

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**RENATA ARTIOLI MOREIRA**

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO T3  
TÓPICO SOBRE OS OSTEÓCITOS EM DEFEITOS  
ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS  
WISTAR**

BAURU  
2013

**RENATA ARTIOLI MOREIRA**

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO T3  
TÓPICO SOBRE OS OSTEÓCITOS EM DEFEITOS  
ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS  
WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
no centro de Ciências da Saúde aplicadas para  
obtenção do título de Cirurgiã Dentista, sob  
orientação da Profa. Dra. Solange de Oliveira  
Braga Franzolin. Co-orientadora: Profa. Dra.  
Patrícia Pinto Saraiva

Bauru  
2013

M838i	<p data-bbox="526 1310 802 1339">Moreira, Renata Artioli</p> <p data-bbox="526 1373 1284 1497">Influência do hormônio tireoideano T3 tópico sobre os osteócitos em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos Wistar / Renata Artioli Moreira -- 2013. 58f. : il.</p> <p data-bbox="581 1533 1211 1591">Orientadora: Profa. Dra. Solange de Oliveira Braga. Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.</p> <p data-bbox="526 1627 1284 1717">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="526 1753 1284 1812">1. Osteócitos. 2. Triiodotironina. 3. Tópico. I. Braga, Solange de Oliveira. II. Saraiva, Patrícia Pinto. III. Título.</p>
-------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**RENATA ARTIOLI MOREIRA**

**INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO T3 TÓPICO SOBRE OS  
OSTEÓCITOS EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE  
RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgiã Dentista sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Solange de Oliveira Braga Franzolin e co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Pinto Saraiva

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Solange de Oliveira Braga Frazolin  
Universidade do Sagrado Coração

---

Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva  
Universidade do Sagrado Coração

---

Profa. Dra. Pâmela Letícia dos Santos  
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 28 de novembro de 2013

Dedico este trabalho ao meu querido e inesquecível avô Elpídio Artioli, *in memoriam*, por sempre ter acreditado em mim, me incentivando na vida acadêmica com seu enorme carinho e entusiasmo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Lúcia Helena e Pedro Carlos, pela paciência e incentivo, por sempre acreditarem que eu era capaz e por todo amor que me deram que foram fundamentais para a concretização de mais este trabalho.

À minha irmã, Tatiana, que mesmo de longe, sempre esteve ao meu lado, contribuindo com seu conhecimento e me apoiando, durante todas as etapas.

Aos meus familiares, pelos conselhos carinhosos e palavras de estímulo.

Aos meus amigos, por todas as angústias, alegrias, tristezas, felicidades e tantas outras coisas que compartilhamos. Por estarem ao meu lado e me darem força.

Aos professores, por todos os ensinamentos, orientações acadêmicas, conversas, conselhos, pelo meu crescimento intelectual e pessoal, pela confiança e carinho.

As Professoras Dra. Solange de Oliveira Braga Frazolin e Dra Patrícia Pinto Saraíva, pela confiança e oportunidade de realizar este trabalho, que muito acrescentou no meu conhecimento.

E, especialmente a Deus, senhor da minha essência e sabedoria.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do hormônio tireoideano T3 tópico sobre os osteócitos, em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, aleatoriamente divididos em três grupos: controle (defeito ósseo preenchido com um placebo constituído por base de pomada), grupo tratado 1 (defeito ósseo preenchido com T3 em pomada, na concentração de 0,03%) e grupo tratado 2 (defeito ósseo preenchido com T3 em pomada, na concentração de 3%), analisados aos 30 e 60 dias (10 animais por grupo). Foram realizados defeitos ósseos críticos de 8mm na calota craniana dos animais, preenchidos por 0,35ml da pomada, e analisados nos períodos propostos. Foram realizadas análises histológicas, morfométricas e análise morfológica e contagem das lacunas de osteócitos. No período de 30 dias, o controle mostrou formação óssea de  $672,25 \pm 89,10\text{mm}^2$ , enquanto no grupo tratado com T3 a 0,03% ocorreu a maior formação de osso ( $1640,5 \pm 215,52\text{mm}^2$ ), estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Já o grupo tratado com 3% de T3 não foi diferente dos demais grupos ( $1006 \pm 302,72\text{mm}^2$ ) ( $p > 0,05$ ). Aos 60 dias, a formação óssea no grupo controle foi de  $927 \pm 81,5\text{mm}^2$ , enquanto no grupo tratado com T3 a 0,03% foi de  $1176,25 \pm 220,65\text{mm}^2$  ( $p > 0,05$ ). A formação de  $1065 \pm 13,29\text{mm}^2$  de osso no tratamento com T3 a 3% foi maior que o controle ( $p < 0,05$ ), mas semelhante ao tratamento com 0,03% de T3 ( $p > 0,05$ ). Aos 30 dias, em relação à quantidade de lacunas de osteócitos, o grupo tratado com T3 na concentração de 0,03% apresentou o maior número de lacunas de osteócitos presentes no osso neoformado ( $217,5 \pm 34,64\text{mm}^2$ ), estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) da quantidade de células observada no grupo controle ( $153,25 \pm 18,73\text{mm}^2$ ). Já aos 60 dias, a quantidade de lacunas de osteócitos observada nos diferentes tratamentos não foi estatisticamente diferente entre si ( $p > 0,05$ ). Aos 30 dias, em relação à morfologia dos osteócitos, o grupo tratado com T3 apresentou uma maior atividade destas células, com extensos canalículos e ampla rede de conexões. Concluiu-se que a pomada contendo T3, na concentração de 0,03%, auxilia o reparo ósseo no período de 30 dias, promovendo maior formação óssea. A ação do hormônio proporcionou um aumento no número e morfologia das lacunas dos osteócitos na mesma concentração e período em que foi observada maior formação óssea.

**Palavras-chave:** Osteócitos. Triiodotironina. Tópico.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of topic thyroid hormone (T3) on the osteocytes in calvarial critical bone defects in rats. We used 30 male Wistar rats were randomly divided into three groups: control (bone defect filled with a placebo consisting of base ointment), treated group 1 (bone defect filled with T3 in ointment at a concentration of 0.03%) and group 2 treated (bone defect filled with T3 in ointment at a concentration of 3%), tested at 30 and 60 days (10 animals per group). Critical bone defects were made in the skull 8mm animals, filled with 0.35 ml of ointment, and analyzed the periods proposed. We performed histological, morphometric and morphologic analysis of gaps and counting of osteocytes. At 30 days, the control showed bone formation  $672.25 \pm 89.10 \text{ mm}^2$ , whereas in the group treated with 0.03% of the T3 had the highest bone formation ( $1640.5 \pm 215.52 \text{ mm}^2$ ) statistically different ( $p < 0.05$ ). The group treated with 3% T3 was not different from the other groups ( $1006 \pm 302.72 \text{ mm}^2$ ) ( $p > 0.05$ ). At 60 days, bone formation in the control group was  $81.5 \pm 927 \text{ mm}^2$ , while the group treated with T3 was 0.03%  $1176.25 \pm 220.65 \text{ mm}^2$  ( $p > 0.05$ ). Formation of  $1065 \pm 13.29 \text{ mm}^2$  Bone treatment with T3 was 3% greater than the control ( $p < 0.05$ ), but similar treatment with 0.03% T3 ( $p > 0.05$ ). At 30 days, compared to the amount of gaps in osteocytes, the group treated with T3 at a concentration of 0.03% had the highest number of osteocytes present in the lacunae of bone formation ( $217.5 \pm 34.64 \text{ mm}^2$ ), statistically different ( $p < 0.05$ ) the number of cells observed in the control group ( $153.25 \pm 18.73 \text{ mm}^2$ ). At 60 days, the amount of gaps osteocytes observed in different treatments was not statistically different between groups ( $p > 0.05$ ). At 30 days, compared to the morphology of the osteocytes, the T3-treated group showed greater activity of these cells, with extensive canals and wide network of connections. It was concluded that the ointment containing T3 at a concentration of 0.03%, assists bone healing within 30 days, providing greater bone formation. The action of the hormone caused an increase in the number and morphology of osteocytes lacunae in the same concentration and period in which there was greater bone formation.

**Keywords:** Osteocytes. Triiodothyronine. Topical.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Preparo cirúrgico do animal .....	25
Figura 2 - Preparo do defeito crítico .....	26
Figura 3 - Retículo utilizado para a análise morfométrica do tecido ósseo neoformado.....	28
Figura 4 - Grupo controle aos 30 dias.....	30
Figura 5 - Grupo controle aos 60 dias.....	31
Figura 6 - Grupo T3 0,03% aos 30 dias.....	32
Figura 7 - Grupo T3 0,03% aos 60 dias.....	33
Figura 8 - Grupo T3 3% aos 30 dias.....	34
Figura 9 - Grupo T3 3% aos 60 dias.....	35
Figura 10 - Formação de tecido ósseo observada aos 30 dias, nos diferentes tratamentos.....	36
Figura 11 - Formação de tecido ósseo, em mm <sup>2</sup> , nos diferentes tratamentos, aos 60 dias de observação.....	37
Figura 12 - Comparação da formação óssea entre os períodos de 30 e 60 dias, nos diferentes tratamentos. *p<0,05.....	38
Figura 13 - Lacunas de osteócitos - Controle 30 dias.....	39
Figura 14 - Lacunas de osteócitos - Controle 60 dias.....	39
Figura 15 - Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 0,03% aos 30 dias ...	40
Figura 16 - Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 0,03% aos 60 dias.....	40
Figura 17 - Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 3% aos 30 dias.....	41
Figura 18 - Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 3% aos 60 dias.....	41
Figura 19 - Número de lacunas de osteócitos observados em cada tratamento, aos 30 dias .....	42
Figura 20 - Número de lacunas de osteócitos observados em cada tratamento, aos 60 dias .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de animais segundo grupo e ponto biológico.....	24
-------------------------------------------------------------------	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Morfofisiologia Óssea</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Remodelamento Osseo</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Hormônios Tireoidianos</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspectos Éticos</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Modelo Experimental</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3</b>	<b>Procedimento Cirúrgico</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4</b>	<b>Eutanásia</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Processamento das Peças</b> .....	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise Histológica</b> .....	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise Histomorfométrica</b> .....	<b>27</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise e contagem das lacunas de osteócitos</b> .....	<b>28</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise Histológica</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise Histomorfométrica</b> .....	<b>36</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise morfológica e contagem das lacunas de osteócitos</b> .....	<b>39</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Análise morfológica das lacunas de osteócitos</b> .....	<b>39</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Contagem das lacunas osteócitos</b> .....	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>56</b>
	<b>Anexo A</b> .....	<b>57</b>
	<b>Anexo B - Normas da revista submetida</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido metabolicamente ativo que está em constante renovação. Isso mantém sua integridade estrutural e a homeostasia mineral (RAISZ, 1999), ambas dependentes do equilíbrio entre os processos anabólico, de aposição, e catabólico, de reabsorção (KUJALA, 2003). Além disso, é um tecido multifuncional e constituído por três tipos celulares funcionais: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Diferentemente do que se encontrava na literatura na década de 70, onde as células mais importantes para a manutenção da viabilidade do tecido ósseo eram os osteoblastos e osteoclastos, atualmente trabalhos científicos ressaltam as funções e a importância dos osteócitos (Bonewald, 2011; Lin & Xu, 2011; Kerschnitzki et al., 2011).

De acordo com Knothe Tate et al. (2004), os osteócitos são as células mais abundantes encontradas no tecido ósseo maduro e supõe-se sua capacidade de mecano-transmissão, ou seja, modulação das atividades relacionadas ao remodelamento e ao *turnover* ósseo. Estudos recentes revelam a importância da viabilidade dos osteócitos na manutenção da saúde óssea, sendo que estes comandam onde e quando os osteoblastos e osteoclastos devem agir (NOBLE, 2008; BARBOSA, 2009). Estas células, assim como todo o tecido ósseo, sofrem a influência da dieta, dos estímulos físicos e de fatores genéticos, e, também são controladas por hormônios, fatores de crescimento, citocinas e pela intercomunicação celular (RAISZ, 1999; BLAND, 2000). O paratormônio (PTH), a calcitonina (CT) e a vitamina D são os principais reguladores da homeostasia mineral (AVIOLI, KRANE, 1998), enquanto o estrógeno, os andrógenos, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) influenciam o metabolismo ósseo, controlando, de forma diferenciada, a reabsorção e a aposição ósseas (HILLARD, STEVENSON, 1991; RAISZ, 1999; BLAND, 2000; PEPENE et al., 2001). Desta forma, os hormônios tireoidianos, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) exercem uma ampla variedade de efeitos no desenvolvimento, crescimento e metabolismo dos tecidos, incluindo o tecido ósseo, controlando o remodelamento e a homeostasia mineral de indivíduos adultos (WILLIAMS, ROBSON, SHALET, 1998).

Estudos com animais experimentais e estudos clínicos mostram que tanto a deficiência quanto o excesso de hormônios tireoidianos (HT) podem provocar efeitos importantes no esqueleto. Durante o desenvolvimento, a deficiência dos HT causa

atraso na maturação do esqueleto e digêneses das epífises, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas (ALLAIN, MCGREGOR, 1993). Por outro lado, o excesso de hormônio tireoidiano durante o desenvolvimento resulta em maturação esquelética acelerada, fechamento prematuro das placas de crescimento e subsequente diminuição do crescimento dos membros e do peso corporal (GOUVEIA, 2004).

Os HT também têm efeito no osso do adulto, sendo importantes para a manutenção do metabolismo ósseo, uma vez que estimulam tanto a formação quanto a reabsorção óssea, por regular a atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Uma série de estudos mostra que, em condições de excesso dos hormônios tireoidianos, a atividade dessas duas populações 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 da massa óssea (MOSEKILDE et al., 1977; GOUVEIA et al., 1997).

A presença de receptores nucleares nos osteoblastos, osteócitos (BILEZIKIAN, RAIKS, RODAN, 1996; HUANG et al., 2000; PEPENE et al., 2001) e osteoclastos (ABU et al., 1997; HUANG et al., 2000) sugere que a ação dos hormônios tireoidianos sobre o osso é direta, embora eles possam agir indiretamente, já que estimulam a síntese de fatores de crescimento, citocinas e outros hormônios (WEISS, REFETOFF, 1996; WILLIAMS, ROBSON, SHALET, 1998; KIM et al., 1999; HUANG et al., 2000). Além disso, existem também receptores para os hormônios tireoidianos nas células da medula óssea, precursoras da linhagem osteoblástica (SIDDIQI et al., 2002).

No entanto, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos envolvidos na ação catabólica dos hormônios tireoidianos sobre o osso. A deficiência dos hormônios tireoidianos reduz o metabolismo geral e afeta diretamente o recrutamento, a diferenciação, a maturação e o metabolismo das células responsáveis pela aposição, mineralização e reabsorção óssea (BURKHART, JOWSEY, 1967; JOWSEY, DETENBECK, 1969; MOSEKILDE, MELSEN, 1978; ERIKSEN, MOSEKILDE, MELSEN, 1986; BANOVA, KOREN, 2000).

A redução da aposição óssea, no hipotireoidismo, se dá por interferência direta (BURKHART & JOWSEY, 1967), já que T3 e T4 estimulam a expressão de genes nos osteoblastos para a produção de colágeno e osteocalcina (BILEZIKIAN,

RAIZS, RODAN,1996; VARGA et al., 1997; BLAND, 2000), importantes na aposição óssea (BILEZIKIAN, RAIZS, RODAN,1996; HUANG et al., 2000).

No hipertireoidismo, há estímulo tanto da aposição quanto da reabsorção óssea (JOWSEY, DETENBECK,1969; HUANG et al., 2000), mas a diminuição da massa óssea (MOSEKILDE, MELSEN,1978; BRITTO et al., 1994; AFFINITO et al., 1996; HUANG et al., 2000) advém da supremacia do processo catabólico frente ao anabólico (HUANG et al., 2000; SERAKIDES et al, 2001).

É conhecido que os hormônios tireoidianos direta ou indiretamente aceleram o *turnover* ósseo, encurtando o ciclo de remodelação, mas os mecanismos ainda não foram totalmente elucidados (GREENSPAN, GREENSPAN, 1999).

Embora os efeitos sistêmicos das modificações da concentração de T3 sobre o osso estejam bem estabelecidos, as consequências do emprego do T3 tópico em nível de osteócitos no reparo ósseo local ainda não é conhecido. Desta forma, nos propusemos a estudar a ação tópica do T3 em osteócitos, em defeitos ósseos em calvária de ratos *Wistar*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Morfofisiologia óssea

O osso é um tecido metabolicamente ativo, que está em constante renovação. É um dos mais resistentes e rígidos tecidos do corpo humano e desempenha funções importantes como suporte e local de inserção muscular para tração e locomoção; proteção para órgãos vitais e medula óssea e ainda atua como uma reserva de íons, especialmente cálcio e fósforo, participando da homeostase mineral (GRAAF, 2003; ROSEN et al., 2009).

Microscopicamente, como todo tecido conjuntivo, o tecido ósseo consiste de uma porção celular e de uma matriz extracelular (MEC). As principais células ósseas são as células osteoprogenitoras, que dão origem aos osteoblastos; os osteoblastos, responsáveis pela formação óssea; os osteócitos, encontrados embebidos na matriz extracelular; as células de revestimento ou de superfície, responsáveis pela proteção das superfícies ósseas e os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea (ROSEN et al., 2009).

As células osteoprogenitoras são derivadas de células mesenquimais que se diferenciam em células da linhagem osteoblástica (osteoblastos e células de revestimento). Adjacente aos osteoblastos, geralmente observa-se uma ou duas camadas de células mesenquimais e pré-osteoblásticas (GILBERT, 2006).

Os osteoblastos são encontrados sobre uma camada de matriz óssea não mineralizada, que está sendo produzida por eles mesmos. Essa camada é chamada de osteóide e reflete um período de tempo de aproximadamente 10 dias, entre a formação e a mineralização da matriz óssea (KUMAR et al., 2009).

A transformação de um osteoblasto para um osteócito aprisionado leva cerca de três dias. Durante este tempo, um osteoblasto produz um volume de matriz extracelular três vezes maior que seu próprio volume celular. No osteócito jovem, a estrutura das organelas é semelhante ao dos osteoblastos, embora o tamanho e número de organelas estejam diminuídos. Entretanto, estas células são maiores do que os osteócitos maduros e contêm numerosos ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos, que estão envolvidos na síntese de proteínas e mucopolissacárides (FRANZ-ODENDAAL, HALL, WITTEN,

2006). Durante a transformação do osteoblasto para o osteócito jovem, prolongamentos celulares são irradiados primeiramente para a área de mineralização da matriz. Esses prolongamentos são grossos e atuam como pseudópodes. Uma vez que a mineralização envolve a célula, processos celulares mais compridos e finos são observados. Neste momento, o metabolismo destas células se altera, param de sintetizar matriz óssea e passam a ser chamados osteócitos (DATTA et al., 2008).

Alguns estudos tem mostrado que, de acordo com o tipo de osso formado e a atividade dos osteoblastos envolvidos, osteócitos recém-formados podem adotar tamanho e morfologia variáveis em comparação com osteócitos maduros já incorporados à matriz (MAROTTI, MUGLIA, PALUMBO, 1994). Além disso, a morfologia dos osteócitos incorporados é dependente do tipo de osso. Osteócitos encontrados em osso trabecular são mais arredondados que osteócitos do osso cortical (CURREY, 2003), que possuem uma morfologia mais alongada (CURREY, 2003). Diferenças significativas na morfologia tridimensional dos osteócitos e suas lacunas foram recentemente reportados no osso cortical humano em diferentes patologias com várias densidades minerais ósseas (osteoartrite, osteopenias, e osteopetrose), assumindo que os osteócitos podem adquirir diferenças fenotípicas e adaptativas de acordo com diferentes tensões mecânicas externas (VAN HOVE et al, 2009).

Um osteócito é um osteoblasto maduro embebido na matriz óssea sendo que algumas das características pré-osteoblásticas e osteoblásticas permanecem detectáveis nestas células (osteopontina,  $\beta 3$  integrinas) (FRANZ-ODENDAAL, HALL, WITTEN, 2006). O estudo de diferentes marcadores (membrana, marcadores nucleares, citoplasmáticos), permite a caracterização dos osteócitos para determinar o seu estágio de maturação (osteócito jovem ou osteócito maduro) (FRANZ-ODENDAAL, HALL, WITTEN, 2006).

O osteócito é o tipo celular presente em maior número no tecido ósseo maduro, constituindo o principal componente celular dos ossos de mamíferos. Representam mais de 95% de todas as células ósseas (20.000 a 80.000 células/mm<sup>3</sup> de tecido ósseo), havendo cerca de 20 vezes mais osteócitos que osteoblastos em um osso, enquanto que os osteoblastos compreendem menos de 5%, e os osteoclastos menos de 1% (FRANZ-ODENDAAL, HALL, WITTEN, 2006). Osteoclastos e os osteoblastos são definidos pela função. Os osteoclastos são

células que reabsorvem osso e osteoblastos são células que formam osso. Já os osteócitos são definidos pela localização. Em contraste com os osteoblastos e osteoclastos que tem funções bem conhecidas, há uma falta de conhecimento sobre a função de osteócitos (VAN HOVE et al, 2009). Existem várias razões pelas quais a função dos osteócitos é muito menos conhecida comparada às funções de osteoblastos e osteoclastos. Estas razões incluem o seguinte: 1) o fato de que é difícil de isolar número suficiente de osteócitos da matriz óssea mineralizada, 2) é difícil manter a sua diferenciação *in vitro*. 3) há uma falta de linhas celulares adequadas, e 4) a indisponibilidade de osteócito-promotores específicos para abordagens transgênicas (VAN HOVE et al, 2009). A principal função conhecida dos osteócitos é traduzir sinais relacionados com a deformação mecânica em sinais bioquímicos entre os osteócitos e as células da superfície do osso (FRANZ-ODENDAAL, HALL, WITTEN, 2006; HEKIMSOY, 2008).

Os osteócitos estão dispersos por toda a matriz mineralizada, formando uma rede interligada de células que possuem a capacidade de detectar pressões mecânicas e cargas, formando uma única estrutura (EVIA, 2011). Cada osteócito tem em média 50 prolongamentos citoplasmáticos. Estes prolongamentos passam através do osso em finos "túneis" chamados canalículos. Estas células, em função das extensões citoplasmáticas localizadas no interior de canalículos ósseos, mantêm contato umas com as outras, com osteoblastos e com células de revestimento encontradas nas superfícies ósseas através de projeções intercanaliculares (KNOTHE TATE et al., 2004; CIVITELLI, 2008). A transformação de um osteoblasto poligonal para um osteócito dendrítico é impressionante e dramática, e requer ampla reorganização do citoesqueleto. Osteocitogenese e formação dendrítica são processos ativos que requerem clivagem de colágeno e outras moléculas da matriz.

Além disso, os prolongamentos dos osteócitos são capazes de perceber as oscilações do fluido intracanalicular e têm capacidade de aumentar ou diminuir as interconexões dependendo da carga mecânica (MANN et al., 2006). Esta variação mecânica estimula osteócitos para emitir sinais específicos para as células presentes na superfície do osso em resposta ao estímulo mecânico (BONEWALD, JOHNSON, 2008). O tecido ósseo é capaz de se adaptar continuamente a cargas mecânicas por adição de matriz óssea para melhorar a resistência a cargas

aumentadas ou por reabsorção óssea em resposta a uma diminuição no uso (TURNER et al, 1994).

Por muito tempo considerada simplesmente como uma célula no final da sua vida útil incorporada numa matriz mineral, o osteócito é atualmente visto como a célula central e iniciadora do processo de remodelação óssea (BONEWALD, 2007), pela coordenação tanto da atividade dos osteoblastos e osteoclastos, mas também como o iniciador do processo de remodelação óssea por sensibilidade local da deformação da matriz óssea. Embora seja amplamente aceito que o osteócito seja a célula responsável pela detecção da tensão mecânica, há um debate se o corpo celular ou seus prolongamentos citoplasmáticos sejam os principais responsáveis pela mecano-sensação (WANG et al, 2008; ADACHI et al, 2009).

Osteócitos morrem em consequência da senescência, degeneração, necrose, apoptose, e/ou imersão osteoclástica (KNOTHE TATE et al., 2004). A taxa de morte de osteócitos aumenta com a idade, de menos de 1% ao nascimento até 75% na oitava década. A apoptose do osteócito pode ocorrer por imobilização, microdanos, a falta de estrogênio, citocinas elevadas, tais como TNF- $\alpha$  como ocorre na menopausa, e no tratamento com glicocorticóides. Osteócitos danificados secretam receptor ativador do fator nuclear kB ligante (RANKL) e fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF), ativando a formação de células osteoclásticas (KNOTHE TATE et al., 2004).

Apesar de renovação óssea parecer ser um dueto entre osteoblastos e osteoclastos, tem sido entendido que as outras células são envolvidas nesta sinfonia celular da remodelação óssea, especialmente osteócitos que são os mais numerosos, os mais longevos e os mais importantes membros desta orquestra. (NOBLE, 2008). No entanto, perguntas não respondidas superam as respondidas. Responder a estas perguntas pode iluminar o caminho para novos métodos de tratamento no futuro.

O outro tipo de célula óssea, os osteoclastos, quando ativados, são responsáveis pela reabsorção óssea por osteoclasia (BOYLE, SIMONET, LACEY, 2003). Embora desempenhem suas funções em contiguidade com o osso, o osteoclastos não são células de linhagem óssea, pois tem origem mieloide, sendo derivados dos monócitos, assim como os macrófagos (DATTA et al., 2008). São células gigantes e multinucleadas, com cerca de 4 a 20 núcleos, que se caracterizam pela alta mobilidade e, como os osteoblastos, também são encontrados na

superfície óssea, na superfície das trabéculas e dos canais de Havers e no periósteo, alojados nas lacunas de *Howship*, que são consequência da sua própria atividade reabsortiva (AIRES, 2008).

Na fase de reabsorção, os osteoclastos ativados degradam tanto os componentes minerais quanto os orgânicos, pela secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e de colágeno. Os osteoclastos são estimulados por calcitriol, paratormônio (PTH), TNF, prostaglandina E2, além das IL-1, 11 e 6, e são inibidos por IL-4 e 13. O que encerra essa fase pode ser um elevado nível de cálcio intracelular ou substâncias liberadas pela própria matriz (BANDEIRA et al, 2000).

Atualmente, sabe-se que o metabolismo da osteoclastogênese é dependente dos osteoblastos e é regulada por três moléculas chave: osteoprotegerina (OPG), ligante do receptor ativador do NF-kB (RANKL) e o receptor ativador do NF-kB (RANK). RANKL é um membro da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF), sintetizado pelos osteoblastos, pelas células do estroma da medula óssea, pelos linfócitos T e por células endoteliais. Sua função consiste em, ao ligar-se ao RANK expresso nos precursores de osteoclastos, linfócitos T e células endoteliais, ativar os osteoclastos levando à formação de células multinucleadas (NAIDU et al., 2008). No tecido ósseo, PTH, glicocorticoides e prostaglandinas E2 aumentam a atividade do RANKL e reduzem a atividade da osteoprotegerina (OPG). Por outro lado, os efeitos do RANKL são bloqueados pela OPG, que age como um receptor antagonista de RANKL prevenindo a reabsorção óssea (NAIDU et al., 2008).

Após a reabsorção, os osteoclastos podem migrar para outros sítios onde o tecido ósseo deve ser reabsorvido, bem como se deslocar da superfície óssea e permanecer como células inativas. Os osteoclastos inativos são células gigantes, multinucleadas, porém não apresentam borda em escova e zona clara, estruturas intimamente relacionadas à atividade reabsortiva dos osteoclastos (FUKUSHIMA, BEKKER, GAY, 1991).

## **2.2. Remodelamento ósseo**

A integridade mecânica do tecido ósseo é mantida através de um processo denominado remodelamento ósseo que é uma ação contínua de reabsorção e formação que ocorre no esqueleto ao longo da vida em resposta a forças mecânicas

e a fatores do meio interno. No remodelamento ósseo, há um equilíbrio entre atividade celular de osteoclastos, que reabsorvem o tecido ósseo e osteoblastos, que o repõem. Para que o remodelamento ósseo ocorra, é necessário que haja uma contínua troca de sinais entre as diferentes populações de células ósseas, o que, por sua vez, irá garantir uma ação coordenada destas células. Estes sinais de diferenciação celular são proteínas localizadas nas superfícies dos osteoblastos e osteoclastos. A maior parte do remodelamento ocorre nas superfícies ósseas periósticas e endósticas (externas e internas, respectivamente), especialmente na última, que apresenta íntimo contato com a medula óssea. Essas superfícies são recobertas por células ósseas organizadas em camadas, constituindo, assim, o perióstio e o endóstio, respectivamente (ROSEN et al, 2009).

Estímulos sistêmicos (pelo PTH) ou locais (por tensão mecânica ou microfraturas) podem iniciar o processo de ativação da remodelação óssea. A liberação de hormônios e substâncias (PTH, 1,25-diidroxitamina D, IL1, IL2, IL6, TNF- $\alpha$ ) induzem o aumento na produção de RANK-L (ligante do receptor ativador do fator kB) pelos osteoblastos, que se ligam ao seu receptor RANK nas membranas das células hematopoiéticas precursoras, tornando os osteoclastos ativos. Sendo assim, os osteoblastos participam do processo de remodelação óssea, não somente produzindo matriz óssea, mas também controlando a atividade dos osteoclastos (ANDIA, CERRI, SPOLIDORIO, 2006). Substâncias inibidoras da reabsorção, tais como o estrogênio e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), estimulam a produção de osteoprotegerina (OPG), que é um inibidor de RANK, pois ela captura o RANK-L, impedindo sua ligação ao seu receptor, diminuindo, então, o número de osteoclastos ativos e induzindo a apoptose de osteoclastos maduros (ROBLING CASTILLO, TURNER, 2006). Finalmente, os osteoblastos ocupam o sítio de reabsorção e sintetizam a matriz extracelular (osteóide) a qual, após um período de amadurecimento, será mineralizada (KHAN, 2001; ROBLING CASTILLO, TURNER, 2006; PIVONKA et al., 2008).

### **2.3. Hormônios Tireoidianos**

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais de indivíduos jovens e têm efeito no osso adulto, sendo importantes para a manutenção do metabolismo ósseo, uma vez que estimulam

tanto a formação quanto a reabsorção óssea por regularem a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (VARGA, RUMPLER, KLAUSHOFER, 1994). O controle dos processos anabólicos e catabólicos do tecido ósseo são influenciados por fatores locais como citocinas, fatores de crescimento, estímulo mecânico, óxido nítrico, e comunicações intercelulares. Adicionalmente, o controle sistêmico é exercido pela ação de hormônios, como paratormônio, calcitonina, 1,25-diidroxivitamina D3, estrógeno, hormônio do crescimento, glicocorticoides, andrógenos e hormônios tireoidianos (RAISZ, 1999; BLAND, 2000).

Os hormônios tireoideanos são de suma importância durante a embriogênese (NUNES, 2003; INCERPI et al., 2005) e para o crescimento, diferenciação e controle do metabolismo de vários órgãos na vida pós-natal (GAUTHIER et al., 1999). São essenciais também para o crescimento e desenvolvimento normal de indivíduos jovens e afetam a remodelação óssea em adultos, além de influenciarem a formação e a reabsorção ossea in vivo e in vitro, por regularem tanto a atividade de osteoblastos como de osteoclastos (VARGA, RUMPLER, KLAUSHOFER, 1994).

A relação entre disfunção tireoidiana e perda óssea foi descrita pela primeira vez, há mais de cem anos, por Von Recklinghausen (1891). A atividade aumentada de osteoblastos e osteoclastos, no hipertireoidismo, levam a um aumento no *turnover* ósseo, o qual pode resultar em osteoporose. O hipotireoidismo, por sua vez, é associado com *turnover* ósseo reduzido e osteoesclerose, resultando em redução do crescimento e anormalidades esqueléticas (BLAND, 2000).

Alterações na morfologia óssea após indução de hiper e hipotireoidismo em ratos foram confirmadas por Balena et al. (1993), Allain et al. (1995) e Serakides et al. (2004).

Ongphiphadhanakul et al. (1992); Jenis et al (1994), demonstraram diminuição da densidade óssea mineral no fêmur de ratos tratados com T4, após vinte dias. Não houve alteração na densidade nas vértebras lombares. No fêmur ocorreu aumento significativo na *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), um marcador para osteoclastos; na histona H4, marcador de proliferação celular; e na fosfatase alcalina, marcador para osteoblastos.

Allain et al. (1995) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar mudanças ósseas histomorfométricas após indução de hiper e hipotireoidismo em ratos. Animais com hipertireoidismo mostraram um aumento nas taxas de aposição e formação de tecido mineralizado e discreto aumento no número de superfícies com

erosão, de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, sem disfunção tireoidiana. Nos ratos com hipotireoidismo, houve marcante redução nas superfícies osteóides, nas superfícies com erosão e aumento no volume de osso medular.

Suwanwalaikorn et al. (1996), após tratamento dos animais com T4 por vinte semanas, confirmaram a diminuição da densidade mineral óssea no fêmur e a ausência de alterações nas vértebras. Os autores observaram o aumento da expressão de osteocalcina e osteopontina, marcadores da atividade de osteoblastos.

Serakides et al. (2004) caracterizaram radiográfica e histologicamente as alterações ósseas em ratas castradas e não-castradas, com ou sem indução de hipertireoidismo. O hipertireoidismo isoladamente, nas ratas não castradas, levou à alteração da morfologia do osso, variável ao longo do período experimental. Quando associado à castração, o hipertireoidismo promoveu uma perda óssea dez vezes mais extensa, aos noventa dias.

Por causa dos sintomas pronunciados, o hipertireoidismo em humanos em geral é tratado previamente ao aparecimento de sintomas esqueléticos (MOSEKILDE, ERIKSEN, CHARLES, 1990). Portanto, em humanos resta a dúvida quanto à possibilidade da terapia de reposição com T4, a qual resulta em concentrações do hormônio superiores àquelas normalmente encontradas no soro de indivíduos eutireóides, serem capaz de alterar a fisiologia óssea (ROSS, 1994).

Os hormônios tireoidianos atuam influenciando a proliferação e a diferenciação de pré-osteoblastos (VARGA et al., 1997). Estudos *in vitro* demonstraram que o T3 diminui a proliferação de osteoblastos MC3T3-E1 (VARGA, RUMPLER, KLAUSHOFER, 1994; FRATZL-ZELMAN et al., 1997) e aumenta a atividade de síntese de osteoblastos maduros (OHISHI et al., 1994). Em elevadas concentrações (100nM) o T3 inibe a proliferação e em baixas concentrações, estimula a proliferação dos pré-osteoblastos (KLAUSHOFER et al., 1995). Além disso, T3 nas doses de  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$ M, diminuiu a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos da calvaria de ratos (OHISHI et al., 1994), e na dose de  $10^{-7}$  M estimulou a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos MC3T3-E1 (FRATZL-ZELMAN et al., 1997; VARGA et al., 1997), o que demonstra mais uma vez o efeito dose dependente do T3.

Apesar de vários autores terem avaliado a aplicação tópica de doses suprafisiológicas de T3 em feridas de pele e observado um melhor fechamento das

mesmas nos animais que receberam o tratamento (SAFER et al., 2003; TARAMESHLOO et al., 2012), pouco se sabe sobre a influência deste hormônio, aplicado topicamente, no processo de cicatrização óssea, e o comportamento do osteócitos frente a esta reparação. Portanto, estudos são necessários para avaliar esta forma de aplicação do hormônio, em defeitos ósseos. Não há dados na literatura dos efeitos do T3 aplicado topicamente em defeitos ósseos, nem da ação deste hormônio sobre os osteócitos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a influência do hormônio tireoidiano T3 tópico, em diferentes concentrações, sobre a formação óssea e sobre os osteócitos, em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos *Wistar*.

#### **3.2 Objetivo específico**

Verificar a quantidade e morfologia da formação de lacunas de osteócitos e de seus canalículos frente a aplicação tópica do hormônio tireoidiano T3, em defeitos ósseos críticos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi realizado seguindo os princípios éticos de experimentação animal, em conformidade ao SBCAL/COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERNANN, 1983). Recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (FOB-USP) sob o protocolo de número 011/2012, conforme Anexo I.

### 4.2 Modelo Experimental

Para o presente trabalho foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, adultos, com peso entre 450 e 500 gramas. Os animais foram fornecidos, criados, operados e mantidos em observação no pós-operatório no Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG. Para este estudo, os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). Os animais foram mantidos durante todo o período experimental em gaiolas identificadas e autoclavadas, forradas com cama de maravalha de pinus trocada diariamente, alimentados com ração sólida Labina (Purina, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

Os 30 animais foram distribuídos para a composição de três grupos, contendo 10 animais cada, e avaliados nos pontos biológicos de 30 e 60 dias (tabela 1):

- Grupo controle: o defeito ósseo foi preenchido com um placebo constituído pela base da pomada, sem o hormônio;
- Grupo tratado 1 (T3 0,03%): o defeito ósseo foi preenchido com o hormônio T3 (3,3',5 Triiodothyronine (T3) - Sigma-Aldrich), na forma farmacêutica de pomada, na concentração de 0,03% (SARAIVA et al., 2008);
- Grupo tratado 2 (T3 3%): o defeito ósseo foi preenchido com o hormônio T3 (3,3',5 Triiodothyronine (T3) - Sigma-Aldrich), na forma farmacêutica de pomada, na concentração de 3% (SARAIVA et al., 2008).

Grupo/Período	Controle	Tratado 1	Tratado 2	total
30 dias	5	5	5	15
60 dias	5	5	5	15
Total	10	10	10	30

Tabela 1 - Número de animais segundo grupo e ponto biológico.

### 4.3 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeções intramusculares de cloridrato de quetamina a 10% (Cetamin - Laboratório Syntec, São Paulo, Brasil) na proporção de 70mg/kg de peso, enquanto a analgesia e a sedação foram realizadas com injeções, também, intramusculares de cloridrato de xilazina a 2% (Dopaser - Laboratório Hertape Calier, Barcelona, Espanha), na proporção de 6mg/kg de massa corpórea (figura 1).

Inicialmente foi realizada tricotomia na região fronto-parietal da calvária dos animais, e após, antissepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Rio Química, SP, Brasil) (figura 1). A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15 (Bencton Dickinson), foi realizada uma incisão em “U”, na calvária do rato, seguida de divulsão, com tesoura (Duflex) de ponta reta e romba. A incisão atingiu o periósteo, permitindo o deslocamento de um retalho de espessura total em direção posterior, expondo amplamente a cortical óssea da região.

O defeito crítico transfixado foi realizado com broca trefina de 8mm de diâmetro (3i) (Nobel Biocare®, Gothenburg, Sweden), montada em contra-ângulo (Dabi Atlante – São Paulo, Brasil) com redução de 1:16, acoplado a um motor cirúrgico, (Driller BLM 600 Plus – São Paulo, Brasil) de 1500 rpm, sob irrigação constante e abundante com soro fisiológico estéril (figura 2). O defeito ósseo de aproximadamente de 1mm de espessura incluiu uma porção da sutura sagital. A dura-mater foi mantida íntegra. Marcações em formato de “L” foram feitas a 2mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico. O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividiu o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram feitas com uma broca carbide tronco-cônica, sob irrigação contínua com solução salina estéril e, posteriormente,

preenchidas com amálgama de prata (MESSORA, 2005). Estas marcações foram úteis para a identificação do centro do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial, permitindo localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histológica (figura 2).

Nos animais do grupo controle, o defeito cirúrgico foi preenchido com 0,35ml da base utilizada para o preparo da pomada. Nos animais do grupo tratado, o defeito cirúrgico foi preenchido com 0,35ml da pomada de T3, nas duas concentrações propostas. Depois de preenchidos os defeitos, os tecidos moles foram reposicionados, e realizadas suturas interrompidas simples com de fio de seda preto nº 3-0 (Ethicon – Johnson & Johnson). Cada animal recebeu uma injeção intramuscular de 24.000 unidades de Penicilina G-benzatina, um pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte.

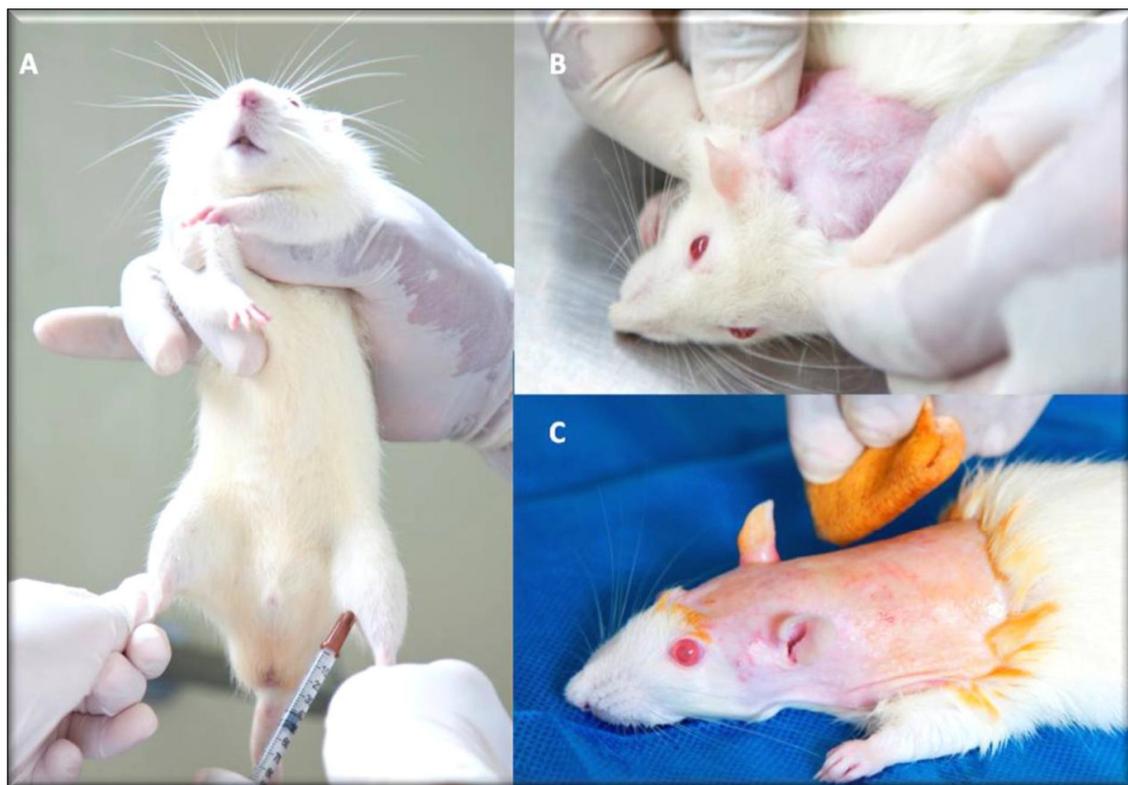


Figura 1 – Preparo cirúrgico do animal. Anestesia com cloridrato de quetamina a 10% e analgesia e sedação com cloridrato de xilazina com injeção intramuscular (A); tricotomia da área cirúrgica (B); antissepsia com solução de PVPI (C).

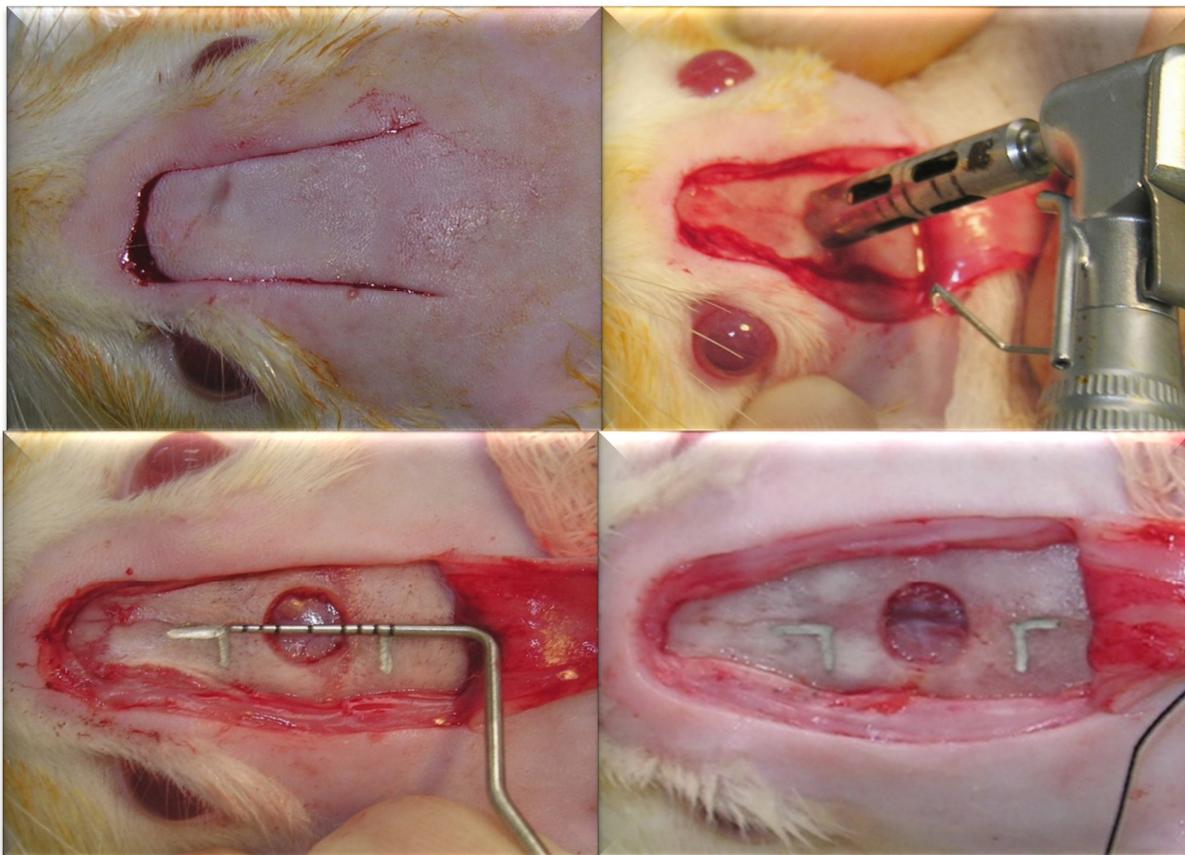


Figura 2 – Preparo do defeito cirúrgico. Retalho para acesso ao perióstio (A); confecção do defeito crítico com fresa trefina (B); Marcações em formato de “L” feitas a 2mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico (C); defeito crítico com 8,0mm de diâmetro (D).

#### 4.4 Eutanásia

Nos tempos biológicos pré-determinados (30 e 60 dias), os animais sofreram eutanásia por inalação excessiva de CO<sub>2</sub>, método aceito e recomendado pelo SBCAL-COBEA.

#### 4.5 Processamento das peças

As peças obtidas a partir do procedimento cirúrgico foram fixadas em formol neutro a 10%, lavadas em água corrente por 48 horas e descalcificadas em solução

de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 10%. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, usando-se os maiores eixos de cada marcação de amálgama com formato de “L” como referência. As peças foram processadas e incluídas em parafina. Realizaram-se cortes seriados no sentido longitudinal da peça com 6µm de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico. Os cortes foram corados pelas técnicas da Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Goldner para análise com microscopia de luz. Para a análise das lacunas dos osteócitos em microscopia de luz, utilizou-se a impregnação por nitrato de prata (OCARINO et al., 2006).

#### **4.6 Análise Histológica**

A avaliação morfológica qualitativa foi realizada no Laboratório de Histologia da Universidade Sagrado Coração (USC), Bauru-SP. Os cortes histológicos corados por HE e Tricrômico de Goldner e impregnados por nitrato de prata foram avaliados qualitativamente em microscopia ótica, considerando as regiões de margem e central, e padrão de reparação óssea, como formação de tecido de granulação, infiltrado inflamatório, formação de tecido ósseo primário e maturação óssea. Para a maturação óssea também foi observada a quantidade e morfologia das lacunas de osteócitos e de suas conexões.

#### **4.7 Análise Histomorfométrica**

As análises histológicas e histomorfométricas foram realizadas por um único examinador, em esquema cego, para o tipo de tratamento realizado. Imagens das características estruturais do tecido ósseo foram obtidas utilizando microscopia óptica de luz (Microscópio Nikon, Eclipse 80i. Japão), com aumento de 40 vezes. Medidas dos parâmetros morfométricos foram realizadas usando o software Image PRO PLUS para Windows 5.0 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA).

Para esta análise, empregou-se a metodologia por contagem de pontos (GUNDERSEN et al., 1988). A imagem capturada em uma resolução de 300 dpi foi observada no Programa Microsoft Office Power Point®. O retículo foi posicionado

sobre a imagem (figura 3) e a realização da contagem se deu por meio do aplicativo Image PRO PLUS para Windows 5.0, considerando-se que cada traço tem 9mm de largura e espaçamento de 9mm entre cada ponto. Após a contagem foi realizado o cálculo da área de formação óssea. Foram avaliados 3 campos para cada corte histológico, sendo dois deles adquiridos nas margens do defeito ósseo e um centralmente ao defeito.

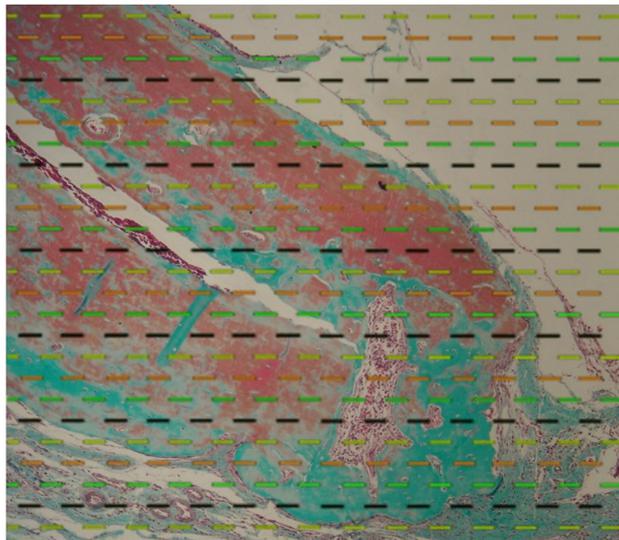


Figura 3 - Retículo utilizado para a análise morfométrica do tecido ósseo neoformado

#### 4.8 Análise e contagem das lacunas dos osteócitos

Após completa descalcificação, a peça foi processada pela técnica de inclusão em parafina e submetida a impregnação pela prata para visualização das conexões entre os osteócitos. Para esta coloração foi realizado cortes histológicos de 4 $\mu$ m desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico por 5 minutos em cada álcool (álcool absoluto a 90%, 80%, 70%). A hidratação foi concluída com imersão das lâminas em água milli-Q por 10 minutos. Para a impregnação foram utilizadas duas soluções distintas. A primeira, composta por solução aquosa de nitrato de prata a 50% armazenada em frasco âmbar e em geladeira, e a segunda, por solução de ácido fórmico a 1% com 2% de gelatina microbiológica incolor. Em cada corte histológico foram adicionadas as soluções 1 e

2 na proporção de 1:1. Em seguida as lâminas foram incubadas a 40°C em câmara úmida por 20 minutos. Após a impregnação, as lâminas foram lavadas em água milli-Q por 10 minutos, desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico absoluto (70%, 80%, 90%) por 5 minutos em cada concentração e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá natural (OCARINO et al., 2006).

A análise foi realizada por um avaliador em esquema cego, a partir de imagens registradas em microscópio Nikon Eclipse (Nikon, Japão). Foram analisados três campos de cada espécime (extremidades e área central), em aumento de 40x.

#### **4.9. Análise Estatística**

A análise estatística dos dados da histomorfometria do tecido ósseo e da análise da contagem de lacunas de osteócitos foi realizada pelo software GraphPad InStat 3. A análise intergrupo foi realizada pelo teste não pareado de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn. A análise dentro do mesmo grupo de tratamento e diferentes tempos foi realizada pelo Teste T não pareado, corrigido pelo Teste de Welch. O nível de probabilidade de erro foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Histológica

Aos 30 dias, no grupo controle, notam-se regiões de encapsulamento de material, rodeadas pela formação de tecido ósseo em neoformação. A matriz formada apresenta-se revestida por uma camada de osteoblastos, e existe a presença de linhas de reversão, indicando atividade de remodelamento tecidual (figura 4).

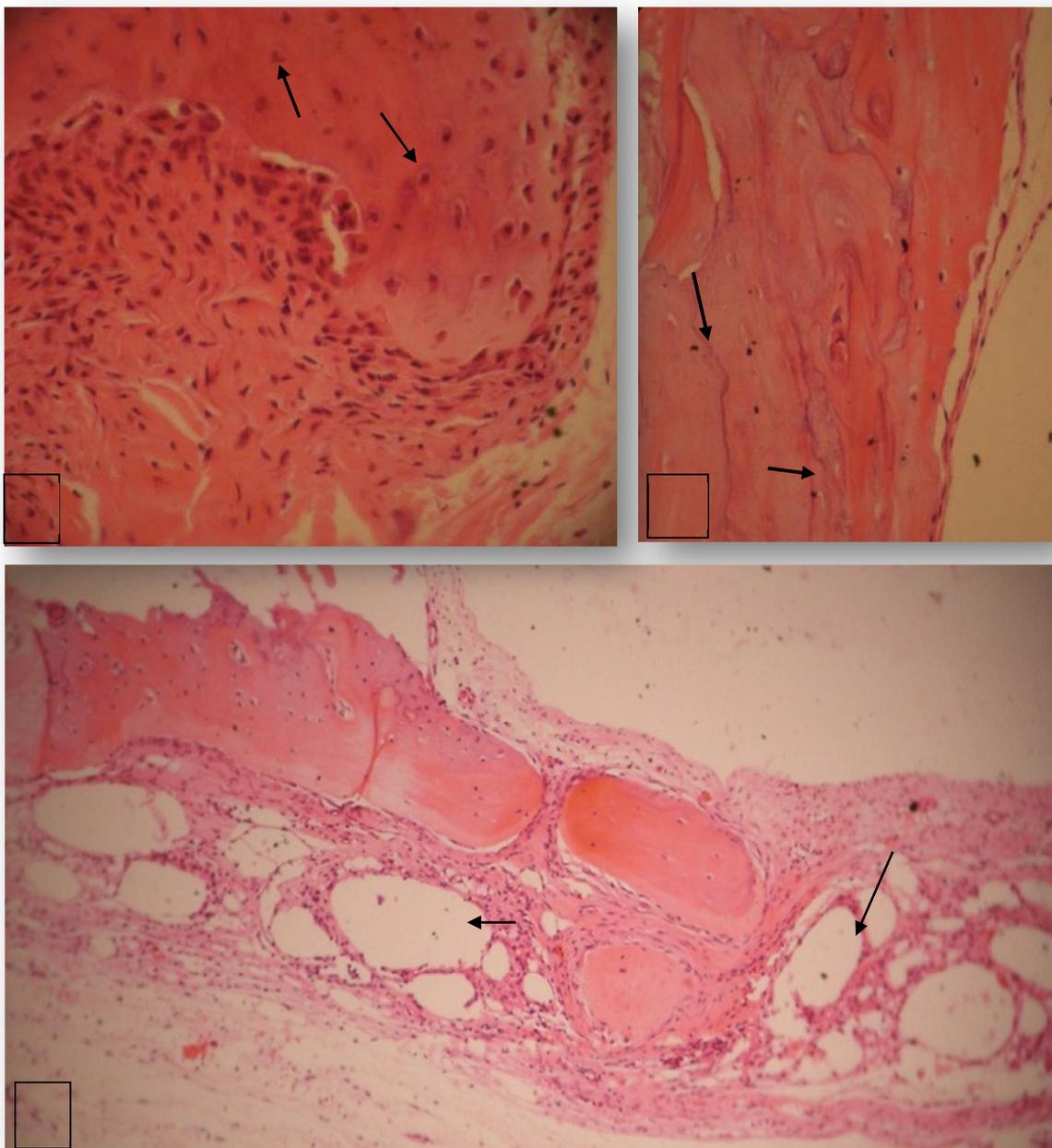


Figura 4 - Grupo controle aos 30 dias. Em A, presença de osteócitos (setas) espalhados pela matriz óssea (\*); B - Presença de linhas de reversão (setas) na matriz óssea (\*); C- Tecido ósseo neoformado (\*) e a presença de material encapsulado (setas). HE, aumento de 40x em A e B e 10x em C.

Aos 60 dias, o grupo controle continua apresentando linhas de reversão e presença de osteoblastos recobrimo a matriz óssea. Ainda são observadas regiões de material encapsulado (figura 5).

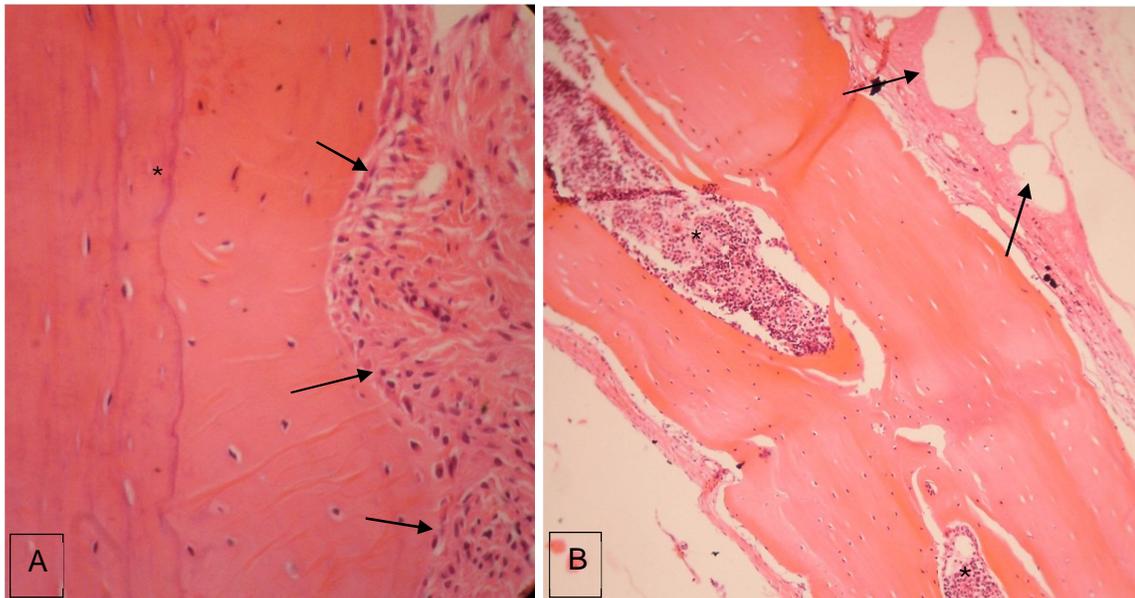


Figura 5 – Grupo controle aos 60 dias. Em A presença de linhas de reversão (\*) na matriz óssea, e margeando a matriz, uma camada de células osteoblásticas (setas). Em B, regiões medulares (\*) e permanência de pequenas regiões de material encapsulado (setas). HE, aumento de 40x e 10x, respectivamente.

Aos 30 dias, no grupo tratado com T3 em uma concentração de 0,03% também é observado o material encapsulado por uma camada fina de tecido conjuntivo, rodeado por um infiltrado inflamatório. A matriz apresenta-se organizada, com a formação de canais de Havers e ainda nota-se a presença de linhas de reversão (figura 6).

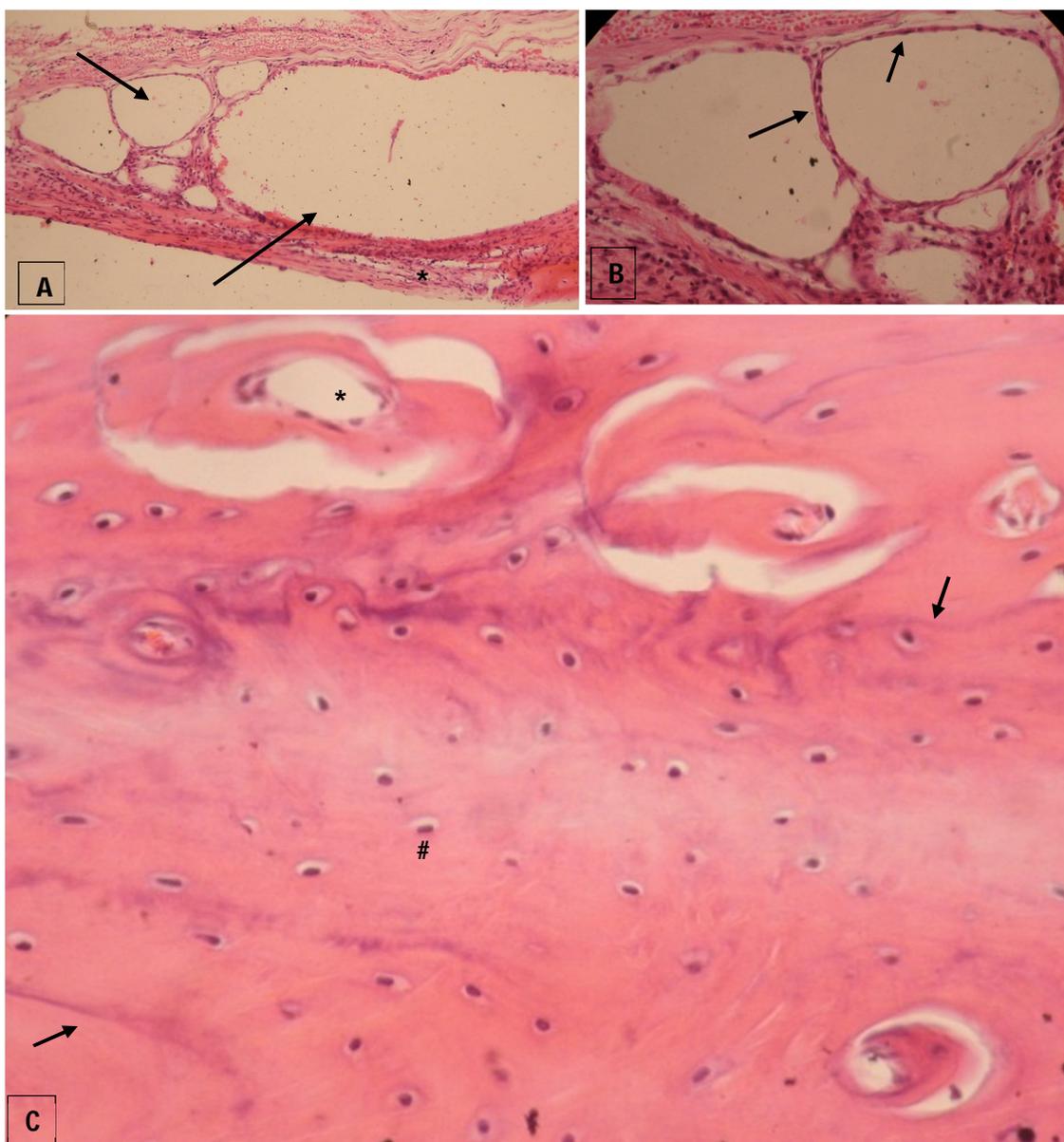


Figura 6 - Grupo T3 0,03% aos 30 dias. Em A, presença de várias áreas encapsuladas na região central do defeito (setas), rodeadas por infiltrado inflamatório (\*); B - As regiões de encapsulamento são delimitadas por uma fina camada de tecido conjuntivo (setas); C - matriz óssea apresentando linhas de reversão (setas), presença de osteócitos espalhados pela matriz (#) e a formação dos canais de Havers (\*). HE, aumento de 10x em A e 40x em B e C.

Aos 60 dias de tratamento com T3 a 0,03% observa-se uma diminuição em número e tamanho das regiões de encapsulamento, dando lugar a um tecido ósseo em neoformação. A matriz óssea apresenta-se organizada, com presença de fracas linhas de reversão (figura 7).

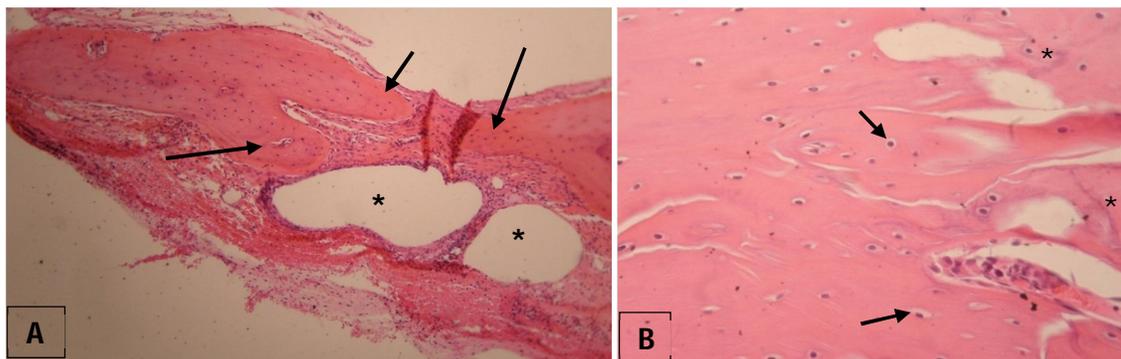


Figura 7 - Grupo T3 0,03% aos 60 dias. Em A presença de matriz óssea em formação (setas) e áreas de material encapsulado (\*); B- Presença de osteócitos espalhados pela matriz óssea (setas) e linhas de reversão (\*). HE, aumento de 10x e 40x, respectivamente.

O grupo tratado com T3 a 3% apresentou aos 30 dias, a mesma área de encapsulamento e observa-se a presença de células gigantes na área de infiltrado inflamatório. A matriz óssea é revestida por uma camada de osteoblastos (figura 8).

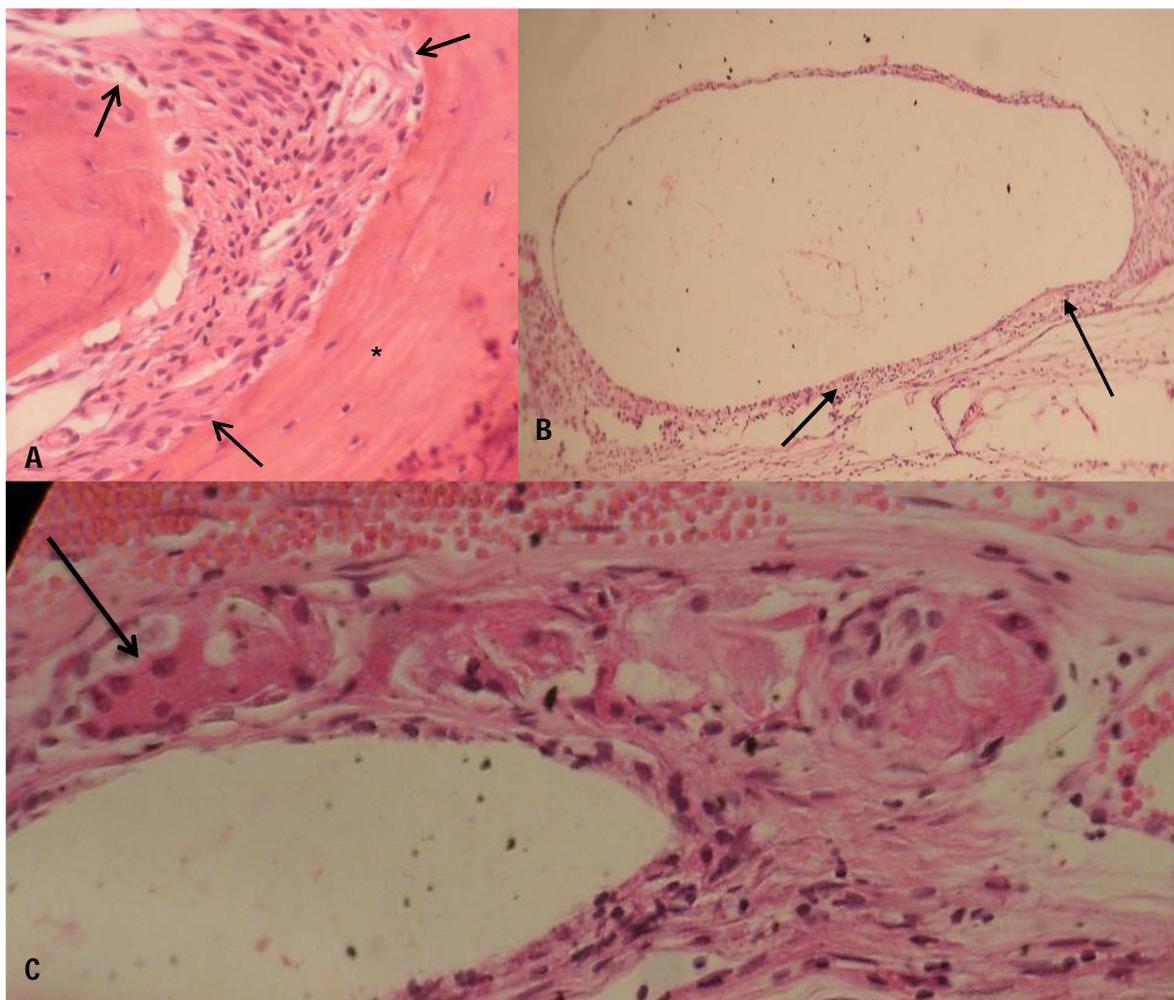


Figura 8 - Grupo T3 3% aos 30 dias. Em A há a presença de matriz óssea revestida por uma camada de osteoblastos (setas) e osteócitos espalhados (\*); B - Região de encapsulamento de material (setas); C- Em algumas áreas é possível observar a presença de células gigantes (setas). HE, aumento de 40x em A e C, e 4x em B.

Aos 60 dias, o tratamento com T3 a 3% mostra uma matriz óssea com intensas linhas de reversão e formação de canais de Havers. Também é notada a presença de material encapsulado, rodeado por um infiltrado inflamatório intenso, com a presença de células gigantes (figura 9).

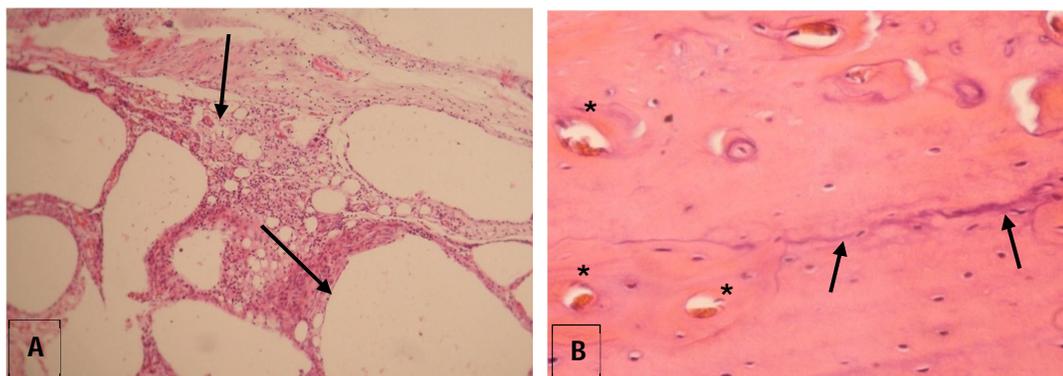


Figura 9 - Grupo T3 3% aos 60 dias. Em A, formação de regiões encapsuladas (setas); B - presença de linhas de reversão (setas) e a formação de canais de Havers (\*). HE, aumento de 10x em A e 40x em B.

## 5.2 Análise Histomorfométrica

Os resultados do presente estudo mostram que, no período de 30 dias, no grupo controle foi identificada uma formação óssea de  $672,25 \pm 89,10\text{mm}^2$ , enquanto no grupo tratado com uma concentração de 0,03% de T3 ocorreu a maior formação de tecido ósseo ( $1640,5 \pm 215,52\text{mm}^2$ ), sendo estatisticamente diferente em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Já o grupo tratado com 3% de T3 não apresentou diferença estatística dos demais grupos (formação de  $1006 \pm 302,72\text{mm}^2$  de tecido ósseo) (Figura 10).

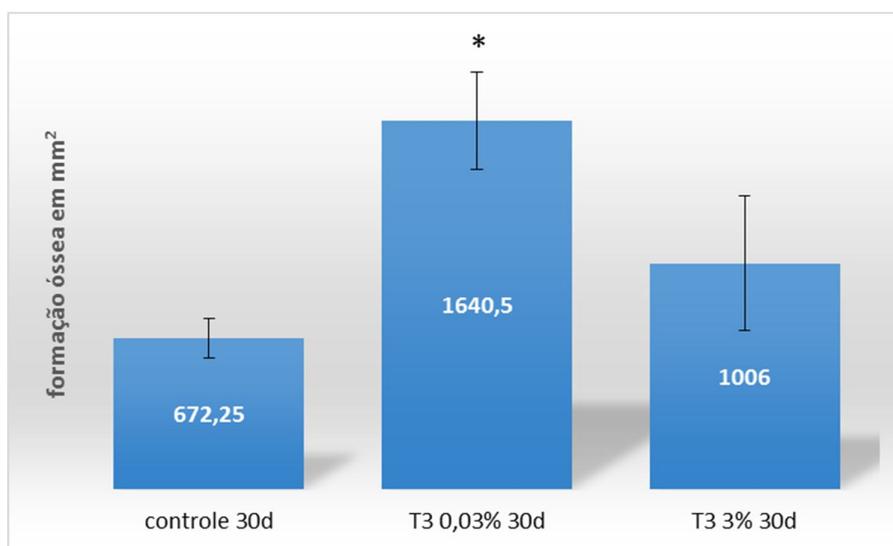


Figura 10: Formação de tecido ósseo, em  $\text{mm}^2$ , observada aos 30 dias, nos diferentes tratamentos. \* $p < 0,05$ .

Aos 60 dias, observou-se uma formação óssea de  $927 \pm 81,5\text{mm}^2$  no grupo controle, enquanto o grupo tratado com T3 a 0,03% continuou apresentando a maior formação de osso ( $1176,25 \pm 220,65 \text{mm}^2$ ), embora não tenha sido diferente estatisticamente dos demais grupos. A formação de  $1065 \pm 13,29\text{mm}^2$  de osso formado no grupo tratado com T3 a 3% foi estatisticamente maior que o controle, mas não mostrou diferença do tratamento realizado com 0,03% de T3 (Figura 11).

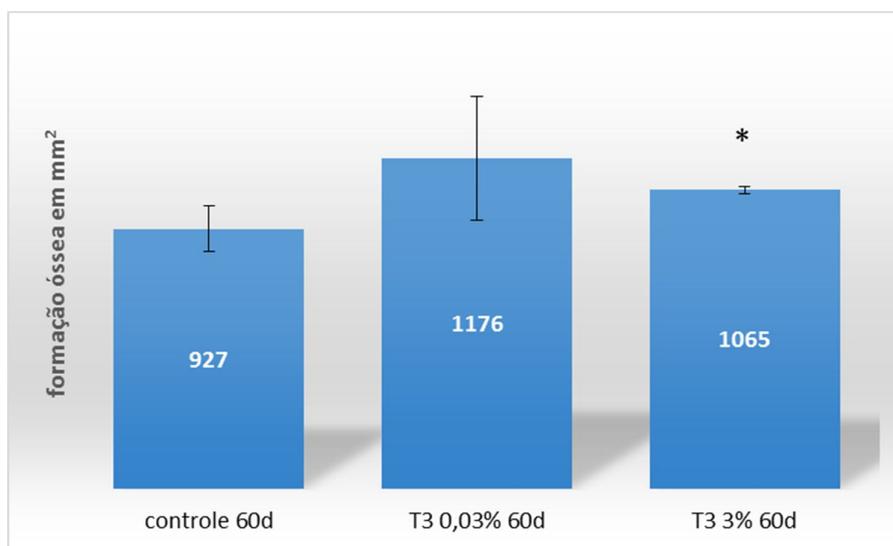


Figura 11 – Formação de tecido ósseo, em  $\text{mm}^2$ , nos diferentes tratamentos, aos 60 dias de observação. \* $p < 0,05$ .

A comparação entre a formação óssea no grupo controle, entre os períodos de 30 e 60 dias foi estatisticamente significativa ( $p=0,0022$ ). O mesmo ocorreu quando comparamos os períodos no grupo tratado com 0,03% de T3 ( $p=0,01$ ). Já a comparação dos períodos na concentração de T3 a 3% não apresentou significância ( $p>0,05$ ) (Figura 12)

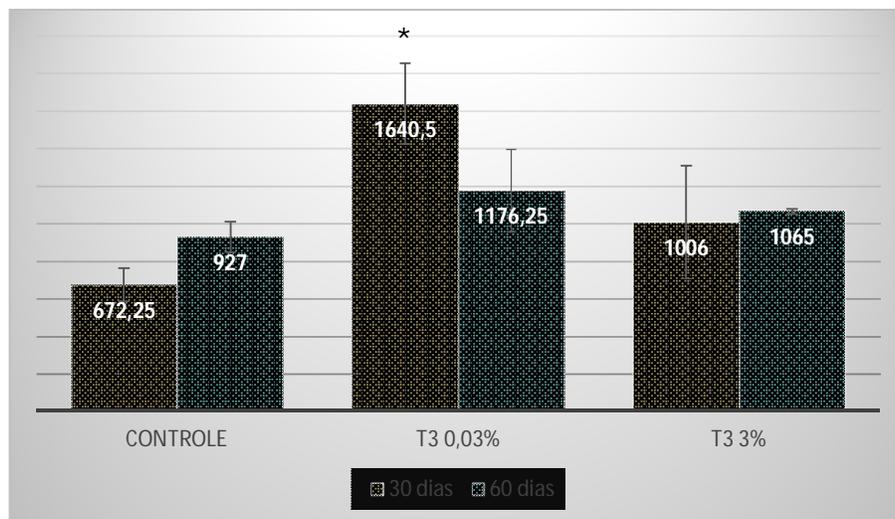


Figura 12 - Comparação da formação de tecido ósseo, em mm<sup>2</sup>, entre os períodos de 30 e 60 dias, nos diferentes tratamentos. \* $p<0,05$ .

## 6.3 Análise morfológica e contagem das lacunas dos osteócitos

### 6.3.1 Análise morfológica das lacunas dos osteócitos

#### Grupo Controle

No grupo controle, tanto aos 30 como aos 60 dias observaram-se lacunas com bordas bem delimitadas, e em sua maioria, com formato ovalado. Aos 30 dias, a presença de canalículos dos prolongamentos dos osteócitos foram em maior número, formando uma rede de conexões (Figura 15). Aos 60 dias pareceu haver uma diminuição da amplitude dos prolongamentos, diminuindo, assim, as conexões entre as células (Figura 16).

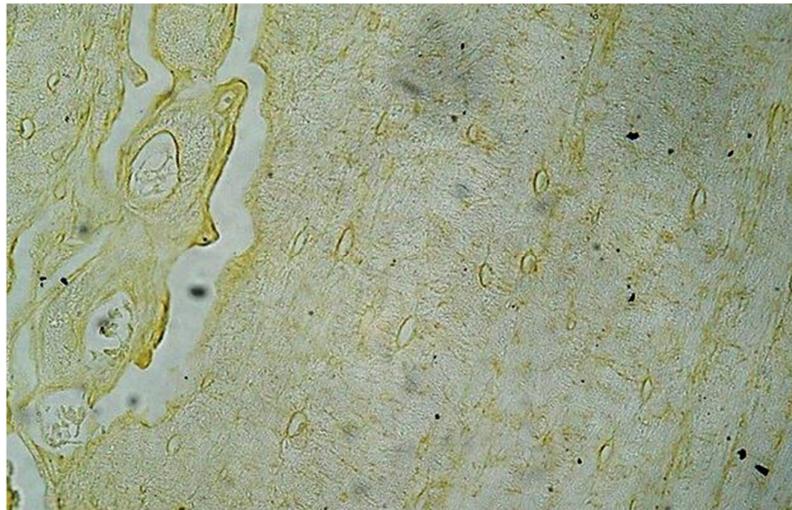


Figura 15 – Lacunas de osteócitos - controle 30 dias. Nitrato de Prata, aumento de 40x

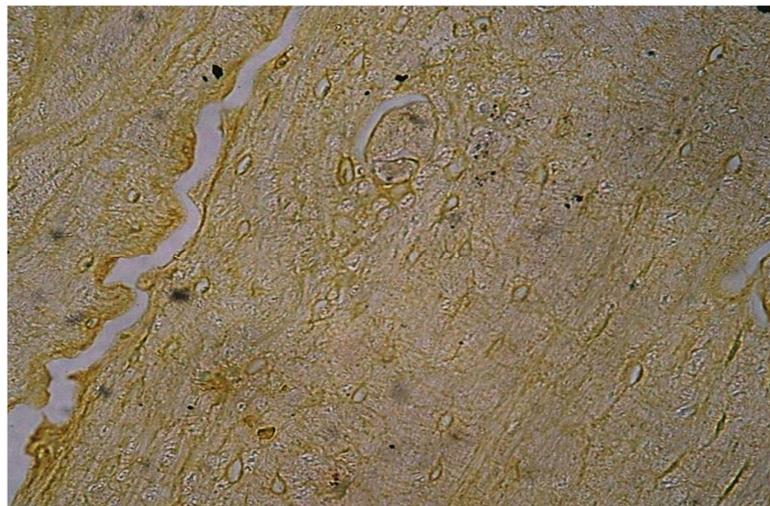


Figura 16 – Lacunas de osteócitos - controle 60 dias. Nitrato de Prata, aumento de 40x

### Grupo tratado com T3 a 0,03%

Aos 30 dias, no grupo tratado com T3 a 0,03% foram notadas lacunas bem delimitadas, das quais se projeta uma grande quantidade de canalículos, estabelecendo uma ampla conexão entre as células (Figura 17). Aos 60 dias as lacunas continuaram bem delimitadas, mas a quantidade de canalículos pareceu diminuir tornando-se semelhante às observadas no grupo controle aos 60 dias (Figura 18).

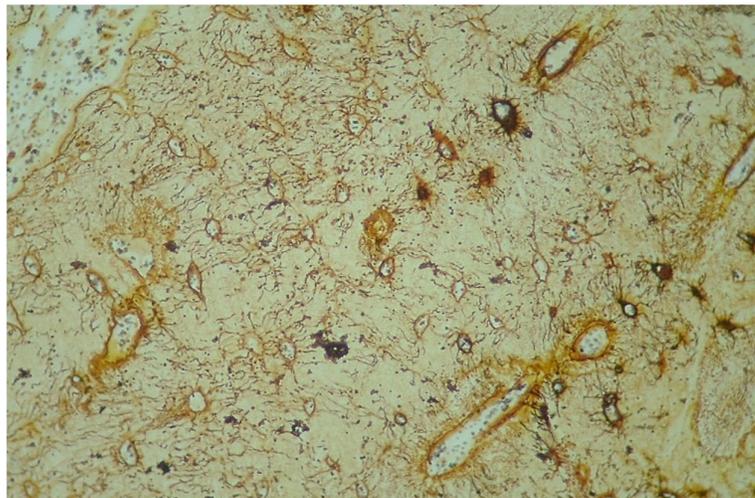


Figura 18 – Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 0,03% aos 60 dias. Nitrato de Prata, aumento de 40x

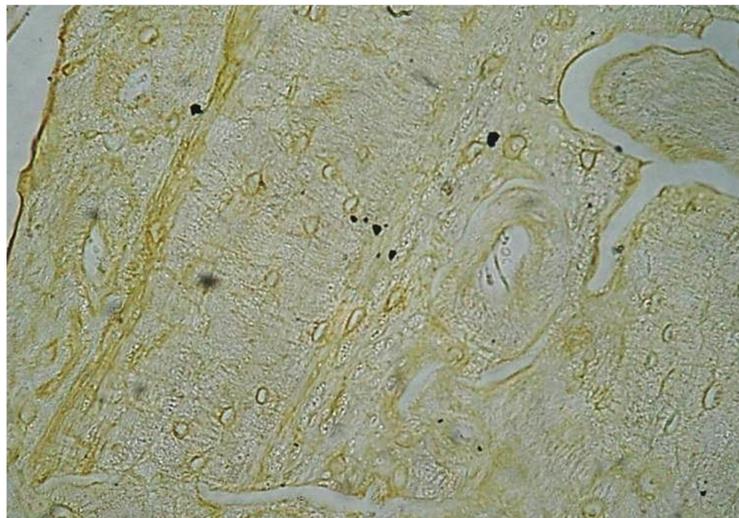


Figura 18 – Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 0,03% aos 60 dias. Nitrato de Prata, aumento de 40x

### Grupo tratado com T3 a 3%

Aos 30 dias, o grupo tratado com T3 a 3% apresentou lacunas com formato mais circular, mantendo as bordas definidas, mas com menor número de prolongamentos (Figura 19). Aos 60 dias as lacunas apresentaram-se amplas, com formato mais ovalado, e a presença de maior quantidade de canalículos de prolongamentos do que os observados aos 30 dias com este tratamento (Figura 20).

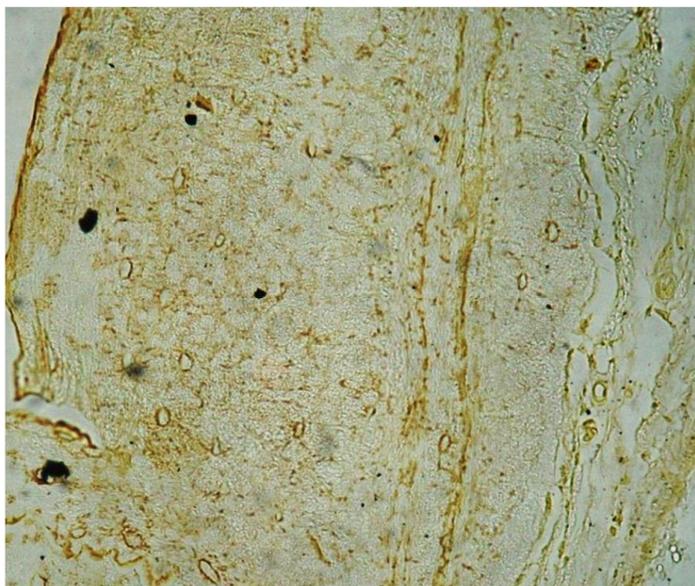


Figura 19 – Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 3% aos 30 dias. Nitrato de Prata, aumento de 40x

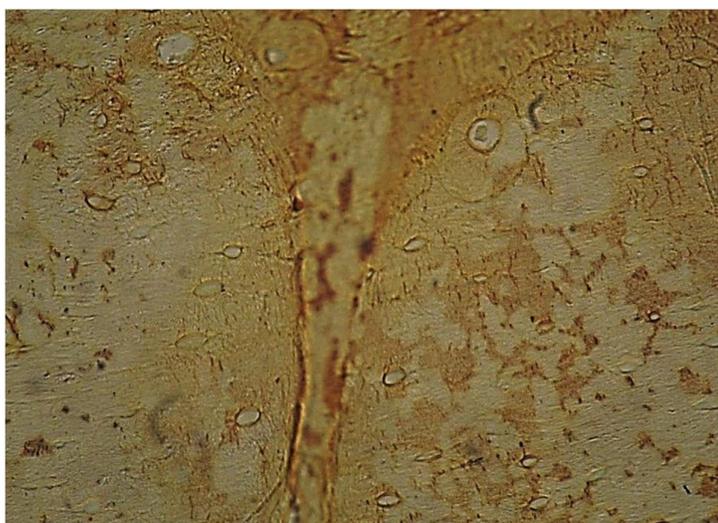


Figura 20 – Lacunas de osteócitos - Grupo tratado com T3 a 3% aos 60 dias. Nitrato de Prata, aumento de 40x

### 6.3.2 Contagem das lacunas dos osteócitos

Aos 30 dias, em relação à quantidade de lacunas dos osteócitos, o grupo tratado com T3 na concentração de 0,03% apresentou o maior número de osteócitos presentes no osso neoformado ( $217,5 \pm 34,64 \text{ mm}^2$ ), estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) da quantidade de células observada no grupo controle ( $153,25 \pm 18,73 \text{ mm}^2$ ). O grupo tratado com T3 a 3% apresentou número de lacunas de osteócitos igual a  $140,25 \pm 27,86 \text{ mm}^2$ . A quantidade de lacunas de osteócitos nos diferentes tratamentos aplicados não foi diferente estatisticamente ( $p > 0,05$ ) (Figura 13).

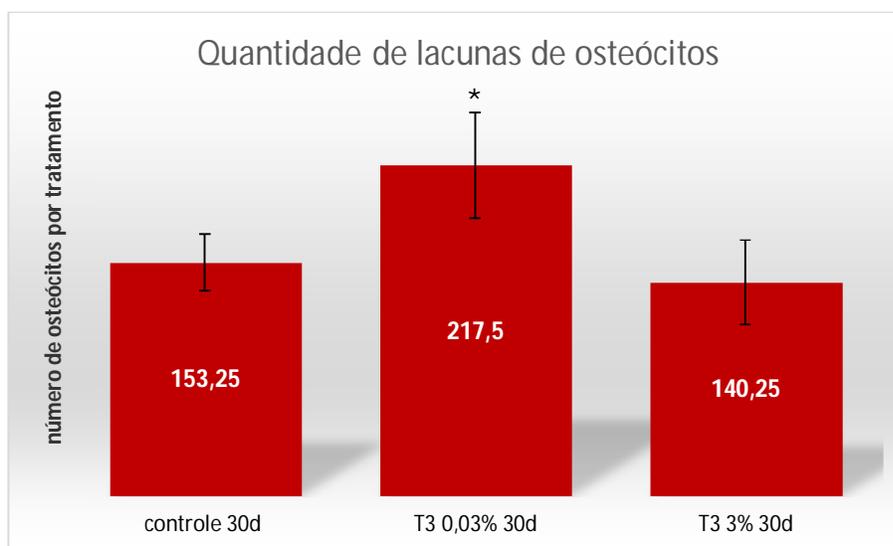


Figura 13 – Número de lacunas de osteócitos observados em cada tratamento, aos 30 dias.

Já aos 60 dias, a quantidade de lacunas de osteócitos observadas nos diferentes tratamentos não foi estatisticamente diferente entre si ( $p > 0,05$ ). O grupo controle apresentou  $170,5 \pm 43,24 \text{ mm}^2$ , o grupo tratado com T3 a 0,03% apresentou  $183,75 \pm 37,65 \text{ mm}^2$  e grupo tratado com T3 a 3%,  $196,25 \pm 65,67 \text{ mm}^2$  (Figura 14).

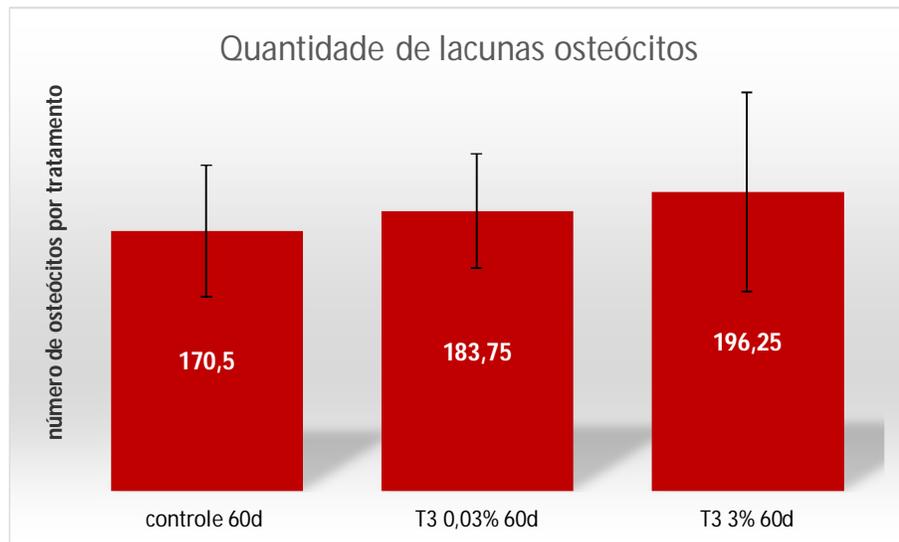


Figura 14 – Número de lacunas de osteócitos observados em cada tratamento, aos 60 dias.

## 6 DISCUSSÃO

Nestes últimos anos, tem se estudado a complexidade dos mecanismos que influenciam a atividade óssea, e grande parte das pesquisas direcionam-se para o estudo de fatores capazes de modular as funções ósseas.

Baseando-nos em trabalhos prévios (SAFER et al., 2001; SAFER et al., 2003; SAFER et al. 2005) que utilizaram a forma tópica de administração de T3, em pele, e conhecendo as modificações causadas no tecido ósseo por este hormônio, optou-se neste estudo por testar esta forma de aplicação, localmente, no reparo ósseo. Para isto, utilizou-se a forma farmacêutica de pomada. Esta forma permite aglutinar uma maior quantidade de princípio ativo, em comparação com outras formas farmacêuticas, como cremes, suspensões ou soluções. Não se pretende com este estudo que esta forma de aplicação do princípio ativo seja indicada clinicamente, mas foi a forma encontrada para se observar o mecanismo de ação e liberação local do hormônio T3 em reparos ósseos.

Vários estudos demonstram que a atividade do T3 sobre o tecido ósseo, promovendo reabsorção ou neoformação é dependente de sua concentração (MUNDY et al, 1976; ALLAIN, 1992; KLAUSHOFER et al., 1995; COSTA, 2008). Neste estudo, a escolha da concentração de T3 foi baseada no trabalho de Saraiva et al., (2008), realizado em cultura de osteoblastos humanos, que utilizou concentrações que simulariam uma baixa e uma alta dosagem do hormônio.

No presente estudo, observou-se a formação de áreas de encapsulamento por tecido conjuntivo nas áreas onde a pomada foi colocada, tanto no grupo controle, como nos grupos que continham princípio ativo. À medida que o tempo de observação aumentou, passando de 30 para 60 dias, percebeu-se tanto no grupo controle quanto no grupo tratado na concentração de 0,03% de T3, que as áreas encapsuladas iam sofrendo uma fragmentação, provavelmente causada pela absorção do material. Foi observado também que as áreas de encapsulamento continuavam grandes quando a concentração do hormônio foi maior (3%). Este dado provavelmente indica uma possível resistência à absorção da pomada nesta concentração. Também quando utilizada esta concentração, notou-se a presença de células gigantes ao redor das áreas que receberam a pomada, indicando uma reação de corpo estranho, não observada no controle, nem na menor concentração

hormonal. Não foi encontrado na literatura relato de reação semelhante à utilização de pomada.

Na aplicação do T3 a 0,03%, no período de 30 dias observou-se osteóide em formação, áreas com canais de Havers, e intensas linhas de reversão. Estas linhas estiveram menos presentes no período de 60 dias, nesta concentração, indicando sinais de estagnação da remodelação do tecido ósseo. Já no grupo tratado com T3 a 3% as linhas de reversão são poucas aos 30 dias, intensificando-se mais tardiamente, aos 60 dias. Este dado indica que, nesta concentração, o hormônio provoca um atraso no processo de maturação óssea. Greenspan & Greenspan (1999) relataram que os hormônios tireoidianos direta ou indiretamente aceleram o *turnover* ósseo, encurtando o ciclo de remodelação. Os resultados encontrados neste estudo indicam que esta aceleração do *turnover* ocorreu somente quando foi utilizado o T3 em menor concentração, evidenciando que o T3 tem uma ação dose-dependente. Costa (2008), em seu estudo sobre o efeito do T3 no tecido ósseo de ratas Wistar adultas, afirma que em condições de tireotoxicose elevada, ocorre uma desaceleração do remodelamento ósseo, com inibição tanto da formação quanto da reabsorção, entretanto, a inibição da formação óssea é maior.

Os resultados histomorfométricos, revelaram que aos trinta dias houve a maior formação óssea no grupo tratado com T3 a 0,03%, sendo estatisticamente significativa em relação ao controle. No grupo tratado com T3 a 3%, embora tenha ocorrido uma maior formação óssea que no controle, esta não foi estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Nossos resultados corroboram com os de Ren et al. (1990), que avaliaram a relação dose-resposta entre tiroxina e o crescimento da tíbia em ratos. A espessura do platô de crescimento da epífise aumentou gradualmente quando T4 foi administrada de 2 a 32 mg/kg/dia e diminuiu quando a dose foi 64 mg/kg/dia.

Aos 60 dias o grupo tratado com T3 a 0,03%, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Acredita-se que este achado deve-se ao fato do osso encontrar-se em processo de remodelação. No grupo tratado com T3 a 3%, aos 60 dias, observou-se uma formação óssea estatisticamente significativa em relação ao controle, mas não em relação ao grupo tratado com T3 a 0,03%. Estes resultados confirmam as características observadas na análise histológica, demonstrando um atraso na formação óssea. Ao mesmo tempo, são contrários às observações de Ohishi et al. (1994), que mostraram que o

T3, nas doses de  $10^{-8}$ M e  $10^{-9}$  M, diminui a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos da calvaria de ratos, e na dose de  $10^{-7}$  M estimula a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos MC3T3-E1 (FRATZL-ZELMAN et al., 1997; VARGA et al., 1997).

Alguns estudos tem tentado elucidar o papel dos osteócitos na formação, função, manutenção e patologia do tecido ósseo (BONEWALD, 2011; LIN, XU, 2011; KERSCHNITZKI et al., 2011), mas algumas questões sobre o papel destas células na biologia óssea permanece indefinido.

Questões que ainda são pouco entendidas incluem: a) o potencial de variação na morfologia dos osteócitos em ossos com diferentes tipos de origem; b) qual o limite de tempo em que estas células atuam na preservação da matriz óssea; c) se estas células persistem e podem ser consideradas como fatores endógenos dos organismos (CADENA, SCHWEITZER, 2012).

A função dos osteócitos na formação do tecido ósseo ainda é controversa. Osteócitos tem sido considerados responsáveis pela ativação da formação óssea, em decorrência da indução de produção de fatores anabólicos (prostaglandina E2, óxido nítrico e cicloxigenase-2) que ativam a formação óssea por estas células (BURGER, KLEIN-NULEND, 1999).

Os osteócitos também possuem a capacidade de estimular a diferenciação osteoclástica por meio da produção de citocinas essenciais para este processo. A expressão de RANKL já foi demonstrada nos osteócitos (MUELLER, RICHARDS, 2004; XIONG et al., 2011). Por outro lado, Marotti et al.(1995), teorizou que os osteócitos inibem os osteoblastos por meio de sinais inibitórios transmitidos via junções do tipo gap, ao mesmo tempo que selecionam e recrutam osteoblastos para compor a linhagem de osteócitos. De acordo com esta teoria, a densidade de osteócitos e a média de formação óssea seria inversamente proporcional.

Para a análise das lacunas dos osteócitos em microscopia de luz, utilizou-se a impregnação por nitrato de prata (OCARINO et al., 2006). A razão pela qual se testou esta coloração em tecido ósseo foi demonstrar que esta técnica, além de propiciar a visualização das conexões dos osteócitos, permite identificar satisfatoriamente alterações nestas conexões, tal como já foi demonstrado previamente pela microscopia eletrônica ( KNOTHE TATE et al., 2004).

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram-se contrários àqueles descritos por Marotti et al. (1995). A maior quantidade de osteócitos encontrada coincidiu com a maior formação óssea obtida, mostrando que estas células podem ter desempenhado uma forma de ativação da formação óssea, relatada anteriormente por Burger & Klein-Nulend (1999).

Tem-se que considerar, ainda, que a atividade óssea observada neste estudo foi influenciada pela presença de um medicamento contendo hormônio em sua composição. A presença dessa substância pode ter modificado as observações sobre o comportamento destas células realizadas por outros autores (Bonewald, 2011; Lin & Xu, 2011; Kerschnitzki et al., 2011).

A esclerotina, um produto do gene SOST, é uma proteína expressa pelos osteócitos e inibe a formação óssea. Vários hormônios têm sido sugeridos como possíveis reguladores da produção de esclerotina (Moester et al., 2010). Mas a influência dos hormônios tireoideanos na síntese de esclerotina ainda não tinha sido investigada até então.

Skowro Ska-Jó Wiak et al., 2012 demonstraram que em pacientes, altos níveis de esclerotina foram identificados em estado de tireotoxicose, e uma significativa diminuição em seus níveis séricos ocorreu, quando o estado de eutireoidismo foi restaurado. Somente a partir deste estudo, recém-publicado, temos algumas informações da ação do hormônio tireóideo sobre os osteócitos.

Como também não há na literatura estudos prévios realizados com a aplicação tópica de T3 em lesões ósseas, este trabalho averiguou de que forma este hormônio, nesta forma de aplicação, agiria sobre os osteócitos. Além da observação de que a aplicação de T3 na concentração de 0,03% coincidiu com a maior formação, aos 30 dias, a morfologia da lacuna destas células neste período de observação indicou uma maior atividade dos osteócitos, com extensos canalículos dos prolongamentos e ampla rede de conexões. Estas mesmas características são salientadas por Ocarino et al., (2006), como próprias de osteócitos em grande estado funcional.

À medida que o tempo de observação aumentou, passando de 30 para 60 dias, percebeu-se um processo de nivelamento no número de lacunas de osteócitos quando comparados os tratamentos e o controle. A mesma observação foi realizada quanto à formação de tecido ósseo, sugerindo uma atividade sinérgica entre formação de tecido ósseo e número das células analisadas.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos tratamentos propostos, e metodologia utilizada conclui-se que:

- O T3, na concentração de 0,03%, no período de 30 dias mostrou uma maior formação óssea.
- A aplicação do hormônio tireoidiano T3, na concentração de 0,03%, no período de 30 dias proporcionou um aumento no número e morfologia das lacunas dos osteócitos.

## REFERÊNCIAS\*

Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*, 1997 Aug;21(2):137-42.

Adachi T, Aonuma Y, Ito S, Tanaka M, Hojo M, Takano-Yamamoto T, Kamioka H. Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation. *Journal of Biomechanics*, 2009 nov; 42(15): 2507-12.

Affinito P, Sorrentino C, Farace MJ, Di Carlo C, Moccia G, Canciello P, et al. Effects of thyroxine therapy on bone metabolism in postmenopausal women with hypothyroidism. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996 Oct;75(9):843-8.

Aires MM. *Fisiologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Allain TJ, Chambers TJ, Flanagan AM, McGregor AM. Triiodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *J Endocrinol*. 1992; 133: p.327-331

Allain TJ, McGregor AM. Thyroid hormones and bone. *J Endocrinol*. 1993; 139: p.9-18.

Allain TJ, Thomas MR, McGregor AM, Salisbury R. A hystomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. *Bone*. 1995;16(5): 505-9.

Allain TJ, Yen PM, Flanagan AM, McGregor AM. The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *Eur J Clin Invest*. 1996 May;26(5):418-25.

Andia DC, Cerri PS, Spolidorio, LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2006; 35(2): 191-98.

Avioli VL, Krane SM. *Metabolic bone disease*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 1998.

Balena R, Markatos A, Gentile M, Masarashia P, Seedor JG, Rodan GA, et al. The aminobisphosphonate alendronate inhibits bone loss induced by thyroid hormone in the rat. Comparison between effects on tibiae and vertebrae. *Bone*. 1993;14(3):499-504.

Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. *Osteoporose*. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.

Banovac K, Koren E. Triiodothyronine stimulates the release of membrane-bound alkaline phosphatase in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*. 2000 Dec;67(6):460-5.

Barbosa BA. Análise microscópica da necrose óssea provocada pelo aquecimento friccional durante a confecção de alvéolos cirúrgicos para implantes osseointegráveis. (dissertação). Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Bilezikian JP, Raizs LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996.

- Bland R. Steroid hormone receptor expression and action bone. *Clin Sci.* 2000;98(2): 217-40.
- Bonewald LF. Osteocytes as Dynamic Multifunctional Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007; 1116: 281–290.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229–38.
- Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, Mechanosensing, and Wnt Signaling. *Bone*. 2008;42:606–615.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003; 423: 337–342.
- Britto JM, Fenton AJ, Holloway WR, Nicholson GC. Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption. *Endocrinology*. 1994;134(1): 169-76.
- Burger EH, Klein-Nulend J (1999) Mechanotransduction in bone—role of the lacuno-canalicular network. *FASEB Journal* 13 Suppl: S101–112.
- Burkhart JM, Jowsey J. Parathyroid and thyroid hormones in the development of immobilization osteoporosis. *Endocrinology*. 1967 Nov;81(5):1053-62.
- Cadena E A, Schweitzer M H. Variation in osteocytes morphology vs bone type in turtle shell and their exceptional preservation from the Jurassic to the present. *Bone* 51 (2012) 614–620.
- Civitelli R. Cell–cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008; 473(2): 188-92.
- Costa, Cristiane Cabral. Efeito da triiodotironina e do GC-1, um tireomimético seletivo pela isoforma b do receptor de hormônio tireoideano, sobre parâmetros histomorfológicos e biomecânicos do tecido ósseo de roedores adultos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2008
- Currey JD. The many adaptations of bone. *Journal of Biomechanics*, 2003 Oct; 36(10): 1487-95.
- Datta H, NG W, Walker J, Tuck S, Varanasi, S . The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*, 2008; 61: 577-587.
- Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. *Bone* 1986;7(2):101-8.
- Evia JRB. Marcadores de remodelado ósseo y osteoporosis. *Rev Mex Patol Clin*, 2011, Julio – Septiembre; 58(3): 113-37.
- Franz-Odenaal Ta, Hall Bk, Witten Pe. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006 Jan;235(1):176-90.

Fratzl-Zelman N, Hörandner H, Luegmayr E, Varga F, Ellinger A, Erlee MP, et al. 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*. 1997 Mar;20(3):225-36.

Fukushima O, Bekker PJ, Gay CV. Characterization of the functional stages of osteoclasts by enzyme histochemistry and electron microscopy. *Anat. Rec.*, 1991; 231: 298–315.

Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, et al. Different functions for the thyroid hormone receptors TR $\alpha$  and TR $\beta$  in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J*. 1999 Feb;18(3):623-31.

Graaf VD. *Anatomia Humana*. 6 ed. Manole, 2003.

Gilbert SF. *Development biology*. 8 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006.

Gouveia CHA, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of Thyroid Hormone Administration and Estrogen Deficiency on Bone Mass of Female Rats. *J Bone Miner Res*. 1997, 12: 2098–2107.

Gouveia CHA. O efeito molecular e estrutural do hormônio tiroideano no esqueleto. *Arq. bras. endocrinol. Metab*. 2004;48(1):183-195.

Greenspan SL, Greenspan FS. The effect of thyroid hormone on skeletal integrity. *Ann Intern Med*. 1999 May;130(9):750-8.

Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, ET al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 Oct;96(10):857-81.

Hekimsoy Z. Osteocytes: Know and Unknown. *Turk Jem* 2008; 12: 23-7

Hillard TC, Stevenson JC. Role of estrogen in the development of osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 1991;49(suppl):S55-9.

Huang BK, Golden LA, Tarjan G, Madison LD, Stern PH. Insulin-like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2000 Feb;15(2):188-97.

Incerpi S, Scapin S, D'Arezzo S, Spagnuolo S, Leoni S. Short-term effects of thyroid hormone in prenatal development and cell differentiation. *Steroids*. 2005 May-Jun;70 (5-7):434-443.

Jenis LG, Ongphiphadhanakul B, Braverman LE, Stein GS, JB Lian, Lew R, et al. Responsiveness of gene expression markers of osteoblastic and osteoclastic activity to calcitonin in the appendicular and axial skeleton of the rat in vivo. *Calcif Tissue Int*. 1994 Jun;54(6):511-5.

Jowsey J, Detenbeck LC. Importance of thyroid hormones in bone metabolism and calcium homeostasis. *Endocrinology* 1969 Jul;85(1):87-95.

Kerschnitzki M, Wagermaier W, Roschger P, Seto J, Shahar R, Duda GN, et al. The organization of the osteocyte network mirrors the extracellular matrix orientation in bone. *J Struct Biol* 2011;173:303–11. LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229–38.

Khan K. *Physical Activity and Bone Health*. Human Kinetics, 2001, 275 p.

Kim CH, Kim HK, Shong YK, Lee KU, Kim GS. Thyroid hormone stimulates basal and interleukin (IL)-1-induced IL-6 production in human bone marrow stromal cells: a possible mediator of thyroid hormone-induced bone loss. *J Endocrinol*. 1999 Jan;160(1):97-102.

Klaushofer K, Varga F, Glantschnig H, Fratzl-Zelman N, Czerwenka E, Leis HJ, et al. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J Nutr*. 1995; Jul;125(7 Suppl):S1996S-2003.

Knothe Tate, ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jan;36(1):1-8.

Kujala. S. *Biocompatibility and biomechanical aspects of nitinol shape memory metal implants*. [dissertation]. Oulu: University of Oulu; 2003.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8 Ed. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 2009.

Lin Y, Xu S. AFM analysis of the lacunar–canalicular network in demineralized compact bone. *J Microsc* 2011;241:291–302.

Mann V, Huber C, Kogianni G, Jones D, Noble B. The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*. 2006;6:408–417

Marotti G, Ferretti M, Remaggi F, Palumbo C. Quantitative evaluation on osteocyte canalicular density in human secondary osteons. *Bone*, 1995; 16: 125–128.

Marotti G, Muglia MA, Palumbo C. Structure and function of lamellar bone. *Clin Rheumatol*. 1994 Dec;13 Suppl 1:63-8.

Messora MR. *Influência do Plasma Rico em Plaquetas no reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos: estudo histológico e histométrico*. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2005.

Moester MJC, Papapoulos SE, Löwik CWGM, van Bezooijen RL: Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int* 2010, 87:99–107.

Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1990 Mar;19(1):35-63.

Mosekilde L, Melsen F, Bagger JP, Myhre-Jensen O, Sorensen NS. Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism. *Acta Endocrinol* July 1977; 1(85): 515-525.

- Mosekilde L, Melsen F. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1978 Jan;86(1):56-62.
- Mueller RJ, Richards RG. Immunohistological identification of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in human, ovine and bovine bone tissues. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15:367–372.
- Mundy GR, Shapiro JL, Bandelin JG, Canalis EM, Raisz LG. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. *J Clin Invest*. 1976 Sep;58(3):529-34.
- Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, July 2008; 106(1): 5–13.
- Nasiri S, Haghpanah V, Taheri E, Heshmat R, Larijani B, Saeedi M. Hair regrowth with topical triiodothyronine ointment in patients with alopecia areata: a double-blind, randomized pilot clinical trial of efficacy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012 May;26(5):654-6.
- Noble BS. The osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2008; 473(2):157-64.
- Nunes MT. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2003 dez.;47(6):639-43.
- Ocarino NM, Gomes MG, Melo EG, Serakides R. Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões. *J Bras Patol Med Lab*, fevereiro 2006; 42(1): 37-39.
- Ohishi K, Ishida H, Nagata T, Yamauchi N, Tsurumi C, Nishikawa S, et al. Thyroid hormone suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells to osteoblasts, but enhances functional activities of mature osteoblasts in cultured rat calvaria cells. *J Cell Physiol*. 1994 Dec;161(3):544-52.
- Ongphiphadhanakul B, Alex S, Braverman LE, Baran DT. Excessive l-thyroxine therapy decreases femoral bone mineral densities in the male rat: effect of hypogonadism and calcitonin. *J Bone Miner Res*. 1992;7:1227-31.
- Pedrosa WF Jr, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Nov;20(11):1254-64. Epub 2009.
- Pepene CE, Kasperk CH, Pfeilschifter J, Börcsök I, Gozariu L, Ziegler R, et al. Effects of triiodothyronine on the insulin-like growth factor system in primary human osteoblastic cells in vitro. *Bone*. 2001 Dec;29(6):540-6.
- Pivonka P, Zimaka J, Smitha DW, Gardinera BS, Dunstanb CR, Simsc NA, Martinc TJ, Mundy GR. Model structure and control of bone remodeling: A theoretical study. *Bone*, 2008; 43(2): 249-63.
- Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem*. 1999 Aug; 45(8 Pt 2):1353-8.

Ren SG, Huang Z, Sweet DE, Malozowski S, Cassorla F. Biphasic response of rat tibial growth to thyroxine administration. *Acta Endocrinol.* 1990 Mar;122(3):336-40.

Robling AG, Castillo AB, Turner CH.. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering.* August 2006; 8: 455-498.

Rosen CJ, Compston JE, Lian JB. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. John Wiley & Sons; 2009.

Ross DS. Hyperthyroidism, thyroid hormone therapy, and bone. *Thyroid.* 1994; 4(3):319-26.

Safer JD, Crawford TM, Fraser LM, Hoa M, Ray S, Chen TC et al. Thyroid hormone action on skin: diverging effects of topical versus intraperitoneal administration. *Thyroid.* 2003 Feb;13(2):159-65.

Safer JD, Crawford TM, Holick, MF. Topical Thyroid Hormone Accelerates Wound Healing in Mice. *Endocrinology* October 1, 2005 vol. 146 no. 10 4425-4430

Safer JD, Fraser LM, Ray S, Holick, MF. Topical Triiodothyronine Stimulates Epidermal Proliferation, Dermal Thickening, and Hair Growth in Mice and Rats. *Thyroid.* August 2001, 11(8): 717-724.

Saraiva P P, Teixeira S S, Nogueira C R, Padovani, C R. Triiodothyronine (T3) does not induce Rankl expression in Rat ROS 17/2.8 cells. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008; Feb;52(1):109-13

Serakides R, Nunes VA, Nascimento EF, Silva CM, Ribeiro AFC. Relação tireoidegônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2001 dez.;52(6):579-85.

Serakides R, Nunes VA, Ocarino NM, Nascimento EF. Efeito da associação hipertireoidismo-castração no osso de ratas adultas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; dez.;48(6):875-84.

Siddiqi A, Parsons MP, Lewis JL, Monson JP, Williams GR, Burrin JM. TR expression and function in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Feb;87(2):906-14.

Skowro Ska-Jó Wiak EB, Krawczyk-Rusiecka K, Lewandowski KC, Adamczewski Z, Lewi Ski A. Successful treatment of thyrotoxicosis is accompanied by a decrease in serum sclerostin levels. *Thyroid Res.* 2012 Nov 13;5(1):14.

Suwanwalaikorn S, Ongphiphadhanakul B, Braverman LE, Baran DT. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats. *Eur J Endocrinol.* 1996 May;134(5):655-9.

Tarameshloo M, Norouzian M, Zarein-Dolab S, Dadpay M, Gazor R. A comparative study of the effects of topical application of Aloe vera, thyroid hormone and silver sulfadiazine on skin wounds in Wistar rats. *Laboratory Animal Research.* Jan 2012; 28(1): 17-22.

Turner, CH; Forwood, MR; Otter MW. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? *The FASEB Journal*, August 1994; 8(11): 875-78.

Van Hove RP, Nolte PA, Vatsa A, Semeins CM, Salmon PL, Smitth, Klein-Nulend J. Osteocyte morphology in human tibiae of different bone pathologies with different bone mineral density—is there a role for mechanosensing? *Bone*, 2009; 45:321–329

Varga F, Rumpler M, Klaushofer K. Thyroid hormones increase insulin-like growth factor mRNA levels in the clonal osteoblastic cell line MC3T3-E1. *FEBS Lett.* 1994 May;345(1):67-70.

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 cfos/c-fun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif Tissue Int.* 1997 Nov;61(5):404-11.

Von Recklinghausen F. Die fibrose oder defirmirende ostitis, die osteomalacie und die osteoplstische carcinose in ihren gegenseitigen biziehungen. Monograph: Festschr Rudolf Virchow zu seinem 71. Berlin: Gebustag; 1891. p.1-89.

Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* 2011 Sep 11; 17(10):1235–1241.

Yazdanparast P, Carlsson B, Oikarinen A, Risteli J, Lavin T, Faergemann J. Action of topical thyroid hormone analogue, triiodothyroacetic acid in reversing glucocorticoid-induced skin atrophy in humans. *Thyroid.* 2006 Nov;16(11):1157-62.

Wang ET, Sandberg R, Luo S, Hrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008; 456:470-476.

Weiss RE, Refetoff S. Effect of thyroid hormone on growth. Lessons from the syndrome of resistance to thyroid hormone *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996 Sep;25(3):719-30.

Williams GR, Robson H, Shalet SM. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J Endocrinol.* 1998 Jun;157(3):391-403.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983 Jun;16(2):109-110.

**ANEXOS**

## Anexo A



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais



CEEPA-Proc. Nº 011/2012

Bauru, 23 de maio de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação da influência do hormônio Tireoidiano (T<sub>3</sub>) Tópico em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos Wistar**, de autoria de Luciana Calegari Romani, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão realizada no dia **21 de maio de 2012**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Patrícia Pinto Saraiva  
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73  
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356  
<http://www.fob.usp.br>

**ANEXO B****Normas da revista submetida**