et al, 2001). Mostramos que o T3 e GC-1 igualmente induziram o mRNA da OC de maneira dependente da dose e do tempo de tratamento (Figs. 12 e 16) nas ROS 17/2.8; o que sugere que ambos os ligantes induzem a diferenciação celular. Corroborando estudos anteriores (Ohishi et al, 1994; Varga et al, 1997; Gouveia et al, 2001 e Barsal et al, 2004), mostramos que a indução do mRNA da OC pelo T3 e GC-1 estabilizou-se com a dose de 10^{-8} M (3.25 e 3.33 vezes vs. controle, respectivamente). Nesta mesma dose, verificamos efeitos similares do T3 e GC-1 na indução da OC ao longo do tempo. Tanto o T3 quanto o GC-1 promoveram a maior indução da OC após 72 horas de

tratamento (T3 = 6.2 vezes vs. controle; e GC-1 = 6.7 vezes vs. controle), no entanto com apenas 7 horas de tratamento já pudemos observar que ambos os ligantes induziram significativamente a expressão da OC em relação ao controle (aproximadamente 2 vezes), o que evidencia o fato do gene da OC ser altamente regulado pelo T3 nessas células.

Nas MC3T3-E1, tanto o T3 quanto o GC-1 induziram a expressão da OC de forma dose e tempo-dependente (Figs. 13 e 17), o que corrobora estudos anteriores (Fratzl-Zelman et al, 1997 ; Varga et al,1997). Entretanto, algumas diferenças entre as duas linhagens são notáveis quanto aos efeitos do T3 e GC-1. Primeiro, a indução do mRNA da OC pelo T3 e GC-1 é muito maior nessas células do que nas ROS17/2.8 (30 a 67 vezes versus 2 a 6 vezes para o T3, e 4.5 a 24 vezes versus 1.8 a 6 vezes para o GC-1). Segundo, na dose de 10^{-8} M, o efeito do GC-1 na expressão da OC foi significativamente menor do que o do T3 em todos os tempos analisados nas MC3T3-E1 e igual nas ROS17/2.8. A maior responsividade da OC ao T3 e GC1 nas MC3T3-E1 é provavelmente explicada pela maior quantidade de TRs nessas células. Enquanto não há diferença significativa de expressão gênica de TR β 1 entre as duas linhagens (Fig. 25), o TR α 1 é cerca de 10.8 vezes mais expresso nas MC3T3-E1. Além disso, é possível que o próprio gene da OC de camundongos seja mais responsivo ao T3 e GC-1 do que o de ratos pela presença de TRE no seu promotor. Varga et al (2003) identificaram a presença de um TRE no promotor OG2 da OC de camundongos. Em ratos, viu-se que o T3 regula a expressão do gene da OC a nível transcricional e pós-transcricional, mas não foram identificados TREs no seu promotor (Gouveia et al, 2001). O fato do GC-1 ter tido o mesmo efeito do T3 nas ROS17/2.8, mas significativamente menor nas MC3T3-E1, sugere que o TR β 1 tem um papel chave na regulação da expressão da OC nas ROS17/2.8 e que o TR α 1 e TR β 1 são importantes para regular a expressão da OC nas MC3T3-E1.

Com relação à fosfatase alcalina, o T3 e GC-1 induziram a sua expressão gênica de forma distinta. Após 24 horas de tratamento, o T3 induziu significativamente o mRNA da ALP (1.7 vezes vs. controle) na dose de 10^{-8} M, enquanto o GC-1 não teve efeito mesmo com uma dose extremamente alta, 10^{-6} M. Como na dose de 10^{-6} M o GC-1 provavelmente perde a sua seletividade pelo TR β ligando-se ao TR α 1, era de se esperar efeito do GC-1 na expressão da ALP. Esses achados sugerem que os mecanismos através dos quais o T3 e GC-1 induzem a expressão da OC são diferentes. O GC-1 só passou a induzir significativamente a expressão da

ALP entre 2 e 9 dias de tratamento, sendo que, nesse período, o efeito do GC-1 foi significativamente menor do que o do T3. Fica claro, portanto, que o efeito do GC-1 na expressão da ALP é dependente do tempo de tratamento. De qualquer forma, esses achados sugerem que ambos os ligantes aceleram e intensificam a diferenciação osteoblástica.

A expressão do mRNA do Col I não foi afetada pelo T3 nem pelo GC-1, em nenhuma dose e nem em nenhum tempo estudado. Isso está de acordo com estudos anteriores que também não observaram efeito do T3 na expressão do Col I (Williams et al, 1995 e Gouveia et al, 2001). Observa-se, entretanto, um aumento da expressão do Col I em função do tempo de cultura, o que é característico da diferenciação osteoblástica (Owen et al, 1990).

O fato dos efeitos do T3 e GC-1 serem diferentes é interessante pois comprova a seletividade do GC-1 em relação ao T3. Essa seletividade pode ser resultado não só da maior afinidade do GC-1 pelo TR β , mas também pode ocorrer em função de outras propriedades desse tiromimético. A captação seletiva do GC-1 pelos tecidos é uma importante característica (Troost et al., 2000) e deve ser considerada. Não sabemos, entretanto, se há diferença na captação de GC-1 e T3 pelas células osteoblásticas. Um recente estudo *in vitro* mostrou que o GC-1, na maioria das vezes, comporta-se como um agonista do T3, mas em determinados TREs, recruta co-ativadores e co-repressores de maneira distinta a do T3 e independentemente da isoforma de TR (Gloss et al., 2005). A consequência funcional disso seria uma regulação diferenciada de alguns genes pelo GC-1 vs. T3, que independe da seletividade do GC-1 pelo TR β . Fica claro, portanto, que os mecanismos envolvidos nos efeitos diferenciais do GC-1 vs. T3 nos sistemas biológicos, incluindo as células ósseas, depende de uma série de diferentes propriedades desses ligantes, além da seletividade do GC-1 pelo TR β , o que permanece para ser investigado.

Além de estudar a proliferação e diferenciação celular, decidimos investigar o efeito do T3 e GC-1 na expressão do TR α 1 e TR β 1 em ambas as linhagens celulares. Além disso, fizemos uma comparação da expressão desses receptores entre as linhagens. Vimos que (i) há maior expressão de TR α 1 do que de TR β 1 tanto nas ROS17/2.8 (10-14 vezes) quanto nas MC3T3-E1 (20-100 vezes), (ii) que essa diferença de expressão é maior nas MC3T3-E1, e (iii) que a expressão de TR β 1 é igual entre as linhagens, mas que a de TR α 1 é 10.8 vezes maior nas MC3T3-E1. Esses achados chamam a atenção para a importância do TR α 1 em mediar ações do T3 em células

osteoblásticas, especialmente nas células de camundongos. Isso está de acordo com estudos que mostraram que o mRNA do TR α 1 é 10-12 vezes mais expresso que o do TR β 1 no fêmur e tíbia de camundongos (O'Shea et al, 2003).

Um outro ponto interessante é o fato de que há um aumento da expressão tanto do TR α 1 quanto do TR β 1 à medida em que as células ROS17/2.8 vão se diferenciando (Fig. 20). Apesar de ambos os receptores terem a sua expressão aumentada em função do tempo de cultura, o aumento do TR β 1 é 30% maior que o aumento do TR α 1. Nas MC3T3-E1, a expressão do TR β 1 aumenta aproximadamente 4 vezes ao longo de 9 dias de cultura, enquanto a expressão do TR α 1 não se altera. Esses achados sugerem uma modulação da ação do T3 via TRs e que o TR β 1 tem um importante papel em mediar ações do T3 em osteoblastos maduros. Isso provavelmente explica porque o GC-1 e T3 têm o mesmo efeito na proliferação e diferenciação das células ROS17/2.8, que desde os primeiros momentos em cultura expressam o fenótipo de osteoblastos maduros. Esses resultados são parcialmente corroborados por um estudo anterior (Williams et al, 1994) que demonstrou, por Northern Blot, que as células ROS17/2.8 expressam mais TR α 2 e TR β 1 do que TR α 1. Além disso, mostrou que, em células pouco diferenciadas, as ROS25/1, há predomínio de TR α 1 e TR α 2 com baixíssimos níveis de mRNA de TR β 1.

É digno de nota que tanto o T3 quanto o GC-1 induzem positivamente a expressão do TR β 1, mas não do TR α 1 nas células ROS17/2.8. Efeitos similares desses ligantes foram observados na expressão do TR β 1 em girinos (*Xenopus laevis*) (Opitz et al, 2006). Isto está de acordo com a identificação de TREs no promotor do gene do TR β 1 (Suzuki et al, 1994; Sakurai et al, 1992). É interessante observar que nas MC3T3-E1, tanto o T3 quanto o GC-1 aumentaram a expressão do TR β 1 após seis dias de tratamento, mas inibiram a expressão do TR α 1 após 9 dias de tratamento. Esses achados sugerem que tanto o T3 quanto o GC-1 regulam a responsividade dos osteoblastos ao hormônio tiroideano e, mais uma vez, chamam a atenção para a importância do TR β 1 na diferenciação osteoblástica.

7 - CONCLUSÃO

Os achados deste estudo mostram que:

- As células osteoblásticas ROS17/2.8 e MC3T3-E1 são responsivas ao GC-1;
- Nas ROS17/2.8, o TR β 1 parece ter um papel chave na mediação das ações do T3 na inibição da proliferação e na indução da diferenciação celular;
- Nas MC3T3-E1, tanto o TR β 1 quanto o TR α 1 parecem mediar as ações do T3 na inibição da proliferação e na indução da diferenciação celular;
- As células MC3T3-E1 são mais responsivas ao hormônio tiroideano do que as ROS17/2.8;
- A expressão do mRNA do TR α 1 é maior que a do TR β 1 em ambas linhagens, o que chama a atenção para a importância do TR α 1 na fisiologia óssea;
- A expressão do mRNA do TR β 1 aumenta de forma significativa em função do tempo, tanto nas ROS17/2.8 quanto nas MC3T3-E1, o que sugere um papel chave do TR β 1 em osteoblastos maduros;
- Considerando-se que o tratamento com T3 e GC-1 altera a expressão do mRNA dos TRs, especialmente do TR β 1, tanto nas ROS17/2.8 quanto nas MC3T3-E1, é provável que ambos os ligantes alterem a responsividade dos osteoblastos ao hormônio tiroideano.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, E. D.; BOERS, M. E.; PAZOS-MOURA, C.; MOURA, E.; KAULBACH, H.; ZAKARIA, M.; LOWELL, B.; RADOVICK, S.; LIBERMAN, M. C.; WONDISFORD, F. Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system, **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 291-300, 1999.

ABERCROMBIE, M.; HEAYSMAN, J.E.M. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture, II. "Monolayering" of fibroblasts, **Experimental Cell Research**, v. 6, n. 2, p. 293-306, 1954.

ABU, E.O.; BORD, S.; HORNER, A.; CHATTERJEE, V.K.K.; COMPSTON, J.E. The expression of thyroid hormone receptors in human bone, **Bone**, v. 21, n. 2, p.137-142, 1997.

ALLAIN, T.J.; YEN, P.M.; FLANAGAN, A.M.; MC GREGOR, A.M. The isoform-specific expression of the triiodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts, **European Journal of Clinical Investigation**, v. 26, p.418-425, 1996.

BALLOCK, R.; MITA, B. C.; ZHOU, X.; CHEN, D. H.; MINK, L. M. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in rat growth plate cartilage *in vivo*, **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 9, p. 1550-6, 1999.

BARSAL, G.; TANELI, F.; ATAY, A.; HEKIMSOY, Z.; ERCIYAS, F. Serum osteocalcin levels in hyperthyroidism before and after antithyroid therapy, **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 183-188, 2004.

BASSETT, J. H. D.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS. G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, n. 1, p. 1-11, 2003.

BASSETT, J. H. D.; WILLIAMS, G. R. The molecular actions of thyroid hormone in bone, **TRENDS in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 8, p. 356-364, 2003.

BAXTER, J. D.; WEBB, P.; GROVER, G.; SCANLAN, T. S. Selective activation of thyroid hormone signaling pathways by GC-1: a new approach to controlling cholesterol and body weight, **Trends Endocrinol Metab**, v. 15, p. 154-157, 2004.

BIANCO, A. C.; KIMURA, E. T. Fisiologia da Glândula Tiróide IN: de Mello Aires, M. (Ed.) **FISIOLOGIA**. 2^a Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 813-828, 1999.

BRENT, G. A.; MOORE, D. D.; LARSEN. P. R. Thyroid Hormone Regulation Of Gene Expression, **Annual Review of Physiology**, v. 53, n. 1, p. 17-35, 1991.

CHASSANDE, O. Do unliganded thyroid hormone receptors have physiological functions?, **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 31, p. 9-20, 2003.

CHENG, S.Y. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance, **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, p. 176-182, 2005.

CHIELLINI, G.; APRILETTI, J.W.; AL YOSHIHARA, H.; BAXTER, J.D.; RIBEIRO, R.C.; SCANLAN, T.S. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor, **Chemistry & Biology**, v. 5, p.299-306, 1998.

COLUMBANO, A.; PIBIRI, M.; DEIDDA, M.; COSSU, C.; SCANLAN, T. S.; CHIELLINI, G.; MUNTONI, S.; LEDDA-COLUMBANO, G. M. The thyroid hormone receptor- β agonist GC-1 induces cell proliferation in rat liver and pancreas, **Endocrinology**, v. 147 (7), p. 3211-3218, 2006.

COOK, C.B.; KAKUCSKA, I.; LECHAN, R.M.; KOENIG, R.J. Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. **Endocrinology**, v.130, p.1077-1079, 1992.

ECKEY, M.; MOEHREN, U.; BANIAHMAD, A. Gene silencing by the thyroid hormone receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, n. 1, p. 13-22, 2003.

EVANS, R. M. The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. **Science**, v. 240, p. 889-95, 1988.

FLAMANT, F.; POGUET, A. L.; PLATEROTI, M.; CHASSANDE, O.; GAUTHIER, K.; STREICHENBERGER, N.; MANSOURI, A.; SAMARUT, J. Congenital hypothyroid Pax8(-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TRalpha gene, **Molecular Endocrinology**, v. 16, p. 24-32, 2002.

FOWLER, P. B; MCIVOR, J.; SYKES, L.; MACRAE, K.D. The effect of long-term thyroxine on bone mineral density and serum cholesterol. **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 30, p. 527-532, 1996.

FORREST, D.; HANEBUTH, E.; SMEYNE, R. J.; EVERDS, N.; STEWART, C. L.; WEHNER, J. M.; CURRAN, T. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function, **EMBO Journal**, v. 15, p. 3006-3015, 1996.

FORREST, D.; SJOBERG, M.; VENNSTROM, B. Contrasting developmental and tissue-specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes, **EMBO Journal**, v. 9, n. 5, p 1519-1528, 1990.

FRAICHARD, A.; CHASSANDE, O.; PLATEROTI, M.; ROUX, J. P.; TROUILLAS, J.; DEHAY, C.; LEGRAND, C.; GAUTHIER, K.; KEDINGER, M.; MALAVAL, L.; ROUSSET, B.; SAMARUT, J. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production, **EMBO Journal**, v. 16, p. 4412-4420, 1997.

FRATZL-ZELMAN, N; HÖRANDNER, H; LUEGMAYR, E; VARGA, F; ELLINGER, A; ERLEE, M. P. M; KLAUSHOFER, K. Effects of Triiodothyronine on the Morphology of Cells and Matrix, the Localization of Alkaline Phosphatase, and the Frequency of Apoptosis in Long-term Cultures of MC3T3-E1 Cells, **Bone**, v. 20, n 3, p. 225-236, 1997.

FREITAS, F. R.; CAPELO, L. P.; O'SHEA, P. J.; JORGETTI, V.; MORISCOT, A. S.; SCANLAN, T. S.; WILLIAMS, G. R.; ZORN, T. GOUVEIA, C. H. The thyroid hormone receptor β -specific agonist GC-1 selectively affects the bone development of hypothyroid rats, **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 2, p. 294-304, 2005.

FREITAS, F. R.; MORISCOT, A. S.; JORGETTI, V.; SOARES, A. G.; PASSARELLI, M.; SCANLAN, T. S.; BRENT, G. A.; BIANCO, A. C.; GOUVEIA, C. H. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR β -selective compound GC-1, **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 5, p. E1135-E1141, 2003.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells**, chapter 18, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, 1994.

FURLOW, J.D.; YANG, H. Y.; HSU, M.; LIM, W.; ERMIO, D. J.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T. S. Induction of larval tissue resorption in *Xenopus laevis* tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1, **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 26555-62, 2004.

FUSINITA, M. I.; VAN DEN ENT, A. J.; VAN WIJNEM, T. J.; LAST, R. B.; STEIN, J. L.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S. Concerted control of multiple histone promoter factors during cell density inhibition of proliferation in osteosarcoma cells: reciprocal regulation of cell cycle-controlled and bone-related genes, **Cancer Research**, v. 53, p. 2399-2404, 1993.

GAUTHIER, K.; PLATEROTI, M.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R.; WEISS, R. E.; REFETOFF, S.; WILLOTT, J. F.; SUNDIN, V.; ROUX, J. P.; MALAVAL, L.; HARA, M.; SAMARUT, J.; CHASSANDE, O. Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus, **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 4748-4760, 2001.

GLINOER, D. Thyroid disease during pregnancy, **The Thyroid**, edn 8, p. 1013-1027. Eds LE Braverman & RD Utiger. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GLOSS, B.; GIANNOCCO, G.; SWANSON, E. A.; MORISCOT, A. S.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T.; BAXTER, J. D.; DILLMANN, W. H. Different Configurations of Specific Thyroid Hormone Response Elements Mediate Opposite Effects of Thyroid Hormone and GC-1 on Gene Expression, **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4926-4933, 2005.

GLOSS, B.; TROST, S.; BLUHM, W.; SWANSON, E.; CLARK, R.; WINKFEIN, R.; JANZEN, K.; GILES, W.; CHASSANDE, O.; SAMARUT, J.; DILLMANN, W. Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta, **Endocrinology**, v. 142, p. 544-550, 2001.

GOTHE, S.; WANG, Z.; NG, L. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation, **Genes and Development**, v. 13, n. 10, p. 1329-41, 1999.

GOUVEIA, C. H. The Molecular and Structural Effects of Thyroid Hormone in bones, **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 1, p. 183-95, 2004.

GOUVEIA, C. H.; JORGETTI, V.; BIANCO, A. C. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats, **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 2098-107, 1997.

GOUVEIA, C.H.; SCHULTZ, J.; BIANCO, A.; BRENT, G. Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p.667-675, 2001.

GRUBER, R.; CZERWENKA, K.; WOLF, F.; HO, G.M.; WILLHEIM, M.; PETERLIK, M. Expression of the vitamin D Receptor, of Estrogen and Thyroid Hormone Receptor α - and β -Isoforms, and of the Androgen Receptor in Cultures of Native Mouse Bone Marrow and of Stromal/Osteoblastic Cells, **Bone**, v. 24, n. 5, p. 465-473, 1999.

HODIN, R. A.; LAZAR, M. A.; CHIN, W. W. Differential and tissue-specific regulation of multiple rat *c-erbA* messenger RNA species by thyroid hormone, **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 1, p. 101-105, 1990.

JOHANSSON, C.; VENNSTROM, B.; THOREN, P. Evidence that decreased heart rate in thyroid hormone receptor-alpha1-deficient mice is an intrinsic defect. **The American Journal of Physiology**, v. 275, p. R640-646, 1998.

KANESHIGE, M.; KANESHIGE, K.; ZHU, X. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta-receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 13209-14, 2000.

KASONO, K.; SATO, K.; HAN, D.C.; 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**, v. 4, p. 355-363, 1988.

KATZ, D; LAZAR, M. A. Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268 (28), p. 20904-10, 1993.

KLAUSHOFER, K.; VARGA, F.; GLANTSCHNIG, H.; FRATZL-ZELMAN, N.; CZERWENKA, E.; LEIS, H. J.; KOLLER, K.; PETERLIK, M. The Regulatory Role of Thyroid Hormones in Bone Cell Growth and Differentiation, **The Journal of Nutrition**, 125(7 Suppl), p. 1996S-2003S, 1995.

KOENIG, E.; WARNE, R. L.; BRENT, G. A.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R.; MOORE, D. D. Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 16, p. 5031-5035, 1988.

LAZAR, M. A. Thyroid Hormone Receptors: Multiple Forms, Multiple Possibilities. **Endocrine Reviews**, v.14, n.2, p. 184-93, 1993.

LEBRON, B.A.; PEKARY, A.F.; MIRELL, C.; HAHN, T.J.; HERSHMAN, J.M. Thyroid hormone 5'-deiodinase activity, nuclear binding, and effects on mitogenesis in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells, **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 4, p. 173-178, 1989.

LIU, W.; SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics, **Analytical Biochemistry**, v. 302, p. 52-59, 2002.

LIU, F.; MALAVAL, L.; GUPTA, A. K.; AUBIN, J. E. Simultaneous Detection of Multiple Bone-Related mRNAs and Protein Expression during Osteoblast Differentiation: Polymerase Chain Reaction and Immunocytochemical Studies at the Single Cell Level, **Developmental Biology**, v. 166, n. 1, p. 220-234, 1994.

LIVAK, K. J. ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2, **PE Applied Biosystems**, 1997.

LYNCH, M. P.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B. The Influence of Type I Collagen on the Development and Maintenance of the Osteoblast Phenotype in Primary and Passaged Rat Calvarial Osteoblast: Modification of Expression of Genes Supporting Cell Growth, Adhesion, and Extracellular Matrix Mineralization, **Experimental Cell Research**, v. 216, n. 1, p. 35-45, 1995.

MAKOWSKI, A.; BRZOSTEK, S.; COHEN, R. N.; HOLLENBERG, A. N. Determination of nuclear receptor corepressor interactions with the thyroid hormone receptor, **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 2, p. 273-286, 2003.

MANSOURI, A.; CHOWDHURY, K.; GRUSS, P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function, **Nature Genetics**, v. 19, n. 1, p. 87-90, 1998.

MANZANO, J.; MORTE, B.; SCANLAN, T. S.; BERNAL, J. Differential effects of triiodothyronine and the thyroid hormone receptor beta-specific agonist GC-1 on thyroid hormone target genes in the brain, **Endocrinology**, v. 144, p. 5480-5487, 2003.

MITSUHASHI, T. G.; NIKODEM, V. M. Regulation of expression of the alternative mRNAs of the rat α -thyroid hormone receptor gene, **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 8900-8904, 1989.

MITSUHASHI, T. G.; TENNYSON, G. E.; NIKODEM, V. M. Alternative splicing generates messages encoding rat *c-erbA* proteins that do not bind thyroid hormone, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 16, p. 5804-5808, 1988.

MOGI, M.; OZEKI, N.; NAKAMURA, H.; TOGARI, A. Dual roles for NF- κ B activation in osteoblastic cells by serum deprivation: osteoblastic apoptosis and cell-cycle arrest, **Bone**, v. 35, n. 2, p. 507-16, 2004.

MORTE, B.; MANZANO, J.; SCANLAN, T.S.; VENNSTROM, B.; BERNAL, J. Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor alpha 1 knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms, **Endocrinology**, v. 145, p. 1386-1391, 2004.

MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. A. tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism, **Acta Medica Scandinavica**, v. 204, p.97-102, 1978.

MOTOMURA, K.; BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis, **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 27 (1), p.1-23, 1998.

MURRAY, M. B.; ZILZ, N. D.; MCCREARY, N. L.; MACDONALD, M. J.; TOWLE, H. C. Isolation and characterization of rat cDNA clones for two distinct thyroid hormone receptors, **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 12770-77, 1988.

O'SHEA, P. J.; HARVEY, C. B.; SUZUKI, H.; KANESHIGE, M.; KANESHIGE, K.; CHENG, S. Y.; WILLIAMS, G. R. A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone, **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 7, p. 1410-1424, 2003.

OHISHI, K.; ISHIDA, H.; NAGATA, T.; YAMAUCHI, N.; TSURUMI, C.; NISHIKAWA, S.; WAKANO, Y. Thyroid hormone suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells to osteoblasts, but enhances functional activities of mature osteoblasts in cultured rat calvaria cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 161, p. 544-552, 1994.

OPITZ, R.; LUTZ, I.; NGUYEN, N. H.; SCANLAN, T. S.; KLOAS, W. Analysis of thyroid hormone receptor beta A mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212 (1), p. 1-13, 2006.

OWEN, T. A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L. M.; WILMING, L.; TASSINARI, M. S.; KENNEDY, M. B.; POCKWINSE, S.; LIAN, J. B.; STEIN, G. S. 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**, v. 143, n. 3, p. 420-430, 1990.

PASCA DI MAGLIANO, M.; DI LAURO, R.; ZANNINI, M. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 13144-49, 2000.

PEPENE, C. E.; SECK, T.; PFEILSCHIFTER, J.; GOZARIU, L.; ZIEGLER, R.; KASPERK, C. H. The effects of triiodothyronine on human osteoblast-like cells metabolism and interactions with growth hormone, **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 111, n. 2, p. 66-72, 2003.

QUARLES, L. D.; YOHAY, D. A.; LEVER, L. W.; CATON, R.; WENSTRUP, R. J. Distinct Proliferative and Differentiated Stages of Murine MC3T3-E1 Cells in Culture: An In Vitro Model of osteoblast **Development**, **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 6, p. 683-692, 1992.

REFETOFF, S. The syndrome of resistance to thyroid stimulating hormone, **Journal of the Chinese Medical Association : JCMA**, v. 66, p. 441-452, 2003.

RIBEIRO, M. O.; CARVALHO, S. D.; SCHULTZ, J. J.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T. S.; BIANCO, A. C.; BRENT, G. A. Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific, **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 97-105, 2001.

RIZZOLI, I.; POSER, J.; BURGI, U. Nuclear thyroid hormone receptors in cultured bone cells,

Metabolism, v. 35, p. 71-74, 1986.

ROBSON, H.; SIEBLER, T.; STEVENS, D.A.; SHALET, S. M.; WILLIAMS, G. R. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation, **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3887-3897, 2000.

SALTO, C.; KINDBLOM, J. M.; JOHANSSON, C.; Ablation of TR α 2 and a concomitant overexpression of alpha 1 yields a mixed hypo and hyperthyroid phenotype in mice, **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 12, p. 2115-28, 2001.

SAKURAI, A.; MIYAMOTO, T.; DEGROOT, L. J. Cloning and characterization of the human thyroid receptor beta 1 gene promoter, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 185 (1), p. 78-84, 1992.

SAP, J.; MUNOZ, A.; DAMM, K.;GOLD-BERG, Y.; GHYSDAEL, J. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone, **Nature**, v. 324, p. 635-640, 1986.

SATO, K.; HAN, D.C.; FUJII, Y.; TSUSHIRNA, T.; SHIZURNE, 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**, v. 120, p. 1873-1881, 1987.

STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; GERSTENFELD, L. G; SHALHOUB, V.; ARONOW, M.; OWEN, T.; MARKOSE, E. The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation, **Connective Tissue Research**, v. 20, p. 3-13, 1989.

STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Molecular Mechanisms Mediating Proliferation/Differentiation Interrelationships During Progressive Development of the Osteoblast Phenotype, **Endocrine Reviews**, v. 14, n. 4, p. 424-442, 1993.

SUZUKI, S.; MIYAMOTO, T.; OPSAHL, A.; SAKURAI, A.; DEGROOT, L. J. Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1, **Molecular Endocrinology**, v. 8 (3), p. 305-14, 1994.

THOMPSON, C. C.; WEINBERGER, C.; LEBO, R.; EVANS, R. M. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system, **Science**, v. 237, p. 1610-1614, 1987.

TROST, S. U.; SWANSON, E.; GLOSS, B.; WANG-IVERSON, D. B.; ZHANG, H.; VOLODARSKY, T.; GROVER, G. J.; BAXTER, J. D.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T. S.; DILLMANN, W. H. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity, **Endocrinology**, v. 141, p. 3057-3064, 2000.

VARGA, F.; LUEGMAYR, E.; FRATZL-ZELMAN, N.; GLANTSCHNIG, H.; ELLINGER, A.; PRINZ, D.; RUMPLER, M.; KLAUSHOFER, K. Triiodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3, by promoting apoptosis, **Journal of Endocrinology**, v. 160, p. 57-65, 1999.

VARGA, F.; RUMPLER, M.; LUEGMAYR, 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, **Calcified Tissue International**, v. 61, p. 404-411, 1997.

VARGA, F.; SPITZER, K.; 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, **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 30, p. 49-57, 2003.

VARGA, F.; SPITZER, K.; 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**, v. 74, n. 4, p.382-7, 2004.

VESTERGAARD, P.; MOSEKILDE, L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients, **Thyroid**, v. 12, p. 411-419, 2002.

VESTERGAARD, P.; WEEKE, J.; HOECK, H. C. Fractures in patients with primary idiopathic hypothyroidism, **Thyroid**, v. 10, p. 335-40, 2000.

WAGNER, R. L.; HUBER, R.; SHIAU, A. K.; KELLY, A.; LIMA, S. T. C.; SCANLAN, T. S.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; WEST, B. L.; FLETTERICK, R. J. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors, **Molecular Endocrinology**, v. 15 (3), p. 398-410, 2001.

WEINBERGER, C.; THOMPSON, C. C.; ONG, E. S.; LEBO, R.; GRUOL, D. J. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor, **Nature**, v. 324, p. 641-646, 1986.

WIKSTROM, L.; JOHANSSON, C.; SALTO, C.; BARLOW, C.; CAMPOS BARROS, A.; BAAS, F.; FORREST, D.; THOREN, P.; VENNSTROM, B. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1, **EMBO Journal**, v. 17, p. 455-461, 1998.

WILLIAMS, G. R.; BRENT, G. A. Thyroid Hormone Response Elements, **Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations**, chapter 15, p. 217-239, New York, 1995.

WILLIAMS, G.R.; BLAND, R.; SHEPPARD, M.C. Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling, **Endocrinology**, v. 135, n. 6, p.2375-2385, 1994.

WILLIAMS, G.R.; BLAND, R.; SHEPPARD, M.C. Retinoids Modify Regulation of Endogenous Gene Expression by Vitamin D₃ and Thyroid Hormone in Three Osteosarcoma Cell Lines, **Endocrinology**, v. 136, n. 10, p.4304-4314, 1995.

YOH, S. M.; PRIVALSKY, M. L. Transcriptional repression by thyroid hormone receptors. A role for receptor homodimers in the recruitment of SMRT corepressor, **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16857-16867, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)