

**Ana Cristina Ferreira Bassit**

**Ação de fração do hormônio paratireóideo no  
metabolismo ósseo: estudo experimental em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.

Programa de: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Olavo Pires de Camargo

**SÃO PAULO**

**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bassit, Ana Cristina Ferreira

Ação de fração do hormônio paratireóideo no metabolismo ósseo : estudo experimental em ratos / Ana Cristina Ferreira Bassit. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Olavo Pires de Camargo.

Descritores: 1.Hormônio do crescimento 2.Fator de crescimento insulín-like I  
3.Osso e ossos/metabolismo 4.Osteogênese 5.Ratos

USP/FM/DBD-473/10

## **Dedicatória**

Aos meus filhos,  
Rodrigo e Ricardo

## Sumário

### Resumo

### Summary

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	7
<b>3 METODOS</b>	16
3.1 Desenho experimental	17
3.2 Modelo animal	18
3.3 Grupos experimentais	19
3.4 Tratamentos	20
3.4.1 Tratamento placebo	20
3.4.2 Tratamento com PTH	21
3.4.3 Marcadores histológicos	22
3.5 Eutanásia	22
3.6 Exame necroscópico e anatomopatológico	23
3.6.1 Distribuição de tecidos e amostras por ocasião da necropsia	23
3.7 Avaliação das amostras	24
3.7.1 Avaliação do peso corpóreo e comprimento femoral	24
3.7.2 Tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (pQCT)	25
3.7.3 Análise histomorfométrica	26
3.7.3.1 Vértebras lombares	27
3.7.3.2 Tibias	29
3.7.4 Dosagem sérica de IGF-I	31
3.8 Critérios de exclusão	32
3.9 Análise estatística	32
<b>4 RESULTADOS</b>	33
4.1 Avaliação do peso corpóreo e comprimento femoral	34
4.2 Tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (pQCT)	36
4.3 Análise histomorfométrica	46
4.4 Dosagem sérica de IGF-I	55

<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>66</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICA</b>	<b>68</b>

## RESUMO

BASSIT, A.C.F. **Ação de fração do hormônio paratireóideo no metabolismo ósseo: estudo experimental em ratos** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2010.

O hormônio da paratireóide (PTH) tem sido utilizado como um agente anabólico ósseo para o tratamento de condições de osteopenia / osteoporose, prevenção e consolidação de fraturas. O papel do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), como um potencial mediador dos efeitos anabólicos do PTH, é controverso. O rato dwarf pode ser adequado para o estudo dessas interações *in vivo*, uma vez que a os níveis séricos de hormônio do crescimento (GH) encontram-se reduzidos a cerca de 6% dos valores normais em fêmeas e os níveis séricos de IGF-I, a cerca de 10% dos valores normais, mas estes animais são saudáveis e sem malformações esqueléticas. Os objetivos deste estudo foram: 1 - Avaliar o rato dwarf ( $dw/dw$ ) como um modelo animal para o estudo dos efeitos da deficiência do GH e do IGF-I sobre o esqueleto e o metabolismo ósseo; 2 - Comparar os efeitos do tratamento com PTH sobre o esqueleto e formação óssea em ratos dwarf e em ratos Lewis, sua linhagem de origem. A partir de 9 semanas de idade, ratas Lewis e dwarf receberam injeções por via subcutânea, diariamente, por duas semanas, com medicamento placebo ou fragmento de hormônio paratireóideo humano, hPTH 1-34, na dose de 50  $\mu\text{g}$  / kg de peso corpóreo (N = 7-13/grupo). Foram

realizadas avaliações do peso corpóreo semanalmente e, por ocasião da eutanásia, na 11<sup>a</sup> semana, foram coletadas amostras de sangue para realização de dosagens séricas de IGF-I (ELISA). As vértebras lombares e as metáfises proximais das tíbias foram avaliadas por meio de histomorfometria óssea. Os fêmures direitos foram mensurados e analisados por tomografia quantitativa periférica computadorizada (pQCT). Os níveis séricos de IGF-I mostraram-se três vezes menores nas ratas dwarf quando comparados aos observados nas ratas Lewis, a despeito do tratamento com PTH, que não provocou aumento de IGF-I em nenhum dos dois grupos. No entanto, o PTH aumentou significativamente o volume ósseo trabecular em ambos os grupos, dwarf ( $p < 0.003$ ) e Lewis ( $p < 0.0001$ ) comparados aos seus respectivos grupos controle, efeito associado ao aumento da espessura e da distância trabeculares. As ratas dwarf tratadas com PTH também exibiram aumentos de 7 a 13 vezes na superfície de mineralização e na taxa de formação óssea respectivamente, quando comparadas às ratas dwarf tratadas com placebo, enquanto as ratas Lewis tratadas com PTH mostraram aumentos de 3 e 4 vezes quando comparadas as ratas Lewis tratadas com placebo. A taxa de aposição mineral, indicativa de atividade osteoblástica, estava aumentada nas ratas dwarf e Lewis tratadas com PTH ( $p < 0.0001$ ) comparadas aos seus respectivos grupos controle. As análises pela pQCT das metáfises femorais distais revelaram que todos os parâmetros estruturais do osso trabecular (BMC total, BMD total, BMC trabecular e BMD trabecular) também apresentaram valores significativamente aumentados nas ratas, Lewis e dwarf, tratadas com

PTH, quando comparadas às ratas tratadas com placebo ( $p < 0.0001$ ). Ao se considerar os parâmetros para o osso cortical, praticamente todos os valores obtidos nas diáfises femorais (BMC total, BMD total, BMC cortical, BMD cortical, área cortical, espessura cortical, circunferência periosteal e endosteal) não mostraram qualquer efeito do tratamento com PTH nos dois grupos. Em conclusão, o PTH induziu efeitos anabólicos altamente significativos no tecido ósseo trabecular das tíbias e vértebras lombares, a despeito dos baixos níveis circulantes de IGF-I em animais da linhagem dwarf. A resposta positiva ao tratamento com PTH confirma a sua utilização terapêutica como potente agente anabólico ósseo mesmo em face à deficiência no eixo GH/IGF-I.

## SUMMARY

BASSIT, A.C.F. **Effect of human parathyroid hormone fragment on bone metabolism: experimental study in rats** [thesis]. São Paulo: University of São Paulo, College of Medicine, 2010.

The parathyroid hormone (PTH) has been used as a bone anabolic agent to treat osteopenic/osteoporotic conditions, prevention and healing of fractures. The role of insulin-like growth factor I (IGF-I) as a potential mediator for the bone anabolic effects of PTH is controversial. The dwarf rat (*dw<sup>-</sup>/dw<sup>-</sup>*) may be suitable to study these interactions *in vivo*, since GH synthesis is selectively reduced to about 6% of normal in females, and serum IGF-I levels are about 10% of normal, but these animals are healthy without skeletal malformations. The objectives of this study were: 1- Evaluate the dwarf rat (*dw<sup>-</sup>/dw<sup>-</sup>*) as an animal model for studies of the effects of GH and IGF-I deficiency on the skeleton and bone metabolism; 2- Compare the skeletal effects of PTH treatment in dwarf rats and their background strain, Lewis rats. At 9 weeks of age, female Lewis and dwarf rats were injected SC daily for 2 weeks with vehicle or human parathyroid hormone fragment, hPTH 1-34, at a dose of 50 µg/kg body weight (N=7-13/group). The body weight was evaluated weekly and at the time of euthanasia, at 11 weeks, blood samples were collected. Serum IGF-I was

measured by ELISA, and cancellous bone histomorphometry was performed in the lumbar vertebral body and tibial proximal metaphysis. The right femurs were measured, scanned and analyzed by peripheral quantitative computed tomography (pQCT). Serum levels of IGF-I were nearly 3-fold lower in dwarf rats compared with Lewis rats regardless of treatment, but PTH treatment did not increase serum IGF-I in either Lewis or dwarf rats. However, PTH significantly increased cancellous bone volume in both dwarf ( $P<0.003$ ) and Lewis rats ( $P<0.0001$ ) when compared to vehicle-treated rats, which was associated with increased trabecular width and decreased trabecular separation. PTH-treated dwarf rats also exhibited 7- and 13-fold increases in mineralizing surface and bone formation rate respectively, compared to vehicle-treated dwarf rats, while PTH-treated Lewis rats showed 3- and 4-fold increases when compared to vehicle-treated Lewis rats. Mineral apposition rate, an index of osteoblast activity, was increased in PTH-treated dwarf rats ( $P<0.0001$ ) and in Lewis rats ( $P<0.0001$ ) compared to their respective control groups. The pQCT analyses of the distal femoral metaphysis revealed that cancellous bone structural parameters (total BMC, total BMD, trabecular BMC, and trabecular BMD) also presented significantly higher values in PTH-treated dwarf and Lewis rats, when compared to vehicle treated rats ( $P<0.0001$ ). When considering cortical bone parameters, almost all the values obtained at the femoral shafts (total BMC, total BMD, cortical BMC, cortical area, cortical thickness, periosteal and endocortical circumferences) did not show any PTH treatment effect in either groups. In conclusion, PTH induced highly significant anabolic effects in vertebral and tibial

cancellous bone despite low circulating levels of IGF-I in dwarf rats. The positive response to PTH treatment confirms its therapeutic use as a potent bone anabolic agent, even in the face of GH/IGF-I deficiency.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

As enfermidades do sistema músculo esquelético, particularmente a osteoporose, oneram os sistemas de saúde, devido aos elevados custos com seu tratamento e reabilitação. Trata-se de uma enfermidade de caráter sistêmico, caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea (BMD), ruptura da microarquitetura do tecido ósseo, comprometimento da resistência óssea e consequente aumento no risco de fraturas, como resultado do desequilíbrio entre os processos de formação e de reabsorção óssea. De acordo com estudo, baseado em evidências, publicado em 2010, pela Sociedade Norte Americana de Menopausa (The North American Menopause Society – NAMS), a osteoporose afeta principalmente os idosos, em particular indivíduos do sexo feminino, sendo responsável por cerca de 90% das fraturas de quadril e coluna em mulheres americanas, brancas, com idade entre 65 e 84 anos. Em 2005, somente nos Estados Unidos, foram gastos cerca de US\$ 17 bilhões com custos da osteoporose e fraturas relacionadas, segundo relatório publicado pela “National Osteoporosis Foundation” - Washington, DC. (*“Clinician Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis”*, 2008) .

Vale lembrar que, a osteopenia, ou densidade mineral óssea diminuída, não é encontrada somente em mulheres no período de pós menopausa, mas também em outras condições onde há perda óssea por deficiência de estrógenos, como em pacientes com anorexia nervosa e amenorréia hipotalâmica, na osteoporose juvenil (Grinspoon *et al.*, 1999; Giustina *et al.* , 2008) e na diabetes do tipo I

(Berek et al., 1995). Pacientes oncológicos submetidos a tratamento quimioterápico também devem ser considerados, uma vez que a quimioterapia causa reações adversas no metabolismo ósseo (Davies et al., 2002).

O osso, a despeito de sua aparência estática, é um tecido dinâmico, submetido a constantes processos de modelamento e remodelamento no decorrer da vida. O propósito destes processos, durante o crescimento, é levar o esqueleto a atingir o seu pico de força e resistência. Durante a vida adulta, o propósito passa a ser a manutenção da resistência, removendo tecido ósseo danificado e preservando a integridade mecânica do esqueleto. No transcorrer destes processos, osteoblastos e osteoclastos são submetidos à ação de uma variedade enorme de hormônios e fatores de crescimento. Em uma complexa cadeia de reações, estas substâncias levam à formação de tecido ósseo (pelos osteoblastos) ou à reabsorção óssea (pelos osteoclastos) e desempenham um papel importante na consolidação de fraturas, na perda óssea ligada à menopausa e, também, nas enfermidades do metabolismo ósseo.

O fator de crescimento ligado à insulina (IGF-I), o hormônio do crescimento (GH) e o hormônio da paratireóide (PTH) estão incluídos neste grupo de substâncias com importante participação no metabolismo ósseo. Elas agem como moléculas sinalizadoras envolvidas no controle da diferenciação do crescimento celular.

Atualmente, a maior parte das drogas utilizadas no tratamento da osteoporose atuam inibindo a reabsorção óssea. Os estrógenos, os bifosfonatos, os moduladores de receptores seletivos para estrógenos e a calcitonina são exemplos de agentes com ação anti reabsorção, que atuam nos osteoclastos para

prevenir a perda óssea. Entretanto, estas drogas não tem grande atuação na formação de novo tecido ósseo para, efetivamente, promover a restauração deste tecido. Uma nova abordagem no tratamento refere-se ao uso de agentes anabólicos que possam melhorar o remodelamento e a renovação do tecido ósseo como um todo, tanto na formação quanto na reabsorção óssea. A evolução destes recursos terapêuticos baseia-se, sobretudo, em estudos sobre os fatores de crescimento envolvidos no metabolismo e na constante renovação do tecido ósseo.

O GH é de fundamental importância no crescimento ósseo longitudinal, na maturação do esqueleto e na aquisição de massa óssea (Ohlsson *et al.*, 1998). O IGF-I, produzido inicialmente no fígado, é considerado o principal mediador dos efeitos do GH no esqueleto. O GH e o IGF-I atuam como importantes reguladores da homeostase óssea também durante a vida adulta (Giustina *et al.*, 2008), envolvidos no remodelamento ósseo e seus ciclos consecutivos de reabsorção e formação de tecido ósseo. Durante estes processos, pre-osteoblastos migram para as lacunas de reabsorção formadas pelos osteoclastos e diferenciam-se em osteoblastos, que então sintetizam a matriz óssea.

O IGF-I pode estimular a proliferação de osteoblastos e de fibroblastos, e estimular a produção de colágeno do tipo I por estas células (McCarthy *et al.*, 1989). Baixos níveis sistêmicos de IGF-I estão relacionados à diminuição da densidade mineral óssea, e conseqüentemente aumento do risco de fraturas.

O PTH tem sido empregado como agente anabólico no tratamento da osteopenia/osteoporose, prevenção e consolidação de fraturas (Barnes *et al.*, 2008). Classicamente, este hormônio é considerado um agente catabólico no tecido ósseo; no entanto, estudos em animais revelaram que, quando administrado intermitentemente, e em doses baixas, o PTH estimula a formação tanto do osso trabecular como cortical (Morley *et al.*, 2001). Nakajima e cols. (2002) relataram ainda que a administração intermitente de PTH, durante a cicatrização óssea experimental, resultava na formação de um calo ósseo maior, com melhora na maturação do tecido e na resistência biomecânica. Os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos do PTH sobre o esqueleto ainda não foram totalmente esclarecidos e o papel do IGF-I como um mediador potencial dos efeitos anabólicos ósseos deste hormônio também é bastante controverso. Parte das divergências, entre os resultados obtidos nos estudos relacionados à influência do eixo GH/IGF-I sobre o metabolismo ósseo e atuação do PTH, deve-se aos diferentes modelos experimentais utilizados, especialmente modelos geneticamente modificados. Muitas das linhagens apresentam baixos índices de sobrevivência, deficiências de outros hormônios que também agem sobre o metabolismo ósseo, e estado geral de saúde debilitado, complicando a interpretação dos dados obtidos.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o papel do IGF-I sistêmico na estrutura e função do tecido ósseo, em condições patológicas, nas quais os níveis séricos de IGF-I encontram-se diminuídos, assim como a interferência desta deficiência na ação anabólica óssea do PTH. Assim, serão testadas as seguintes hipóteses:

- 1) Ratos da linhagem dwarf (dw-4/dw-4, autossômicos recessivos) podem ser utilizados como um modelo animal adequado aos estudos sobre a deficiência do IGF-I e seus efeitos na estrutura e metabolismo do tecido ósseo.
- 2) O IGF-I atua como potencial mediador dos efeitos anabólicos do PTH, e conseqüentemente, sua deficiência bloqueia de maneira significativa a resposta do esqueleto ao tratamento com PTH.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O GH ou somatotropina é secretado pelas células da glândula pituitária anterior, sob o controle do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e da somatostatina, que exercem, respectivamente, ação estimulatória e inibitória. Durante anos o GH foi considerado o principal responsável pelo desenvolvimento do esqueleto. Estudos posteriores, no entanto, revelaram que muitos dos efeitos metabólicos do GH são mediados pelo fatores de crescimento similares à insulina (IGFs) ou somatomedinas – “hipótese da somatomedina”, de acordo com Salmon e Daughaday (1957) apud Daughaday (2000). Segundo esta hipótese, o GH estimula indiretamente a síntese e secreção de IGF-I, que age como principal mediador nas células-alvo do tecido ósseo, estimulando a expansão longitudinal da placa de crescimento de uma maneira endócrina.

Em 1993, Powell-Braxton *et al.*, desenvolveram camundongos heterozigotos para IGF-I (IGF-I<sup>+/-</sup>) e camundongos homozigotos ou “knockout” (IGF-I<sup>-/-</sup>), como modelos de experimentação para investigar o papel deste fator no desenvolvimento. Os camundongos heterozigotos apresentaram redução de 37% dos níveis séricos de IGF-I quando comparados aos da mesma linhagem, porém não modificados geneticamente. Apesar da marcação pela tetraciclina não ter demonstrado diferença significativa na placa de crescimento, estes animais mostraram-se 10 a 20% menores por ocasião do nascimento e durante as 17 semanas de acompanhamento. Estes heterozigotos, machos e fêmeas, mostraram-se férteis e puderam gerar camundongos homozigotos. Estes animais apresentaram redução de 60% do peso corpóreo, distrofia muscular acentuada e

elevada letalidade perinatal (> 95%), demonstrando claramente o impacto negativo da ausência de IGF-I .

O IGF-I passou a ser apontado como um dos mais importantes fatores anabólicos no crescimento ósseo por diversos autores (Liu *et al.*, 1993; Ohlsson *et al.*, 1998; Clemens e Chernausek, 2004; He *et al.*, 2006; Giustina *et al.*, 2008; Rosen, 2008).

Camundongos “knockout” para IGF-I também foram utilizados por Bikle *et al.* ( 2001) para analisar os efeitos da ausência de IGF-I sobre o esqueleto, por meio de histomorfometria óssea, tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (pQCT) e tomografia microcomputadorizada ( $\mu$ CT). Houve acentuado retardo no crescimento e diminuição no tamanho dos ossos avaliados (tíbias e vértebras lombares – L1). A taxa de formação óssea (BFR, do inglês, bone formation rate) mostrou-se 27% diminuída em relação aos animais do grupo controle e, ao se administrar IGF-I, aumentou cerca de 5 vezes. Os valores obtidos com a tomografia (pQCT), em sua maior parte, não foram considerados confiáveis e a microtomografia ( $\mu$ CT) das tíbias e vértebras obteve resultados contrastantes entre os dois ossos avaliados.

Em 1957, quando começou a buscar um sistema que permitisse estudar os efeitos anabólicos do GH em tecidos *in vitro*, Daughaday escolheu a cartilagem de ratos, após ter observado o papel essencial que a cartilagem epifisária desempenha no crescimento ósseo, e também porque a ação do GH na cartilagem epifisária de ratos hipofisectomizados constituiu um dos ensaios bilológicos mais sensíveis em seus estudos prévios. A cartilagem epifisária,

porém, não pode ser facilmente dissecada e ele acabou por conduzir seus estudos utilizando segmentos de cartilagem costal.

Em trabalho recente, Hutchinson *et al.* (2007) utilizaram um modelo bovino para avaliar a placa de crescimento, acreditando que esta pudesse apresentar fisiologia mais semelhante à da epífise de uma criança em crescimento, que o modelo com camundongos ou ratos. Os condrócitos foram coletados, corados, microdissecados e separados nas quatro regiões de crescimento (ou frações celulares) da placa epifisária e então expostos ao fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), ao GH e ao IGF-I. As quatro regiões foram identificadas como: região 1 ou R – reserva, região 2 ou P –proliferativa, região 3 ou PH – pre-hipertrófica, região 4 ou H - hipertrófica Posteriormente, os condrócitos foram utilizados em culturas celulares e na realização de “real-time RT-PCR” (do inglês, reação em cadeia pela polimerase através de transcrição reversa em tempo real). O hormônio do crescimento isolado não provocou aumento na proliferação de nenhuma das quatro frações celulares; a proliferação estimulada pelo IGF-I foi observada nas células da fração 4 (células hipertróficas), com um aumento de três vezes em relação ao controle; o bFGF isolado não estimulou proliferação em nenhuma fração celular, mas a combinação de IGF-I com bFGF levou ao aumento na proliferação das células das frações 1 e 2 (células de reserva e células proliferativas). A análise das frações celulares pela técnica de “real-time RT-PCR” demonstrou não haver contaminação por osteoblastos ou células do pericôndrio. Estes resultados sugeriram que “o maior estímulo ao crescimento em animais de grande porte é o IGF-I de origem sistêmica e não o hormônio do crescimento”.

O IGF-I é sintetizado no fígado, onde ocorre sua maior expressão e é posteriormente transportado a outros tecidos atuando como um hormônio endócrino (Ohlsson *et al.*, 1998). No tecido ósseo, o IGF-I estimula a formação óssea e a síntese de proteínas, aumenta a replicação de células da linhagem osteoblástica, a proliferação de osteoblastos e fibroblastos, a produção de colágeno pelos osteoblastos, a deposição de matriz óssea e diminui a degradação de colágeno (Thorngreen *et al.*, 1975; Rajaram *et al.*, 1997; Bou-Gharios e Crombrughe, 2008; Rosen, 2008).

Há que se considerar ainda a produção local de IGF-I em tecidos extra-hepáticos. Afora o fígado, o osso é a fonte importante de IGF-I em mamíferos. O IGF-I produzido no tecido ósseo atua como um fator de crescimento local, exercendo, então, efeitos parácrinos específicos. Yakar *et al.* (1999) ressaltaram a importância do IGF-I local, ao observar que o crescimento ósseo longitudinal não foi afetado em camundongos “knockout” para o IGF-I hepático, demonstrando que o IGF-I local e/ou os efeitos diretos do GH podem substituir a ação do IGF-I sistêmico. O IGF-I é encontrado nas células da linhagem osteoblástica, assim como nos condroblastos e nos osteoclastos (Molina, 2006; Bou-Gharios e Crombrughe, 2008).

Embora já tenha sido demonstrado, de maneira consistente, que o IGF-I desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e função do esqueleto, ele também é influenciado pela ação de outros hormônios (além do GH) que atuam no metabolismo ósseo. O PTH, o hormônio tireoideo (TH), o cortisol, estrógenos e andrógenos, entre outros, são capazes de alterar os níveis de IGF-I nas células ósseas, e ainda, como referido por Rosen (2008) em uma das mais

recentes revisões sobre este tema, “tanto os IGFs como os outros componentes deste sistema regulatório estão sob a influência de um grande número de determinantes genéticos, ambientais e hormonais”.

A ação biológica do IGF-I encontra-se ainda sob o controle de seis diferentes proteínas ligantes (IGFBPs), que regulam a disponibilidade do IGF-I ao seu receptor nos tecidos alvo. In vivo, aproximadamente 99 % dos fatores de crescimento semelhantes à insulina do tipo I encontram-se associados a proteínas de ligação na circulação (Baxter *et al.*, 1989; Rechler, 1993). As IGFBPs (1–6) podem inibir a ação do IGF-I ao ligar-se competitivamente, impedindo que o IGF-I ligue-se ao seu receptor; em outras situações, podem aumentar a atividade do IGF-I, ou ainda agir de forma independente. Em humanos, cerca de 80% do IGF-I circulante encontra-se na forma de um complexo ternário, constituído por uma molécula de IGF-I, uma molécula de IGFBP-3 e uma molécula de proteína denominada ALS (do inglês, acid-labile subunit). Nesta forma, a IGFBP-3 retém o IGF-I no sistema vascular, aumentando sua meia-vida e constituindo, assim, um reservatório de IGF-I. A disponibilidade biológica do IGF-I também é influenciada pela ação proteolítica de uma família de proteases específicas, responsáveis pela clivagem das IGFBPs.

Enquanto o IGF-I sistêmico é diretamente dependente do GH, a produção de IGF-I local no tecido ósseo não é tão influenciada pelo GH e também encontra-se sob o controle de diversos outros hormônios, incluindo o PTH (Melmed, 1999; Bikle *et al.*, 2002).

O PTH é um hormônio polipeptídico, constituído por 84 aminoácidos, que tem como principal efeito fisiológico a manutenção da homeostase de cálcio e

fosfato no organismo, além de participar da remodelação óssea, da excreção renal de fosfato e da ativação da vitamina D. Para a manutenção destes processos, a síntese e a liberação de PTH pelas glândulas paratireóides é contínua.

As principais respostas fisiológicas provocadas pelo PTH são mediadas pela sua adesão a receptores da membrana celular nos órgãos-alvo e por múltiplos mecanismos de sinalização celular. Apesar de três receptores para o PTH (PTHR) terem sido identificados (PTHR1, PTHR2 e PTHR3), os principais efeitos fisiológicos do PTH são mediados pelo PTHR1, em especial no sistema esquelético, onde o PTHR1 é encontrado nos osteoblastos. Desta forma, a atividade osteoclástica é indiretamente mediada pelos osteoblastos, levando ao aumento da degradação óssea e à rápida liberação de cálcio pela matriz óssea. Os efeitos do PTH são ainda mediados nos osteoblastos pela síntese ou atividade de diversas proteínas, incluindo o fator de diferenciação osteoclástica (ODF), também conhecido como ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$  B (RANKL) ou ligante da osteoprotegerina. O PTH estimula a expressão desta proteína nas células osteoblásticas, que ao se ligar ao receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$  B (RANK) nas células precursoras hemopoiéticas, estimula a diferenciação destas células em osteoclastos funcionais. No tecido ósseo, o PTH também estimula genes vitais ao processo de degradação da matriz extracelular e remodelação óssea (colagenase 3), a estimulação e recrutamento de osteoclastos (Molina, 2006).

Apesar de exercer uma ação catabólica sobre o tecido ósseo, ao restabelecer os níveis séricos de cálcio, quando administrado em doses baixas e de forma intermitente, o PTH apresenta efeitos anabólicos (Zhou *et al.*, 2001;

Compston, 2007). Os mecanismos envolvidos não estão ainda totalmente esclarecidos, sabe-se, porém, que o PTH ao ligar-se a receptores na membrana de osteoblastos ativa uma cascata de sinalização de enzimas dependentes do AMP cíclico (ou PKA, do inglês, protein kinase A), que por sua vez, levam a ativação da transcrição de genes envolvidos na diferenciação e atividade dos osteoblastos, como *Runx2*, *osteocalcin*, e *ALP*, ou ainda genes envolvidos na atividade osteoclástica (*RANKL*).

IGF-I é considerado um mediador essencial para os efeitos anabólicos ósseos do PTH *in vitro* e *in vivo* por diversos autores (Canalis *et al.*, 1989; Linkhart e Mohan, 1989; Pfeilschifter *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 1995; Bikle *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2005). No entanto, o papel desempenhado pelo eixo GH/IGF-I na mediação dos efeitos anabólicos ósseos do PTH ainda é controverso. Hock e Fonseca (1990) consideraram que o efeito anabólico do PTH encontrava-se diminuído em ratos hipofisectomizados, enquanto outros estudos revelaram uma influência menor do eixo GH/IGF-I (Gunnness e Hock, 1995; Hock e Wood, 1995; Shmidt *et al.*, 1995). A razão desta discordância ainda não está clara, mas os estudos com ratos hipofisectomizados são difíceis de serem conduzidos pela condição física debilitada destes animais e pelas deficiências de outros hormônios ativos no tecido ósseo como o hormônio estimulante da tireóide e também corticosteroides. Mais recentemente, tem-se utilizado o camundongo “knockout” para IGF-I nos estudos das interações esqueléticas entre IGF-I e PTH.

Wang *et al.* (2007) examinaram o papel do IGF-I como mediador das ações do PTH. Camundongos com mutação genética específica no receptor de IGF-I foram tratados com PTH (80 µg/kg de peso vivo por duas semanas) e comparados

a um grupo controle. Tomografia micro-computadorizada, histomorfometria, cultura celular e provas de avaliação genética foram aplicadas às amostras de osso obtidas após a eutanásia. Os resultados revelaram diminuição do volume ósseo, da espessura da camada cortical, da formação de perióstio e da mineralização, indicando que “o receptor para IGF-I (IGF-IR) em osteoblastos maduros estava envolvido como mediador das ações anabólicas do PTH”.

### **3. MÉTODOS**

### **3 MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho experimental**

O projeto de pesquisa foi formulado com o objetivo de testar as seguintes hipóteses:

- 1) Ratos da linhagem dwarf (dw-4/dw-4) fornecem um modelo animal adequado aos estudos sobre a deficiência do eixo GH/IGF-I e seus efeitos na estrutura e função do tecido ósseo.
  
- 2) A deficiência no eixo GH/IGF-I não bloqueia significativamente a resposta do esqueleto ao tratamento com PTH.

O desenho experimental seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), da American Veterinary Medical Association (AVMA) e do Institute of Animal Care And Use Comittee (IACUC), no que se refere à manutenção dos animais, protocolos de anestesia, analgesia e eutanásia. Pesquisador responsável (Principal Investigator - University of Florida) e pesquisador executante foram credenciados pelo IACUC para atuar em experimentos com modelos animais no Animal Care Services (ACS) - University of Florida, sendo que o projeto foi submetido e aprovado pelo mesmo Comitê. O projeto também foi avaliado e aprovado pela Comissão de Análise de Projetos de

Pesquisa – CAPPesq – do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### **3.2 Modelo animal**

O rato (*Ratus norvegicus*) foi selecionado como animal de experimentação nesta pesquisa, uma vez que tem demonstrado ser um modelo bastante útil nos estudos envolvendo distúrbios ósseos e agentes anti-reabsorção óssea, como estrógenos e bifosfonatos. Os resultados obtidos nesta espécie animal têm se mostrado consistentes e transponíveis para a aplicação em seres humanos.

Foram utilizados ratos da linhagem Lewis e dwarf (dw-4/dw-4), ambos provenientes do Laboratório Harlan (UK). Ratos da linhagem dwarf (linhagem mutante anã, dw-4/dw-4) são animais autossômicos recessivos para o gene dw-4, descritos por Hedrich (1990). São resultantes de mutação ocorrida em colônias de ratos da linhagem Lewis e foram avaliados quanto à sua utilização como modelo animal em pesquisas para estudar os efeitos da deficiência do eixo GH/IGF-I sobre o tecido ósseo. Nestes animais mutantes, a síntese de GH encontra-se seletivamente reduzida a cerca de 6% dos níveis normais em fêmeas, e os níveis de IGF-I a cerca de 10% do normal. O crescimento apresenta-se retardado, com índices 40 a 50% menores. As concentrações de outros hormônios tróficos, como hormônio luteinizante (LH), hormônio estimulante da tireóide (TSH), prolactina (PRL) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), não se apresentam alteradas.

### **3.3 Grupos experimentais**

Os animais foram recebidos com 5 semanas de idade e mantidos sob as mesmas condições nutricionais e de manejo, acondicionados aos pares em gaiolas e estantes com sistema de filtragem e exaustão de ar, fornecimento automatizado de água, sob condições de manutenção laboratorial padronizadas com ciclo de 13 horas de luz e 11 horas de escuridão, temperatura de 25°C e umidade de 48%. Em seguida, foram submetidos a período de aclimação durante um mês, tendo sido avaliados diariamente quanto às condições gerais de saúde. O peso corpóreo foi aferido semanalmente, habituando-se os animais ao manuseio pelos pesquisadores.

Os animais foram divididos em quatro grupos para avaliação das alterações nos tecidos ósseos da linhagem mutante e, posteriormente, comparação da resposta ao tratamento com PTH nas duas linhagens. A distribuição dos grupos procedeu-se da seguinte forma:

Grupo 1 - Ratas da linhagem Lewis com padrão de desenvolvimento normal, que receberam medicação placebo a partir de 9 semanas de idade, injetada por via subcutânea, diariamente por 2 semanas, (N=13);

Grupo 2 - Ratas da linhagem mutante dwarf, que receberam medicação placebo a partir de 9 semanas de idade, injetada por via subcutânea, diariamente por 2 semanas, (N=13);

Grupo 3 – Ratas da linhagem Lewis com padrão de desenvolvimento normal, que receberam hPTH 1-34, a partir de 9 semanas de idade, injetada por via subcutânea, diariamente por 2 semanas, (N=10);

Grupo 4 - Ratas da linhagem mutante dwarf, que receberam fragmento de hormônio paratireóideo humano, hPTH 1-34, a partir de 9 semanas de idade, injetado por via subcutânea, diariamente por 2 semanas, (N=7);

### **3.4 Tratamentos**

De acordo com o protocolo anteriormente proposto, todos os tratamentos foram iniciados no momento em que os animais atingiram 9 semanas de idade, utilizando-se as mesmas vias de aplicação, duração e volumes administrados, conforme descrição a seguir.

#### **3.4.1 Tratamento placebo**

A solução placebo foi preparada a partir da dissolução de 0,1 ml de ácido hidrocloreídrico (HCl) em 1000 ml de água destilada apirogênica. Esta solução ácida, foi posteriormente adicionada a 97,9 ml de solução salina estéril e filtrada (filtro 0,22 $\mu$  millipore para adesão de proteínas de baixo peso molecular).

Ao atingir nove semanas de idade, os ratos dos grupos 1 e 2 receberam injeções diárias da solução placebo, na dose de 0,1 ml/kg de peso corpóreo, por via subcutânea, durante duas semanas.

### 3.4.2 Tratamento com PTH

Por ocasião da eutanásia dos animais pertencentes aos grupos 1 e 2 (também utilizados como grupos controle para os grupos 3 e 4), foram obtidas amostras de soro. As amostras de sangue, coletadas através da artéria aorta abdominal, foram mantidas em temperatura ambiente para coagulação, durante 20 minutos e então centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm. Em seguida, foram acondicionadas em tubos de ensaio fechados e mantidas em banho-maria por 1 hora, à temperatura de 50 °C, distribuídas em alíquotas de 2 ml em tubos Eppendorf e estocadas à temperatura de -80 °C até a sua utilização. Especial cuidado foi observado na individualização das amostras. As amostras de soro obtidas de ratos Lewis foram utilizadas somente no preparo de soluções para ratos Lewis e, da mesma forma, as amostras de soro provenientes de ratos dwarf, utilizadas em soluções para animais da mesma linhagem.

Fragmentos de PTH com terminal amino têm sido utilizados como potentes agentes anabólicos no tratamento de osteoporose (Fraher, 1999). Neste estudo, foi utilizado o fragmento de PTH humano, hPTH (1-34) sintético, proveniente do Laboratório Bachem Inc. (Torrance, CA), diluído no veículo de solução salina ácida, ao qual se adicionou 2 ml soro inativado por calor, de acordo com a linhagem de procedência, Lewis ou dwarf.

Desta forma, as ratas pertencentes aos grupos 3 e 4, receberam injeções diárias de hPTH (1-34), na dose de 50 µg/kg de peso corpóreo, por via subcutânea, durante duas semanas.

### **3.4.3 Marcadores histológicos**

Compostos de fluorocromo, declomicina e calceína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), foram administrados como marcadores da formação de tecido ósseo nas análises histomorfométricas. As administrações foram realizadas por via subcutânea, na dose de 15 mg/kg, no 10<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> dias antecedentes à eutanásia, respectivamente, de forma a marcar as superfícies com formação ativa de tecido ósseo.

### **3.5 Eutanásia**

Ao término do experimento, foi realizada eutanásia, segundo os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Medicina Veterinária – American Veterinary Medical Association - AVMA Guidelines on Euthanasia - em 2007, e aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Comittee (IAACUC). Os animais foram submetidos à anestesia geral com quetamina (Ketaset® – Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, IA) e xilazina (AnaSed® – Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA), nas doses de 50 e 10 mg/kg, respectivamente.

Após constatação de adequado plano anestésico, foi realizada exsanguinação e coleta de sangue através da artéria aorta abdominal para obtenção de valores de hematócrito e análises séricas de IGF-I, seguida de deslocamento tronco-cerebral para confirmação de óbito.

### **3.6 Exame necroscópico e anatomopatológico**

Foi realizado exame necroscópico para identificação de possíveis alterações patológicas, previamente à retirada de tecidos para análise. A amostra de sangue obtida foi utilizada para realização de hematócrito logo após a eutanásia, com aparelho de microhematócrito (Clay Adams, Parsippany, NJ), e também para obtenção de alíquotas de soro, mantidas à temperatura de -80°C, para posteriores análises bioquímicas e biomoleculares.

#### **3.6.1 Distribuição de tecidos e amostras por ocasião da necrópsia**

Foram coletadas ambas as tíbias, fêmures direitos, as extremidades proximais dos fêmures esquerdos, as primeiras e segundas vértebras lombares, e as quintas e sextas vértebras caudais de cada animal. Estas amostras tiveram todo tecido músculo-esquelético removido e os espécimes de osso destinados à realização de exame histomorfométrico (tíbias e vértebras), foram acondicionados em recipientes com solução de formalina tamponada com fosfato (pH= 7,4) por 24 horas, transferidos para recipientes com etanol 70 % e, posteriormente, submetidos a processo de descalcificação. Os fêmures direitos foram mantidos em solução de formalina até obtenção dos valores de comprimento do osso em seu eixo longitudinal e realização da tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (pQCT). As extremidades proximais dos fêmures esquerdos, assim como fragmentos de lobos hepáticos, foram acondicionados em tubos de

ensaio e mantidos em recipiente contendo nitrogênio líquido, até posterior manutenção em freezer à temperatura de -80 °C.

### **3.7 Avaliação das amostras**

Avaliação do peso corpóreo e comprimento femoral, tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (pQCT), análise histomorfométrica e dosagem sérica de IGF-I foram os métodos aplicados para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a massa e a densidade de osso cortical e esponjoso, a formação e a reabsorção ósseas, e os níveis endógenos de IGF-I nos diferentes grupos de experimentação.

#### **3.7.1 Avaliação do peso corpóreo e comprimento femoral**

A avaliação do peso corpóreo e do comprimento femoral foi realizada como uma primeira análise, indicativa dos efeitos da deficiência no eixo GH/IGF-I sobre o desenvolvimento geral e, posteriormente, das diferentes respostas aos tratamentos aplicados nas duas linhagens distintas consideradas na pesquisa. O peso corpóreo foi avaliado semanalmente em todos os grupos, utilizando-se a mesma balança de precisão. Os fêmures direitos foram mensurados com paquímetro digital eletrônico (Fisher Scientific), considerando-se toda a extensão, estipulando-se o trocanter maior e a cabeça femoral como limites proximais e as extremidades dos côndilos femorais como limites distais.

### 3.7.2 Tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (pQCT)

A tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (peripheral quantitative computed tomography – pQCT) foi utilizada por ser um método desenvolvido para medidas do esqueleto apendicular que, além de fornecer amplo leque de dados, permite avaliar isoladamente o osso cortical e o trabecular.

A obtenção de imagens foi realizada nos fêmures direitos, utilizando-se equipamento Stratec XCT Research M instrument (Norland Medical Systems, Fort Atkinson, WI), a uma distância de 5 mm e 4 mm da extremidade distal do fêmur, para medidas estruturais de osso trabecular em ratos das linhagens Lewis e dwarf, respectivamente. Foi considerada, desta forma a influência das diferentes medidas de comprimento dos fêmures sobre a localização das regiões de interesse nas diferentes linhagens de ratos. Semelhantemente, na avaliação do osso cortical, as imagens foram tomadas a uma distância de 16 mm e 14 mm para ratos Lewis e dwarf, respectivamente.

Os parâmetros avaliados na região metafisária dos fêmures foram:

- conteúdo mineral ósseo total (total BMC – total bone mineral content, mg/mm);
- densidade óssea total (total BMD - total bone mineral density, mg/cm<sup>3</sup>);
- conteúdo mineral ósseo trabecular (trabecular BMC - trabecular mineral content, mg/mm);
- densidade mineral óssea trabecular (trabecular BMD - trabecular mineral density, mg/cm<sup>3</sup>);
- área total (total area, mm<sup>2</sup>);
- área trabecular (trabecular area, mm<sup>2</sup>).

Na diáfise femoral, os valores obtidos para análise do osso cortical foram:

- conteúdo mineral ósseo total (total BMC - total bone mineral content, mg/mm);
- densidade óssea total (total BMD - total bone mineral density, mg/cm<sup>3</sup>);
- conteúdo mineral ósseo cortical (cortical content, mg/mm);
- densidade mineral óssea cortical (cortical density, mg/cm<sup>3</sup>);
- área cortical (cortical area, mm<sup>2</sup>);
- espessura cortical (cortical thickness, mm);
- circunferência periosteal (periosteal circumference, mm);
- circunferência endosteal (endosteal circumference, mm).

### **3.7.3 Análise histomorfométrica**

A histomorfometria é um método que fornece consistente informação quantitativa sobre a organização microscópica e estrutura do tecido ósseo através de análise assistida por computador das imagens dos cortes histológicos. Os valores histomorfométricos do tecido ósseo procedentes dos segmentos proximais das tíbias e as vértebras lombares foram analisados nos quatro diferentes grupos pertinentes ao estudo.

Os segmentos proximais das tíbias e as vértebras lombares passaram por processo de desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol a 70 %, 95 % e 100 %. A seguir, foram descalcificadas, embebidas em

metilmetacrilato modificado e seccionadas longitudinalmente com micrótomos Jung 2065 e 2165 (Leica Corp., Rockleigh, NJ) nas espessuras de 4 e 8 mm.

Os cortes com 4 mm de espessura foram corados de acordo com o método de Van Kossa, utilizando-se tetracromo como corante (Polysciences, Warrington, PA), enquanto os cortes com 8 mm de espessura permaneceram sem coloração para posterior obtenção de dados relativos à marcação com fluorocromos sob análise microscópica com luz ultra-violeta. As medidas do tecido ósseo foram realizadas no osso esponjoso das metáfises proximais das tíbias, iniciando-se a uma distância de 1 mm da junção da placa de crescimento com a região metafisária, excluindo-se a região esponjosa primária. Nas vértebras lombares, a região de interesse (ROI – region of interest) foi definida na porção central dos corpos vertebrais, a uma distância de 0.5 mm da junção das placas de crescimento com a região metafisária (comprimento máximo de 3 mm) e, lateralmente, à distância de 0.25 mm do osso cortical. Todos os dados foram obtidos através do sistema Bioquant Bone Morphometry System (R&M Biometrics Corp., Nashville, TN) e Osteomeasure System (Osteometrics, Inc., Atlanta, GA). Os índices morfométricos utilizados seguiram a nomenclatura padronizada por Parfitt (1987) e adotada pelo Comitê Científico da *American Society of Bone and Mineral Research*.

### **3.7.3.1 Vértebras lombares**

Foram avaliados os seguintes parâmetros histomorfométricos estruturais nos cortes das vértebras lombares com 4 mm de espessura:

- Volume trabecular – BV/TV (%): volume de osso trabecular ou esponjoso, expresso como uma porcentagem do volume total ocupado pela medula e trabéculas.
- Número trabecular - Tb.N (n°/mm): número de traves ou trabéculas ósseas, por milímetro de tecido ósseo, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular.
- Espessura trabecular – Tb.Th ( $\mu\text{m}$ ): e a espessura das traves ou trabéculas ósseas, expressa em micra.
- Separação ou distância trabecular ( $\mu\text{m}$ ): é a distância entre as traves ou trabéculas ósseas, expressa em micra.
- Volume osteóide – OV/BV (%): volume ocupado pelo osso osteóide (não mineralizado), expresso como porcentagem do volume ocupado pelo osso trabecular total (mineralizado e não mineralizado).
- Superfície osteóide - OS/BS (%): porcentagem da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide, em relação à superfície trabecular total.
- Superfície osteoblástica – Ob.S/BS (%): porcentagem da superfície trabecular que apresenta osteoblastos, em relação à superfície trabecular total ou perímetro total de osso esponjoso .
- Superfície osteoclástica – Oc. S/BS (%): porcentagem da superfície trabecular que apresenta osteoclastos, em relação à superfície trabecular total.

Os parâmetros dinâmicos, índices de formação óssea, avaliados através da marcação com fluorocromo, foram obtidos a partir dos cortes com 8 mm de

espessura das vértebras lombares não corados. Foram mensuradas, através do sistema Osteomeasure, as porcentagens de superfícies de osso trabecular com dupla marcação por fluorocromo:

- Taxa de aposição mineral – MAR ( $\mu\text{m}/\text{dia}$ ): espessura do novo osso mineralizado depositado na unidade de tempo, expressa em micra por dia. É considerada um índice de atividade osteoblástica.
- Superfície mineralizante - MS/BS (%): é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta dupla marcação por fluorocromos.
- Taxa de formação óssea – BFR/BS ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$ ): foi calculada multiplicando-se a superfície mineralizante (MS/BS) pela taxa de aposição mineral (MAR).

### **3.7.3.2 Tíbias**

Nos segmentos proximais das tíbias (cortes com 4 mm de espessura), foram avaliados os parâmetros histomorfométricos estruturais: volume trabecular, número trabecular, espessura trabecular e distância trabecular.

Como parâmetro dinâmico, foi avaliado o crescimento ósseo longitudinal ( $\mu\text{m}/\text{dia}$ ), na área de ossificação endocondral, da zona proliferativa até a linha marcada pelo fluorocromo calceína, administrado no terceiro dia antecedente a eutanásia, correspondente à transição da zona esponjosa primária.

As extremidades das porções distais das tíbias, por sua vez, foram desidratadas e tiveram a gordura tecidual removida através de tratamento com

etanol a 100 % e acetona, sendo posteriormente descalcificadas e embebidas em estireno monomérico, que se polimeriza em resina de polyester (Tap Plastics, San Jose, CA). As diáfises tibiais foram então seccionadas a 1-2 mm proximais à junção tibiofibular, em cortes transversais com aproximadamente 150 mm de espessura, utilizando-se uma serra de baixa velocidade (Isomet low-speed saw - Buehler, Lake Bluff, IL). Estes cortes foram desgastados até atingir a espessura de 50 mm para realização das medidas histomorfométricas do osso cortical, também com o sistema Osteomeasure, que incluíram parâmetros semelhantes aos avaliados para o osso trabecular:

- Área de osso cortical ( $\mu\text{m}^2$ ): calculada através da subtração da área correspondente à medula óssea da área total de osso cortical.
- Espessura da área de osso cortical ( $\mu\text{m}$ ): obtida através da mensuração da distância entre a superfície periosteal e a superfície endocortical, em quatro locais equidistantes de cada corte.
- Taxa de aposição mineral – MAR ( $\mu\text{m}/\text{dia}$ ): obtida através da divisão da distância entre as marcações por fluorocromo pelo intervalo em dias entre as administrações dos marcadores.
- Superfície mineralizante - MS/BS (%): índice de formação óssea ativa, porcentagem da superfície com dupla marcação por fluorocromos.
- Taxa de formação óssea – BFR/BS ( $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$ ): calculada para ambas as superfícies, periosteal e endocortical, multiplicando-se MS/BS pela MAR.

### 3.7.4 Dosagem sérica de IGF-I

O método ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) foi realizado para se obter os valores dos níveis séricos de IGF-I em todos os animais incluídos na pesquisa. Foi utilizado o *kit* Rat/Mouse IGF-I ELISA, produzido pelo Laboratório IDS – Immunodiagnostic systems para determinação quantitativa de IGF-I em soro de ratos ou camundongos, através de ensaio imunoenzimométrico (IEMA).

Neste procedimento, as amostras foram incubadas brevemente com o reagente para inativar as proteínas de ligação ao IGF-I e obter a diluição adequada para o ensaio. O anticorpo monoclonal purificado anti-IGF-I de ratos encontra-se revestindo a superfície interna de poliestireno das cubetas da placa de titulação (fase sólida ou anticorpo de captura). Diluições das amostras foram então incubadas, juntamente com anticorpo policlonal biotinilado de coelho anti IGF-I de ratos, nas cubetas revestidas com o anticorpo e movimentadas por duas horas à temperatura ambiente. As cubetas foram então lavadas e a enzima peroxidase, obtida de raiz-forte marcada com avidina, foi adicionada, ligando-se ao complexo de biotina. Após lavagem adicional, um componente substrato cromogênico simples (formulação de tetrametil-benzidina) foi adicionado para promover coloração. A absorbância da reação foi avaliada através de leitura da placa de microtitulação, sendo a intensidade da coloração desenvolvida diretamente proporcional à quantidade de IGF-I de ratos presente na amostra. A concentração sérica de IGF-I foi expressa em ng/mL.

### **3.8 Critérios de exclusão**

Foram considerados critérios de exclusão:

- Estado clínico debilitado e indicativo de possíveis interferências e/ou distorções nas avaliações a serem realizadas posteriormente (desenvolvimento geral, níveis séricos e amostras de tecidos);
- Mutilação entre os animais por comportamento agressivo.

Três animais, pertencentes ao grupo 4, vieram a óbito antes do término do período de experimentação, sem causa determinada pela necrópsia e exame anátomo-patológico e, conseqüentemente, seus dados não foram incluídos no estudo.

### **3.9 Análise estatística**

Os resultados estatísticos descritivos foram aplicados na construção de gráficos representando a média  $\pm$  desvio padrão para cada grupo, utilizando-se o sinal asterístico (\*) para designar ocorrência diferença estatística significativa.

O teste estatístico utilizado na comparação dos resultados entre os grupos consistiu de análise de variância (ANOVA), seguida de análise post-hoc de Bonferroni, (SAS Software Institute Inc.). As diferenças foram consideradas significantes para um valor de  $p < 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do peso corpóreo e comprimento femoral

Os dois primeiros grupos foram utilizados inicialmente na avaliação da linhagem de ratos dwarf como modelo animal para o estudo dos efeitos da deficiência do eixo GH/IGF-I sobre o esqueleto. Diferenças fenotípicas evidentes puderam ser observadas entre as duas linhagens de ratos, Lewis e dwarf, já no período de aclimação. Os animais da linhagem Lewis exibiram tamanho e peso corpóreo superiores do que os da linhagem dwarf (Figuras 1 e 2).

Por ocasião da eutanásia, ao se comparar os animais dos grupos 1 e 2, ambos submetidos a tratamento placebo, pode-se observar que o peso corpóreo médio dos ratos Lewis era 52,9 % maior que dos ratos dwarf ( $187,6 \pm 10,9$  g vs.  $122,7 \pm 5,6$  g,  $p < 0,0001$ ) e o comprimento dos fêmures esquerdos mostrou-se 14,8 % mais longo ( $31,32 \pm 0,42$  mm vs.  $27,28 \pm 0,32$  mm).

No entanto, ao se comparar os valores dos animais pertencentes aos grupos 3 e 4, observa-se que o tratamento com PTH não afetou de forma significativa o peso corpóreo dos animais, independentemente da linhagem, Lewis ou dwarf, como pode ser observado no gráfico a seguir (gráfico 1).

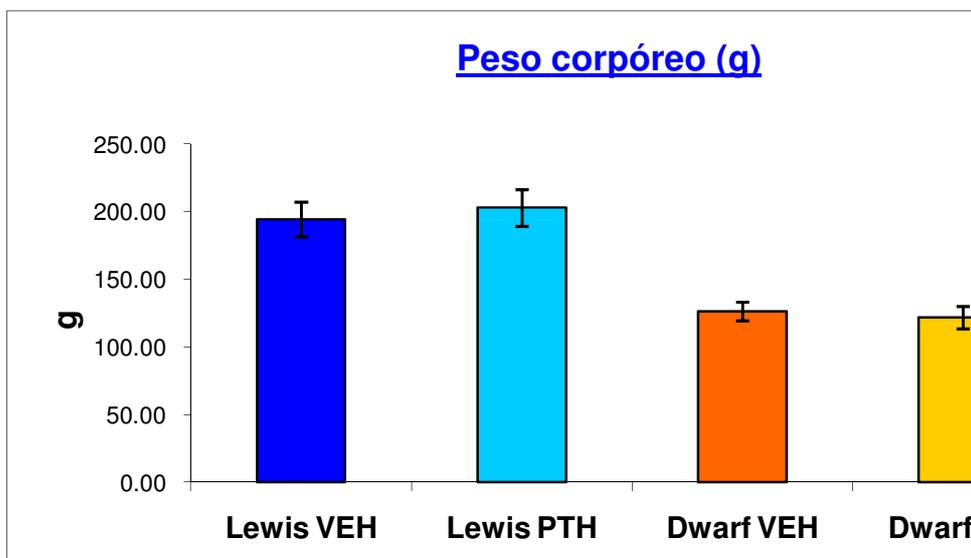


**Fig. 1** Ratas das linhagens Lewis (à dir.) e dwarf (à esq.) durante avaliação semanal do peso corpóreo.



**Fig. 2** Animal da linhagem dwarf (à dir.), com desenvolvimento inferior ao da linhagem Lewis (à esq.)

**Gráfico 1** - Peso corpóreo. Diferença significativa entre ratos Lewis e dwarf ( $p < 0,0001$ ), conforme já observado, mas não entre os animais que receberam tratamento placebo (VEH) e PTH, tanto na linhagem Lewis como dwarf.



#### 4.2 Tomografia óssea quantitativa periférica computadorizada (pQCT)

Em relação aos grupos 1 e 2, as análises realizadas através de pQCT nas metáfises femorais distais (Fig. 3) revelaram que os mais importantes parâmetros estruturais do tecido ósseo trabecular eram significativamente inferiores nos ratos dwarf quando comparados aos ratos Lewis. O conteúdo mineral ósseo total (total BMC), a densidade óssea total (total BMD), o conteúdo mineral ósseo trabecular (trabecular BMC) e a densidade mineral óssea trabecular (trabecular BMD) apresentaram diferença significativa, com  $p < 0,0001$ .

Considerando-se os mesmos parâmetros estruturais do tecido ósseo trabecular na avaliação dos grupos 3 e 4, os resultados obtidos nos animais submetidos ao tratamento com PTH foram superiores aos observados nos grupos não tratados, tanto para a linhagem dwarf como para a linhagem Lewis, apresentando diferença significativa com valor de  $p < 0,0001$  (gráficos 2 a 7). Na análise post-hoc, os valores da densidade trabecular apresentaram interação entre grupo e tratamento, sendo que os animais da linhagem dwarf submetidos ao tratamento com PTH apresentaram um ganho maior do que o observado nos animais da linhagem Lewis tratados com PTH.

**Gráfico 2**

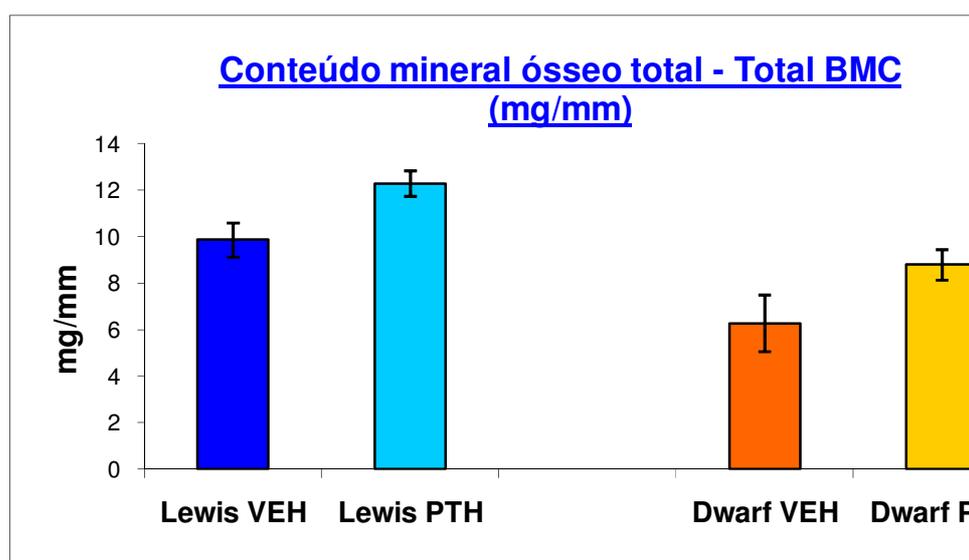


Gráfico 3

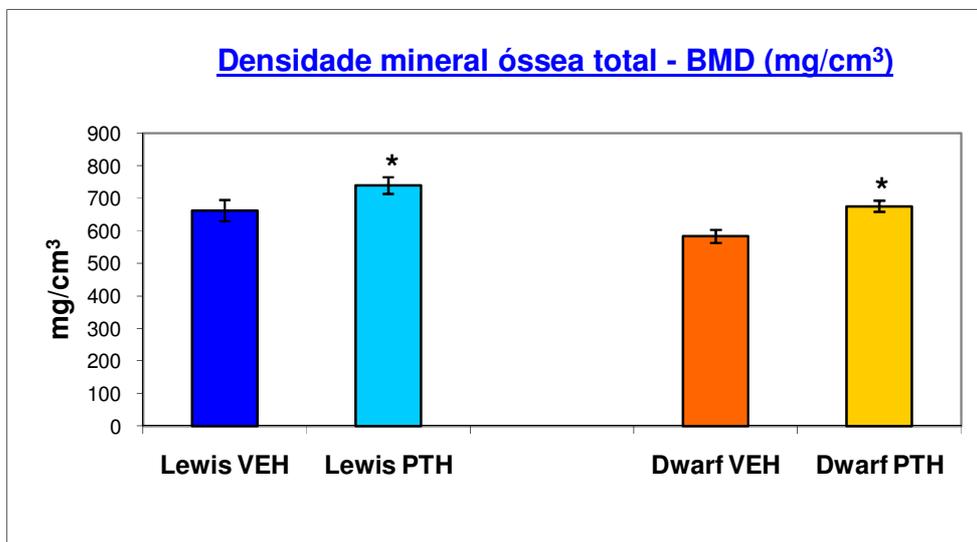


Gráfico 4

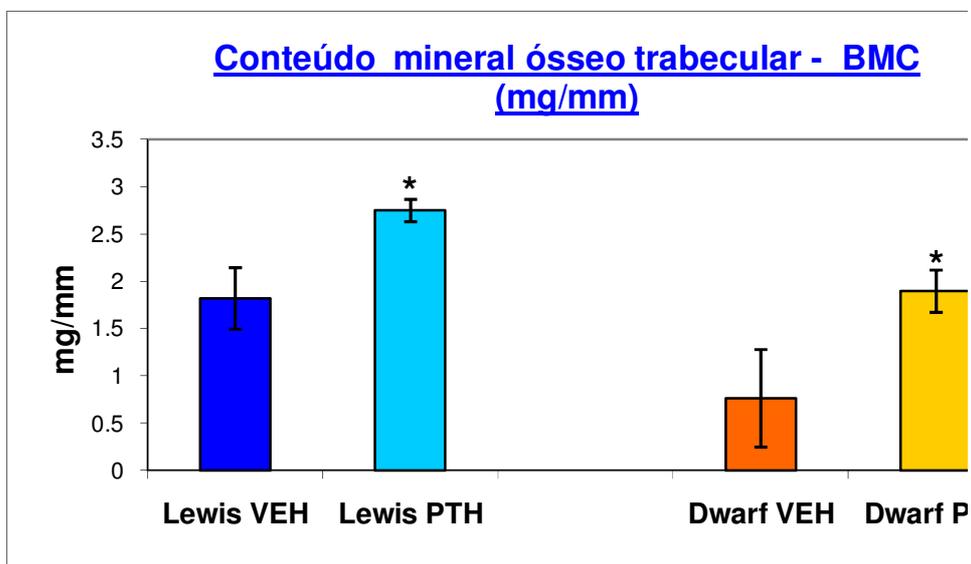


Gráfico 5

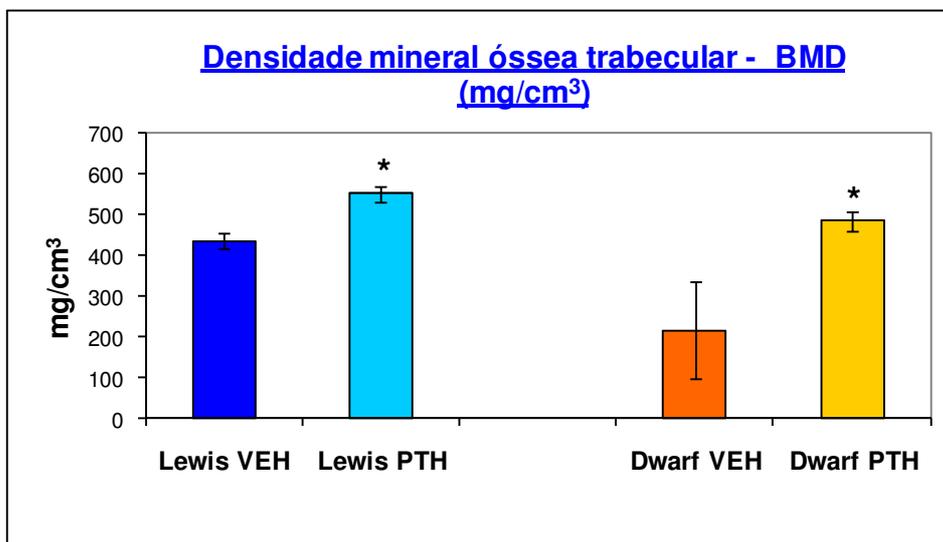
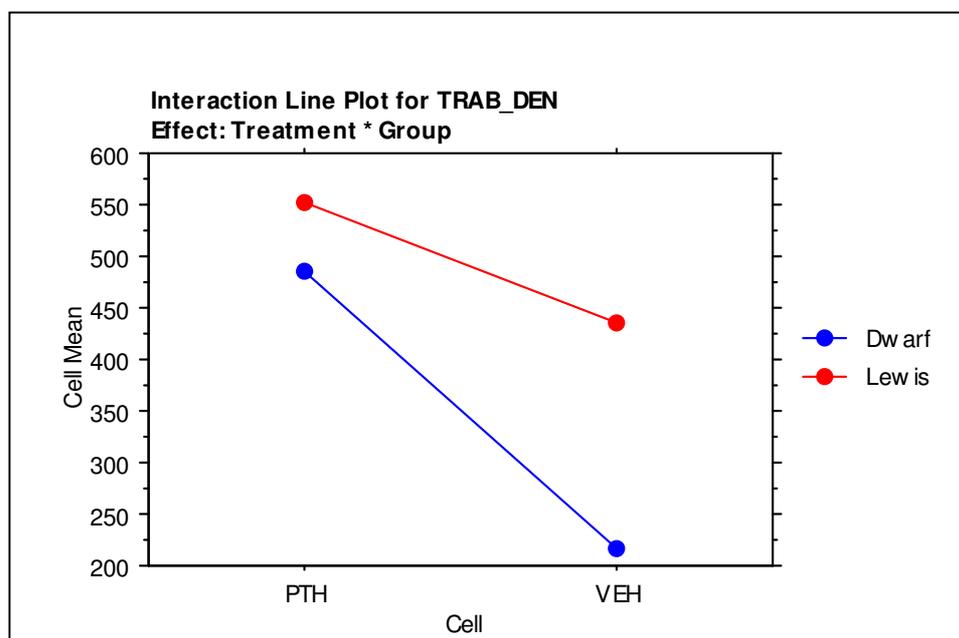


Gráfico 6



**Linhas de interação tratamento \* grupo para a densidade trabecular – análise post-hoc**

Gráfico 7

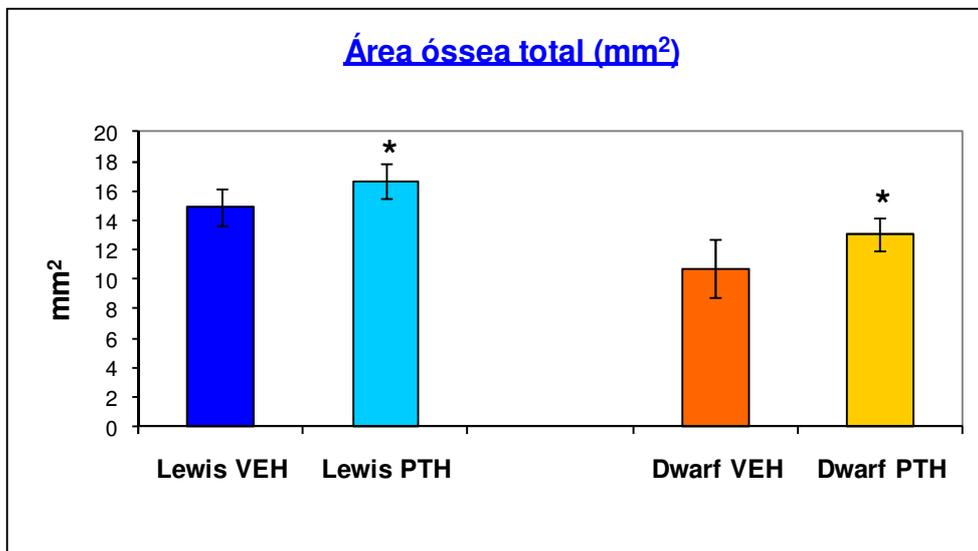
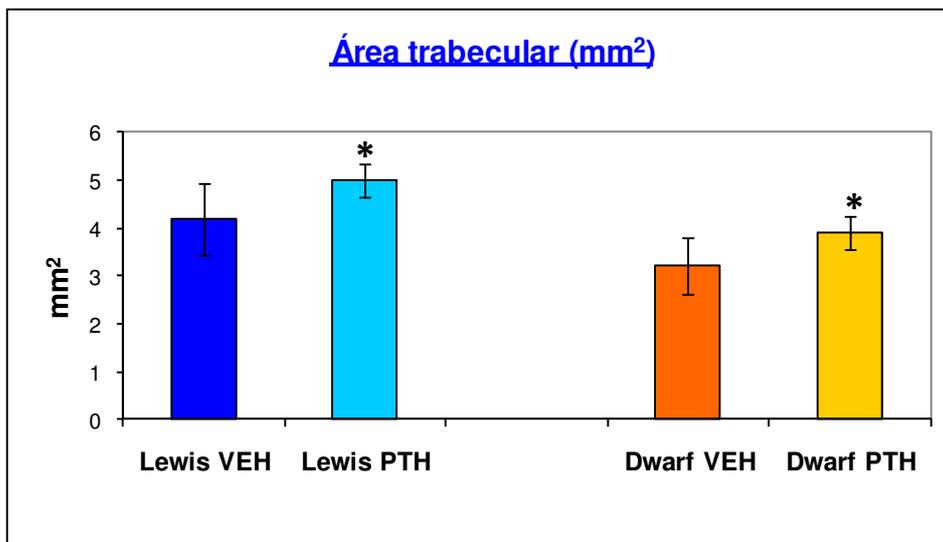


Gráfico 8



Quanto ao osso cortical, os valores obtidos nas diáfises femorais (Fig. 4) dos animais dos grupos 1 e 2 também mostraram diferenças significantes entre as duas linhagens. Os parâmetros conteúdo mineral ósseo total (total BMC), densidade óssea total (total BMD), conteúdo mineral ósseo cortical (cortical BMC), área cortical, espessura cortical, circunferência endosteal e circunferência periosteal mostraram-se significativamente inferiores nos animais da linhagem dwarf do que na linhagem Lewis, com exceção da densidade mineral óssea cortical (cortical BMD). Ao se considerar os parâmetros do tecido ósseo cortical nos grupos 3 e 4, praticamente todos os valores obtidos nas diáfises femorais não demonstraram efeito algum do tratamento com PTH em nenhum dos grupos, com exceção da densidade mineral óssea cortical (cortical BMD), que se mostrou aumentada ( $p < 0,003$ ), como pode-se observar nos gráficos 9 a 16.

**Gráfico 9**

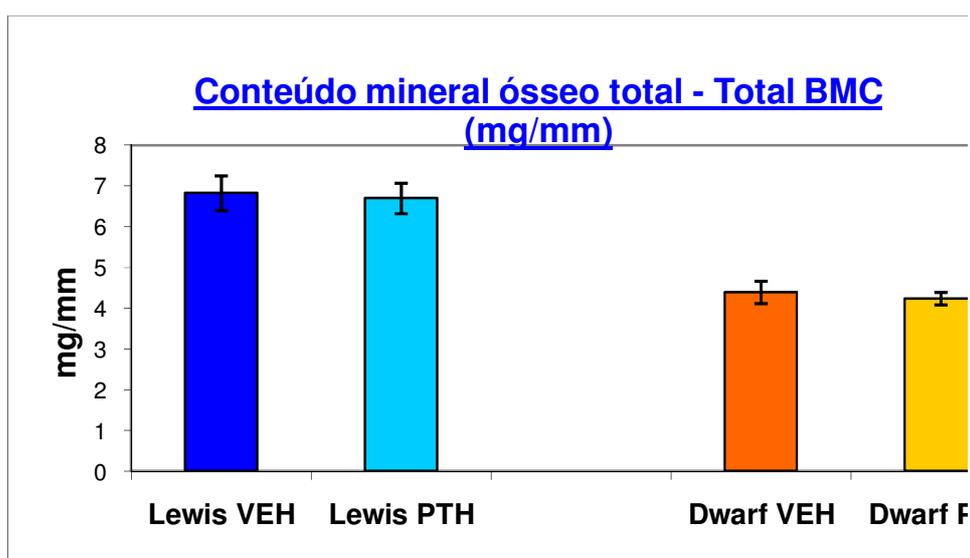


Gráfico 10

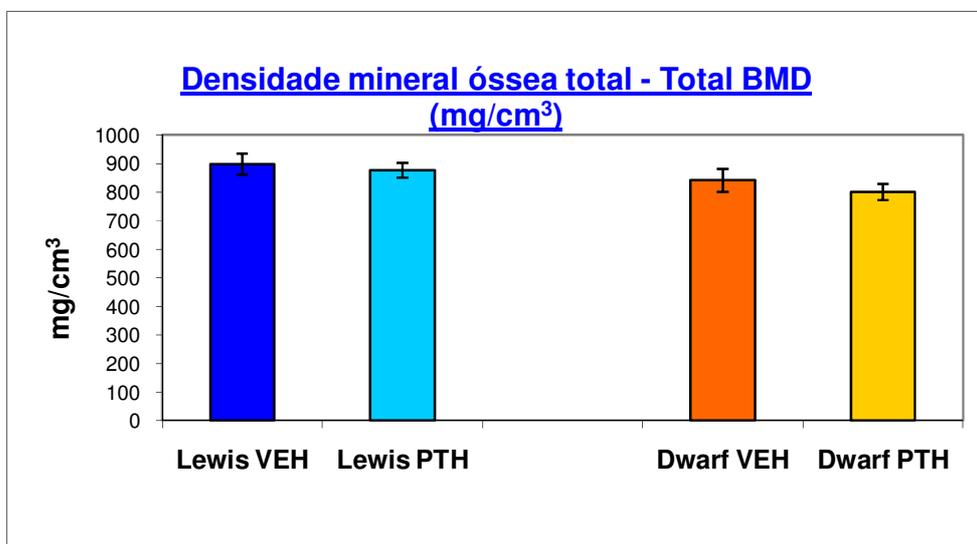


Gráfico 11

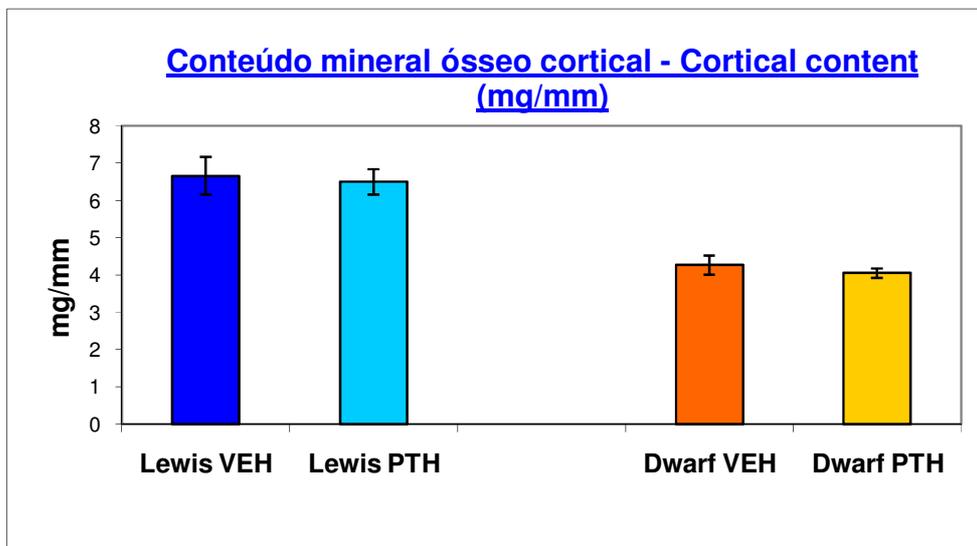


Gráfico 12

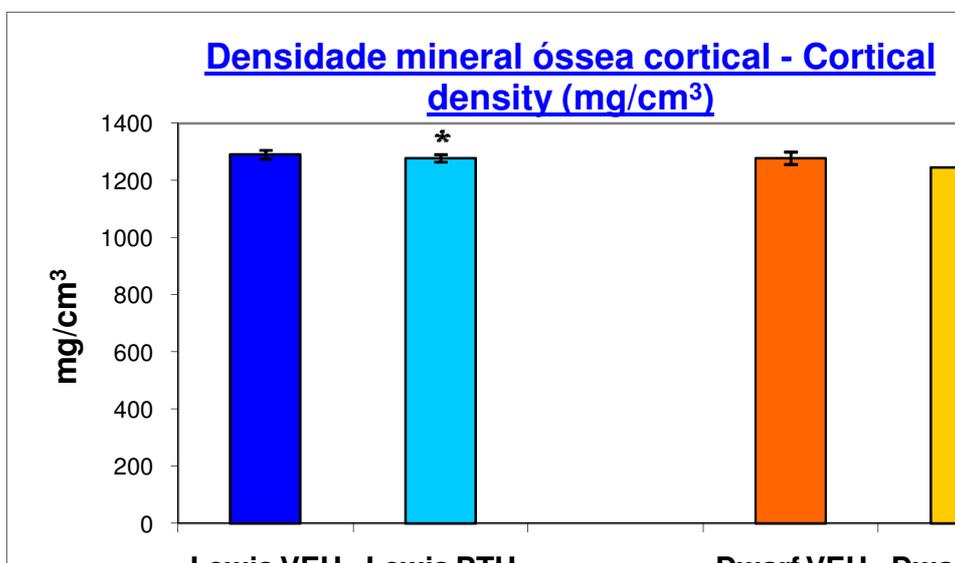


Gráfico 13

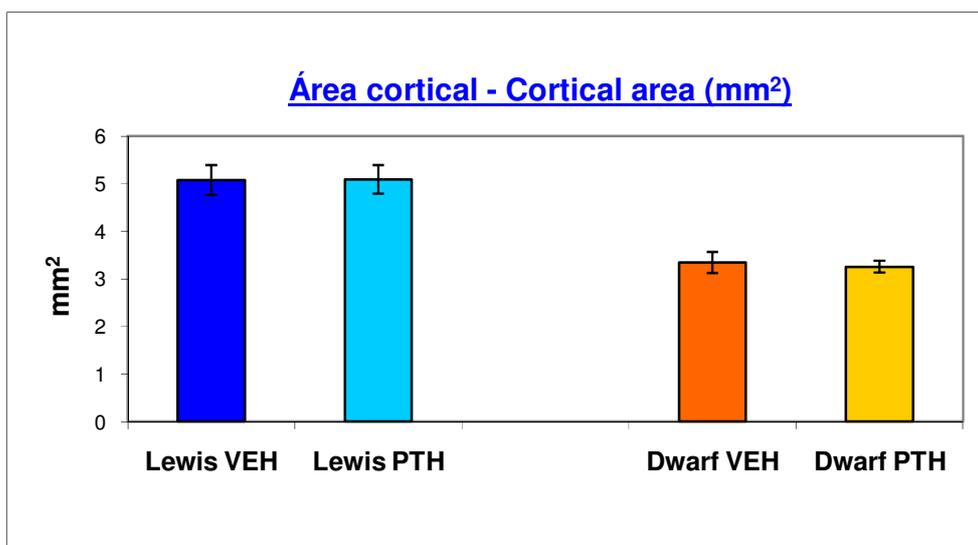


Gráfico 14

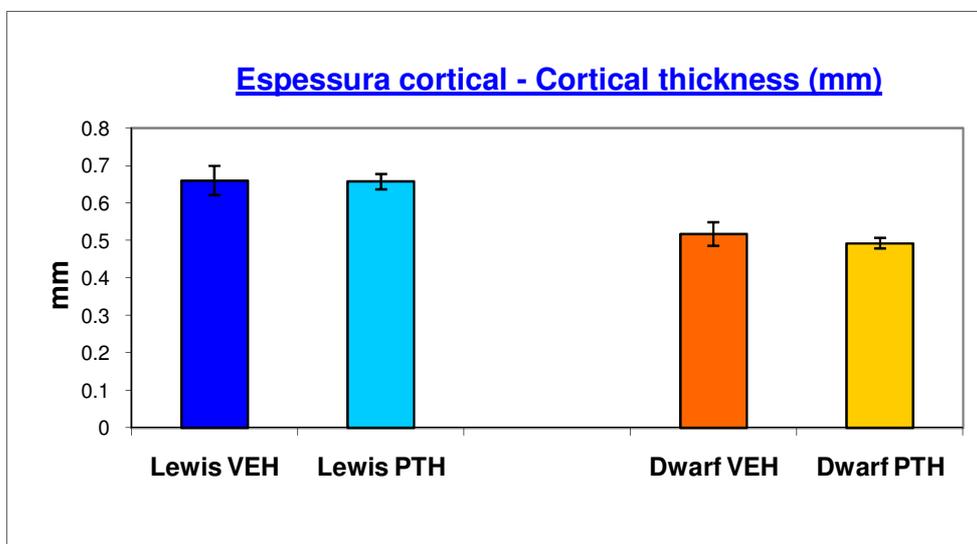


Gráfico 15

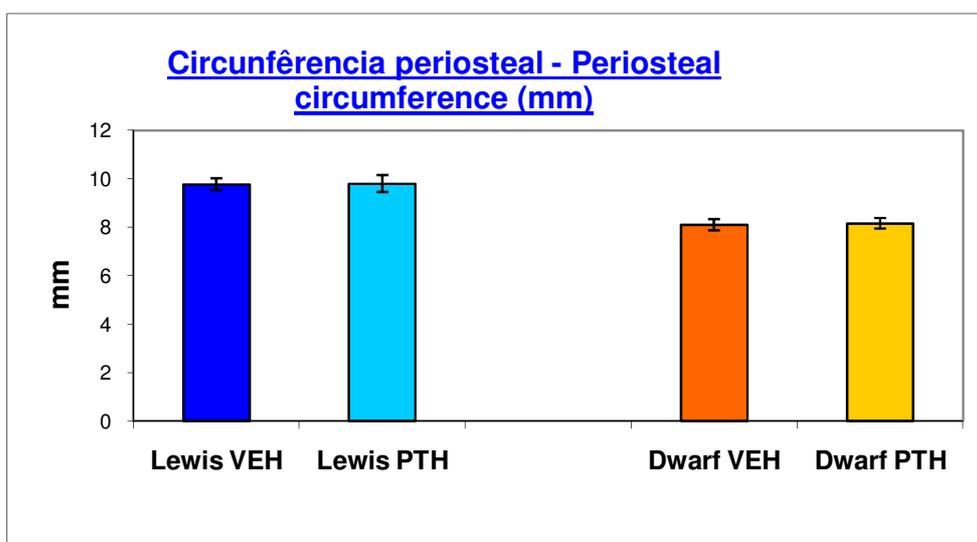


Gráfico 16

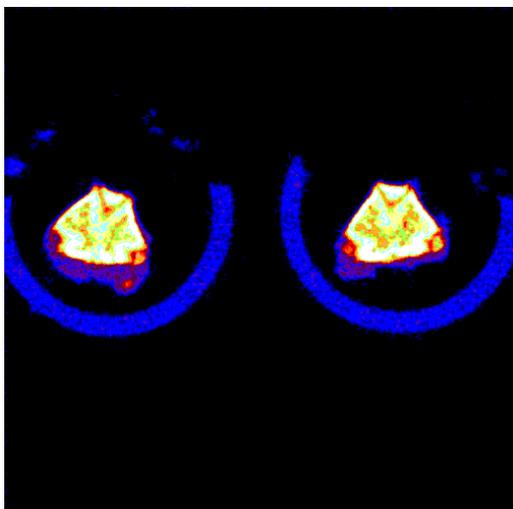
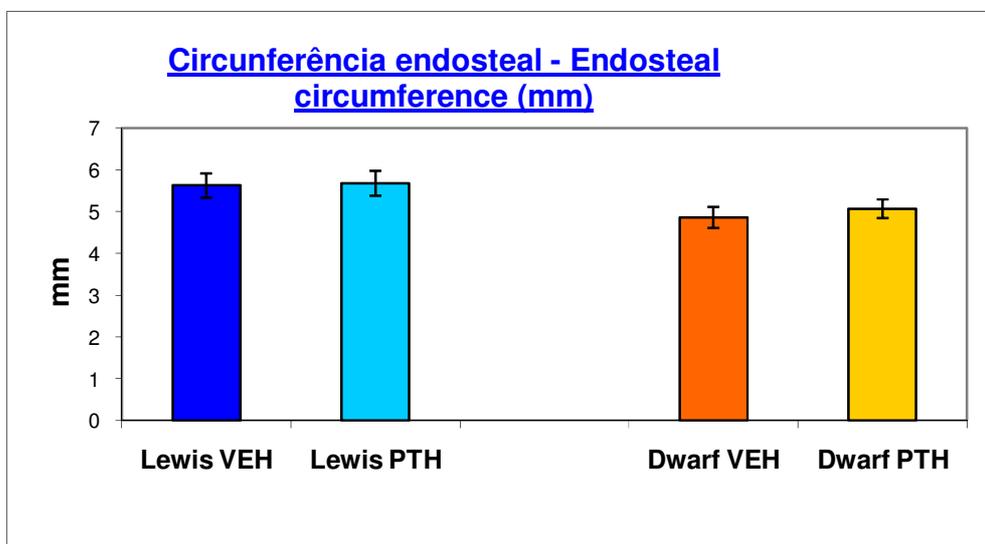


Fig. 3 - Imagem da região metafisária do fêmur obtida por pQCT.

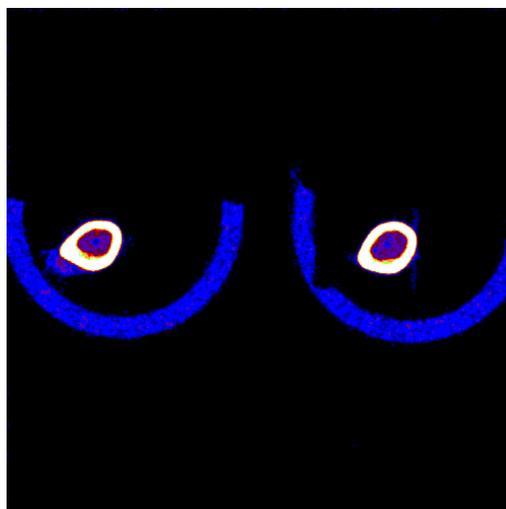
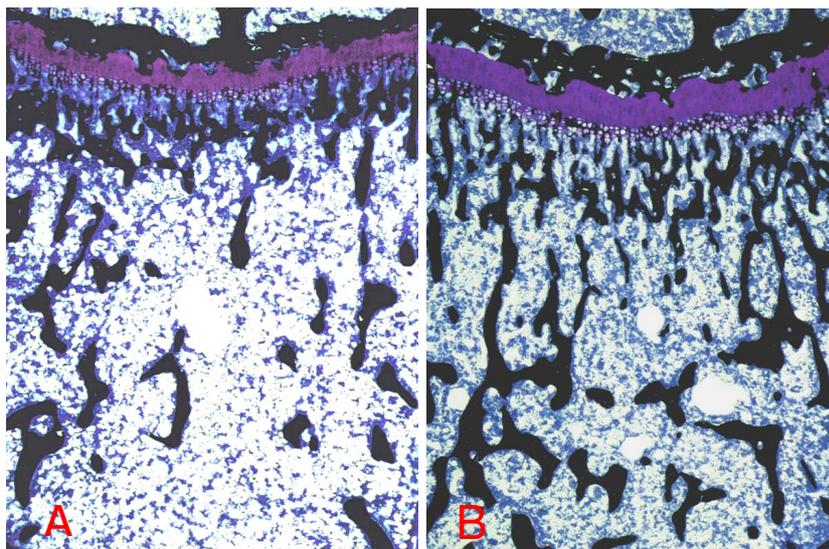


Fig. 4 - Imagem da região diafisária do fêmur obtida por pQCT.

### 4.3 Análise histomorfométrica

O volume trabecular mostrou-se notadamente diminuído nos animais da linhagem dwarf em relação aos da linhagem Lewis, ao se comparar os animais dos grupos 1 e 2 ( $1,2 \pm 1,4\%$  vs.  $18,9 \pm 3,3\%$ ,  $p < 0,0001$ ).

O número de trabéculas e a espessura trabecular também mostraram-se diminuídos nos ratos dwarf, enquanto a separação trabecular apresentou-se aumentada.



**Fig. 5 - Imagens das metáfises proximais das tíbias de animais dwarf (A) e Lewis (B). Evidente diminuição do número e da espessura das trabéculas ósseas (coradas em preto - Van Kossa), indicando osteopenia trabecular nas ratas dwarf.**

O crescimento ósseo longitudinal mostrou-se três vezes superior nos ratos Lewis em comparação aos ratos dwarf ( $72,1 \pm 4,9 \mu\text{m/d}$  vs.  $24,5 \pm 10,7 \mu\text{m/d}$ ,  $p < 0,0001$ ).

Ao se considerar os parâmetros de superfície óssea trabecular, não houve diferença significativa entre os valores médios de superfície osteóide, superfície osteoblástica e superfície osteoclástica entre os grupos 1 e 2.

No entanto, a taxa de aposição mineral (MAR) no osso trabecular, um índice de atividade osteoblástica, mostrou-se significativamente diminuída nos animais da linhagem dwarf em comparação aos da linhagem Lewis ( $0,9 \pm 0,2 \mu\text{m/d}$  vs.  $1,5 \pm 0,3 \mu\text{m/d}$ ,  $p < 0,0005$ ).

A área cortical estava marcadamente diminuída nos ratos dwarf em relação aos ratos Lewis ( $1,9 \pm 0,1 \text{ mm}^2$  vs.  $3,2 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,0001$ ), da mesma forma que a espessura cortical ( $488,9 \pm 19,7 \mu\text{m}$  vs.  $682,6 \pm 35,4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ). Índices de crescimento do osso cortical, como taxas de aposição mineral endocortical e periosteal, e taxas de formação óssea endocortical e periosteal, também apresentaram valores significativamente mais baixos.

O tratamento com PTH provocou aumento significativo no volume trabecular nas vértebras lombares dos ratos da linhagem Lewis ( $26,4 \pm 6,4 \%$  vs.  $37,0 \pm 6,4\%$ ,  $p < 0,0001$ ) e dwarf ( $15,9 \pm 4,4 \%$  vs.  $25,1 \pm 6,7\%$ ,  $p < 0,003$ ), pertencentes aos grupos 3 e 4 respectivamente, quando comparado ao tratamento placebo. Provocou ainda aumento na espessura trabecular e diminuição na separação trabecular nestas mesmas estruturas (gráficos 17 a 20).

Gráfico 17

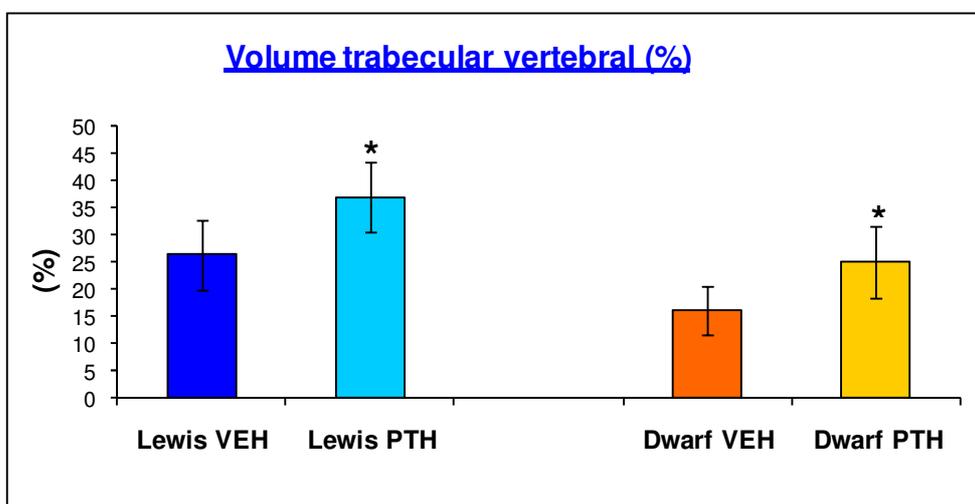


Gráfico 18

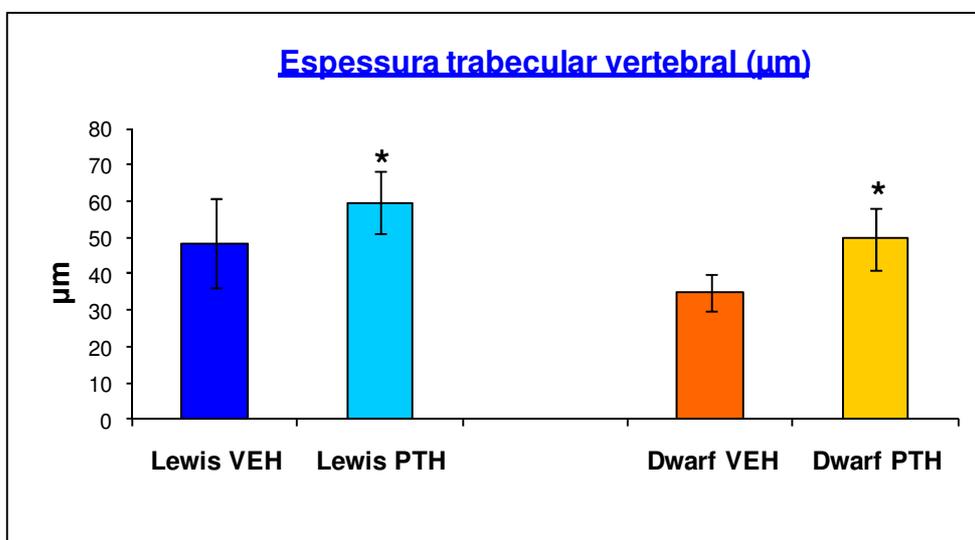


Gráfico 19

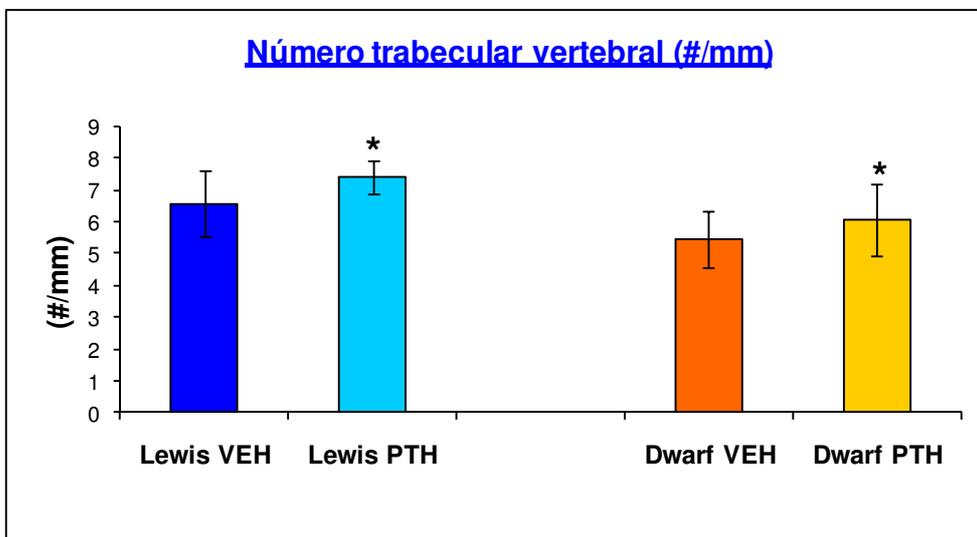
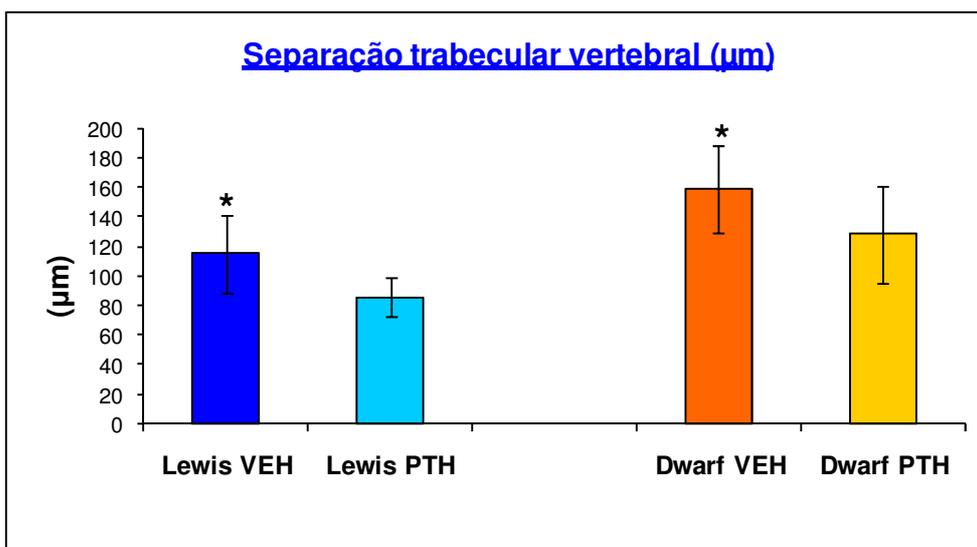
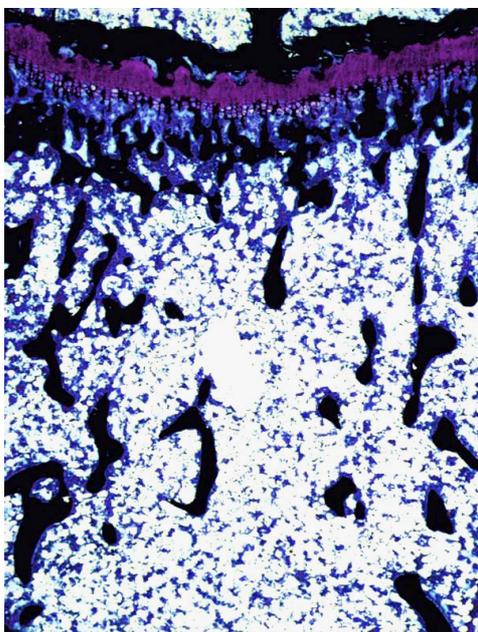


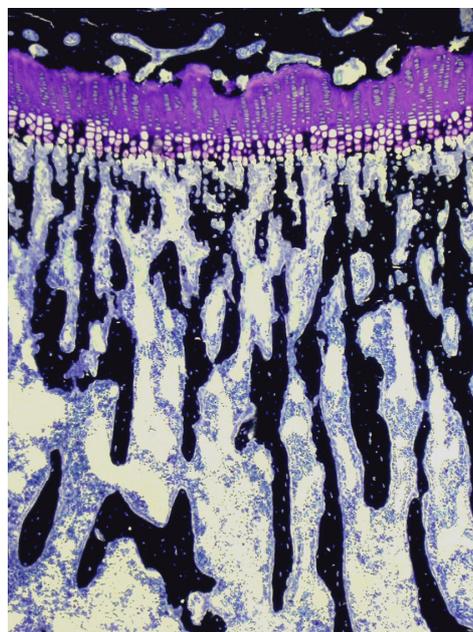
Gráfico 20



O mesmo efeito foi observado no volume trabecular tibial (gráfico 21) , em ratos Lewis ( $19,4 \pm 2,8 \%$  vs.  $24,6 \pm 4,3 \%$ ,  $p < 0,0001$ ) e dwarf ( $2,8 \pm 1,8 \%$  vs.  $8,8 \pm 2,8 \%$ ,  $p < 0,0001$ ), assim como aumento no número trabecular (gráfico 22), (figuras 6 e 7).



**Fig. 6 - Metáfise proximal da tíbia de animal dwarf que recebeu medicamento placebo. Osteopenia caracterizada por diminuição do número de trabéculas ósseas e também da espessura trabecular.**



**Fig. 7 - Metáfise proximal da tíbia de animal dwarf que foi tratado com PTH. Evidente aumento do número e da espessura trabecular. Nota-se ainda aumento da região da placa de crescimento.**

Gráfico 21

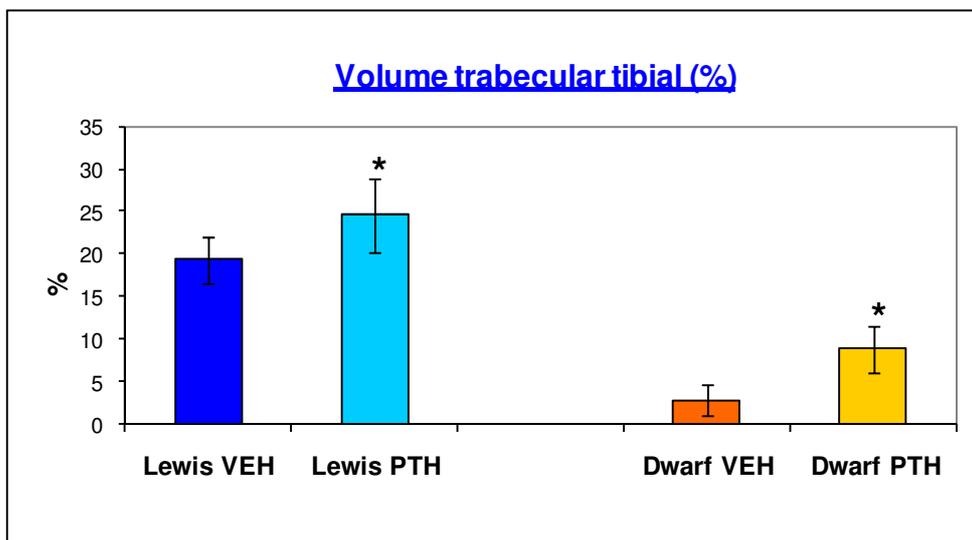
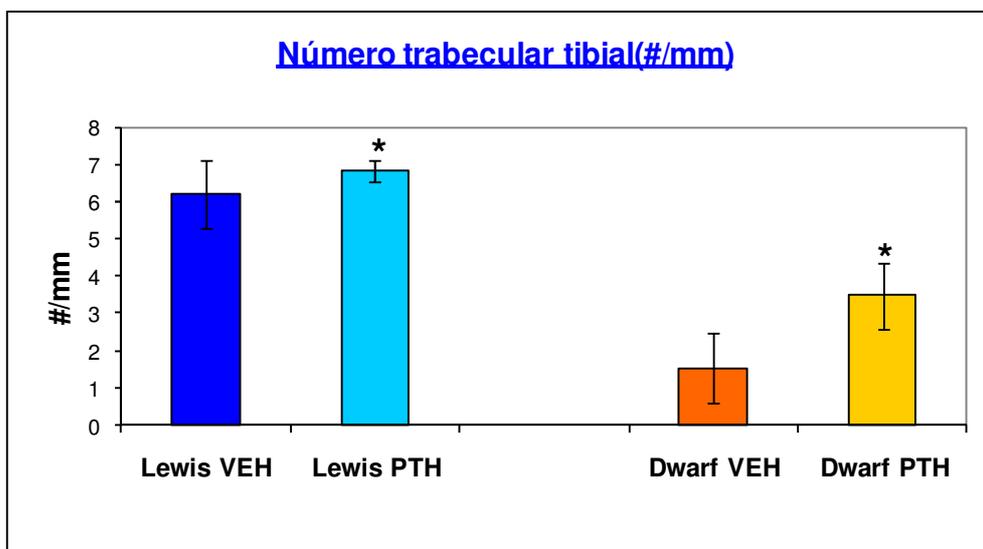
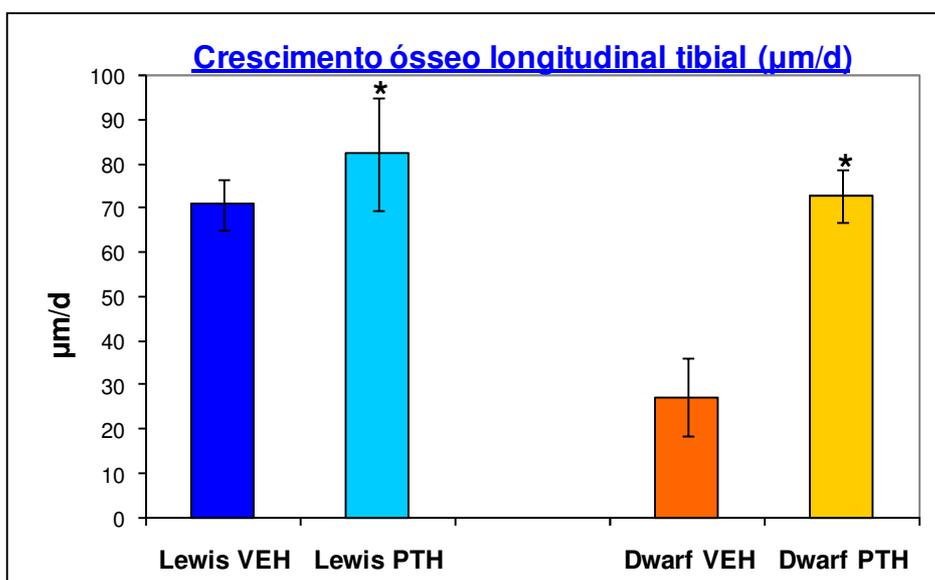


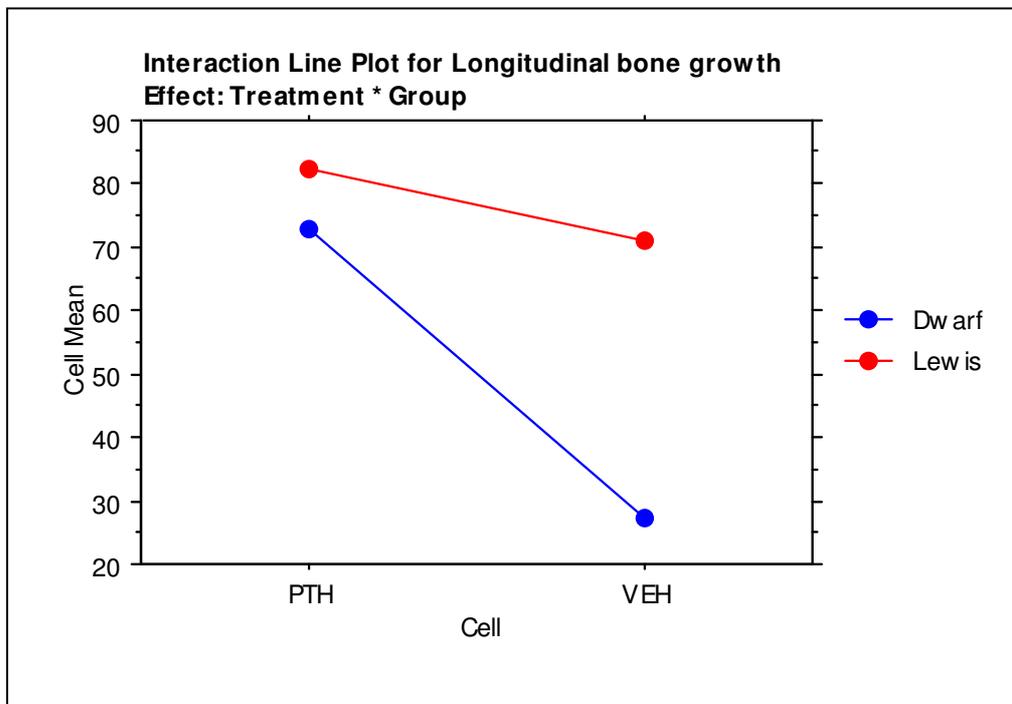
Gráfico 22



O crescimento longitudinal tibial (gráfico 23) foi significativamente maior nos animais submetidos ao tratamento com PTH, tanto no grupo 3 - Lewis ( $70,9 \pm 5,6 \mu\text{m/d}$  vs.  $8,3 \pm 12,7 \mu\text{m/d}$ ,  $p < 0,0001$ ), como no grupo 4 – dwarf ( $27,3 \pm 8,7 \mu\text{m/d}$  vs.  $72,8 \pm 6,1 \mu\text{m/d}$ ,  $p < 0.0001$ ). A análise post hoc (gráfico 24) revelou interação entre os efeitos de grupo e tratamento para este parâmetro, observando-se que o acréscimo no crescimento longitudinal nos ratos dwarf foi maior do que o observado nos ratos Lewis.

**Gráfico 23**



**Gráfico 24**

**Linhas de interação tratamento \* grupo para o crescimento ósseo longitudinal tibial – análise post-hoc**

Os ratos dwarf tratados com PTH exibiram ainda um aumento de 7 e 13 vezes na superfície de mineralização e taxa de formação óssea das vértebras lombares respectivamente, quando comparados aos ratos dwarf tratados com placebo (gráficos 25 e 26). Os ratos Lewis tratados com PTH mostraram aumento de 3 e 4 vezes na superfície de mineralização e taxa de formação óssea das vértebras lombares respectivamente, quando comparados aos ratos Lewis tratados com placebo.

Gráfico 25

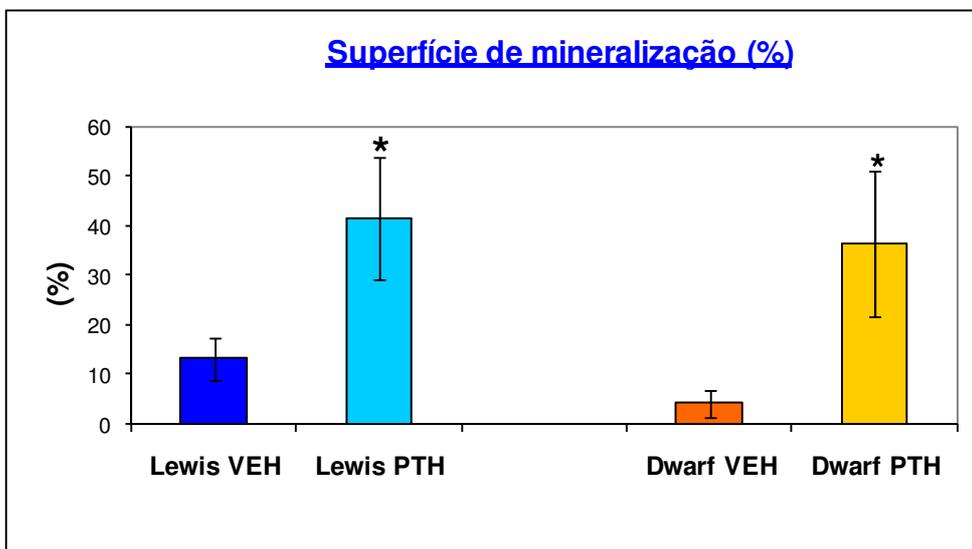
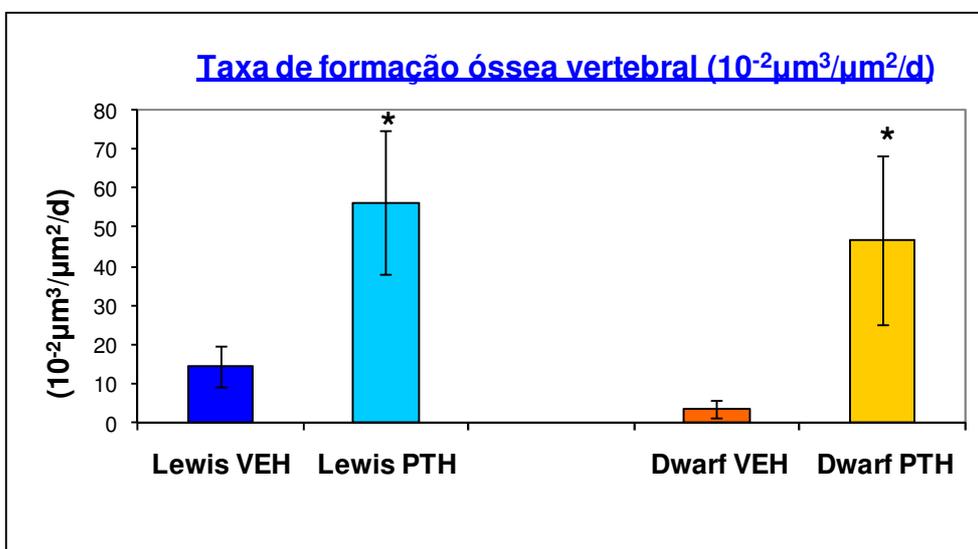


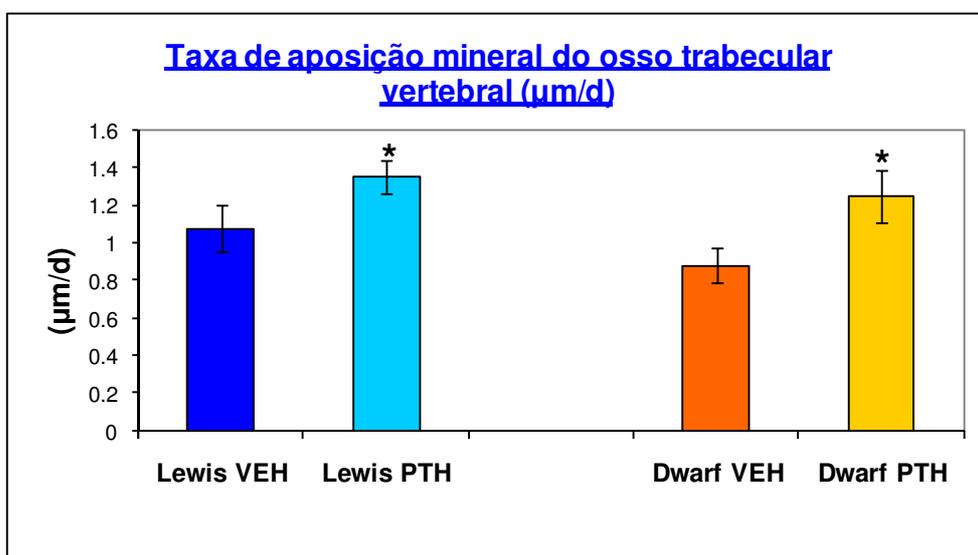
Gráfico 26



A taxa de aposição mineral do osso trabecular vertebral também mostrou-se aumentada nos ratos Lewis submetidos ao tratamento com PTH ( $1,07 \pm 0,12$

$\mu\text{m}$  vs.  $1,35 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ) e nos ratos dwarf tratados com PTH ( $0,88 \pm 0,09 \mu\text{m}$  vs.  $1,25 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ), quando comparados aos seus respectivos grupos controle (gráfico 27).

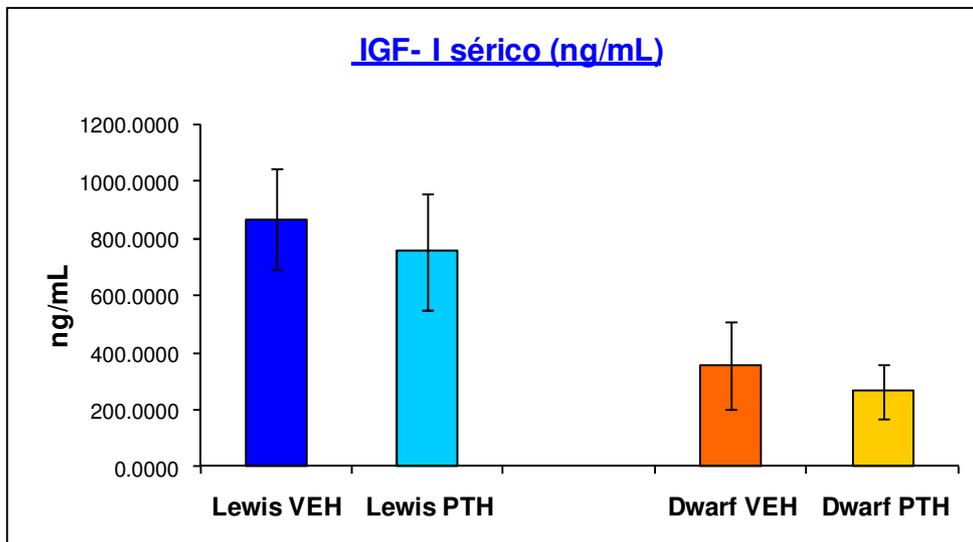
**Gráfico 27**



#### 4.4 Dosagem sérica de IGF-I

Os níveis séricos de IGF – I nos ratos dwarf foram cerca de três vezes menores quando comparados aos valores observados nos ratos Lewis, a despeito do tratamento realizado, placebo ou com PTH (gráfico 28).

Gráfico 28



## **5. DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

Na análise fenotípica, os animais da linhagem dwarf apresentaram peso corpóreo médio 52,9 % inferior que os da linhagem Lewis e comprimento femoral 14,8 % menor. A taxa de crescimento longitudinal, acompanhando este padrão, mostrou-se também três vezes menor nos ratos dwarf, quando comparados aos ratos Lewis ( $72,1 \pm 4,9 \mu\text{m/d}$  vs.  $24,5 \pm 10,7 \mu\text{m/d}$ ,  $p < 0,0001$ ).

A diferença significativa no tamanho destes animais, dwarf e Lewis, pode ser comparada à observada nos camundongos knockout, com peso corpóreo médio 60 % inferior ao do grupo controle (sem alteração genética para o IGF-I), conforme observado por Powell-Braxton *et al.* (1993) ao desenvolver esta linhagem. Os ratos da linhagem dwarf, apesar de terem apresentado crescimento retardado, mostraram-se hígidos e não foram observados distúrbios graves pós-nascimento, malformações no sistema músculo-esquelético e mortalidade elevada, comumente vistas em animais “knockout”. Os animais da linhagem Lewis, por sua vez, foram considerados como o grupo controle ideal ou linhagem de referência (“background strain”), uma vez que a linhagem dwarf, conforme previamente citado, originou-se de uma colônia de ratos Lewis (Charlton *et al.*, 1998).

Os ratos dwarf apresentam vantagens também sobre ratos hipofisectomizados, bastante utilizados em pesquisas sobre os efeitos da deficiência de GH e IGF-I sobre o crescimento longitudinal (Thorngreen e Hansson, 1975; Thorngreen e Hansson, 1977; Thorngreen *et al.*, 1977).; Schoenle

*et al.*, 1982). Estes animais, porém, apresentam maior susceptibilidade a infecções, diminuição da eritropoiese e estado geral debilitado.

Yeh *et al.* (1995) ao realizarem avaliação histomorfométrica de ratos hipofisectomizados, observaram que a deficiência de GH resultou em perda de tecido ósseo trabecular, além de interrupção no crescimento ósseo, diminuição do ganho de peso corpóreo e do metabolismo ósseo. Relacionaram esta perda óssea primariamente à supressão do crescimento ósseo longitudinal e também à inibição do remodelamento ósseo, com diminuição taxa de formação óssea em relação à reabsorção. Iwamoto *et al.* (2007) também observaram que a hipofisectomia levava à cessação do crescimento ósseo e osteopenia trabecular em ratos jovens.

No entanto, a hipofisectomia leva à deficiência, não somente do hormônio do crescimento, mas também à deficiência de outros hormônios pituitários, incluindo o hormônio estimulante da tireóide, hormônio adrenocorticotrófico e hormônio folículo estimulante, que também atuam no metabolismo do tecido ósseo, dificultando a interpretação dos dados obtidos.

Os efeitos da hipofisectomia estão também relacionados à idade por ocasião da cirurgia e, ainda, se esta foi completa, uma vez que os parâmetros de crescimento longitudinal puderam ser correlacionados por Thorngreen *et al.* (1980) com o exame microscópico de cortes em série da *sella turcica*.

A haploinsuficiência de IGF-I leva à redução dos valores de densidade mineral óssea (Mohan e Baylink, 2005) sem os altos índices de mortalidade até então observados, porém a diminuição dos níveis séricos de IGF-I nestes

heterozigotos é de apenas 20 a 30%, enquanto nos ratos dwarf eles se mostraram três vezes mais baixos quando comparados aos observados nos ratos Lewis ( $p < 0,0001$ ). O método ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) foi aplicado para obtenção dos níveis séricos de IGF-I, utilizando-se o *kit* Rat/Mouse IGF-I ELISA, produzido pelo Laboratório IDS – Immunodiagnostic systems. Na seleção deste método, levou-se em consideração o fato de que o IGF-I de ratos e camundongos difere do IGF-I humano. São observadas três substituições nas posições de aminoácidos (posições 20, 35 e 67)

A histomorfometria permite avaliar de forma direta e precisa, os mecanismos celulares e teciduais da formação e remodelação do tecido ósseo, através da análise quantitativa dos componentes da morfologia óssea, como volume, área, perímetro, etc., além de fornecer dados acerca de sua microarquitetura e conectividade da malha trabecular (Carvalho *et al.*, 2000).

Na avaliação histomorfométrica realizada, o volume trabecular mostrou-se acentuadamente diminuído nos ratos dwarf em relação aos ratos Lewis ( $1,2 \pm 1,4\%$  vs.  $18,9 \pm 3,3\%$ ,  $p < 0,0001$ ), e esta osteopenia estava associada à redução do número de trabéculas e aumento da separação trabecular. Embora os valores para a superfície osteóide e superfície osteoblástica não tenham se mostrado significativamente diferentes entre os dois grupos, a taxa de aposição mineral do osso trabecular, considerada como uma indicação de atividade osteoblástica, apresentou valores inferiores significativos nos ratos dwarf. A superfície osteoclástica tampouco apresentou diferenças significativas entre os dois grupos.

A análise das metáfises femorais pela tomografia computadorizada (pQCT) revelou que os parâmetros estruturais do osso trabecular apresentaram-se

significativamente mais baixos nos ratos dwarf, comparados aos dos ratos Lewis ( $p < 0,0001$ ). Todos os valores do osso cortical obtidos na na diáfise femoral (com exceção da densidade mineral óssea cortical) também se encontraram diminuídos nos animais da linhagem dwarf. A tomografia computadorizada pode avaliar a medida da verdadeira densidade mineral volumétrica, por sua característica tridimensional (com valores expressos em  $\text{mg}/\text{cm}^3$  para densidade), eliminando interferências nos resultados em função do tamanho do osso. Mostra-se, desta forma, superior às primeiras avaliações não invasivas através de métodos lineares como SPA (Single-energy Photon Absorptiometry - absorciometria simples) e posteriormente Dexa (Dual x-ray absorptiometry – absorciometria de dupla emissão radiológica), expressas como densidade mineral óssea por área ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ). A realização de pQCT, tanto nos ratos Lewis como dwarf, não apresentou as dificuldades observadas por Bikle *et al.* (2001) ao utilizarem camundongos “knockout”, fornecendo dados consistentes e consonantes com os obtidos pela análise histomorfométrica. Os camundongos “knockout” apresentaram ainda outros resultados divergentes dos obtidos com os ratos dwarf; Bikle e cols. (2001) notaram também diminuição do tamanho e da taxa de formação óssea das tíbias, porém obtiveram valores aumentados para o volume trabecular e número de trabéculas. Os ossos destes animais foram então considerados menores, porém mais compactos, apesar de não terem sido observadas alterações semelhantes nas vértebras lombares.

Os camundongos deficientes em IGF-I produzido pelo fígado (LID, do inglês liver IGF-I deficient) apresentam ablação da expressão do gene *IGF-I* no fígado, com níveis sistêmicos de IGF-I notadamente reduzidos, porém sem alterações na

produção local de IGF-I no tecido ósseo (Yakar *et al.*, 1999) O índice de sobrevivência destes animais é superior ao observado em camundongos knockout e os níveis séricos de IGF-I encontram-se reduzidos em 75 %, valores inferiores aos observados nos ratos dwarf. Curiosamente, porém, eles não exibem efeitos negativos sobre o crescimento e desenvolvimento geral; exibem redução na área e espessura corticais, com diminuição da resistência óssea, enquanto a arquitetura do osso trabecular não é afetada. O aumento nos níveis séricos de IGF-I podem também inibir a liberação de GH, como resposta à estimulação do receptor do GH, em um clássico mecanismo de “feedback” negativo de controle hormonal. Este mesmo mecanismo poderia levar ao aumento do GH em resposta aos baixos níveis de IGF-I na circulação, mantendo o crescimento, como foi observado nestes animais.

Existem ainda diversas outras linhagens de animais transgênicos disponíveis, criados com o intuito de investigar de forma isolada diferentes etapas ou fatores de crescimento, hormônios e mecanismos de sinalização celular envolvidos no metabolismo ósseo.

Em resumo, os ratos dwarf apresentaram diminuição dos níveis séricos de IGF-I, do índice de crescimento, do tamanho e peso corpóreo, além de alterações dos parâmetros estruturais ósseos reveladas pela histomorfometria e pQCT, caracterizando uma situação de osteopenia. Com base nestes dados, a linhagem dwarf revelou-se como um modelo animal promissor, capaz de mimetizar condições clínicas de osteopenia ligadas à deficiência do eixo GH/IGF-I, nas quais os níveis de GH/IGF-I encontram-se diminuídos, porém não abolidos. Podem ser

úteis na avaliação da importância do IGF-I sobre a eficácia de agentes farmacológicos que possam estimular a formação de tecido ósseo.

A administração intermitente de PTH apresenta efeitos anabólicos no esqueleto e reduz o risco de fraturas em mulheres com osteoporose pós menopausa (Zhou *et al.*, 2001; Swarthout *et al.* 2002). Em 1999, Jilka *et al.* consideraram que a ação anabólica do PTH se devia a um efeito anti-apoptótico, exercido sobre os osteoblastos, e observado em estudos *in vitro*. Em 2007, em um trabalho de revisão sobre os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelo efeitos anabólico do PTH, Jilka voltou a considerar que o aumento de osteoblastos ocorria devido à não apoptose e maior tempo de sobrevivência destas células. Em trabalho recente, porém, Jilka *et al.* (2009), ao estudar os efeitos do PTH sobre o perióstio, observaram aumento na diferenciação dos osteoblastos.

O papel do IGF-I como possível mediador dos efeitos anabólicos do PTH também tem sido considerado controverso. Diversos autores consideram o IGF-I como um mediador essencial para os efeitos anabólicos ósseos do PTH *in vitro* e *in vivo* (Canalis *et al.*, 1989; Linkhart e Mohan, 1989; Pfeilschifter *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 1995; Bikle *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2005). Os resultados das pesquisas realizadas com ratos hipofisectomizados mostraram-se conflitantes. Hock e Fonseca (1990) consideraram o eixo GH/IGF-I essencial para as ações do PTH sobre o tecido ósseo. Em contraste, Schmidt *et al.* (1995), realizaram estudo semelhante e concluíram que o GH e IGF-I não eram necessários para induzir a formação óssea estimulada pelo PTH. Gunness e Hock (1995) relataram que o aumento de massa óssea induzido pelo PTH não respondia à suplementação com

GH ou IGF-I. Miyakoshi *et al.* (2001), utilizando camundongos “knockout” para IGF-I, sugeriram que este fator era fundamental para que o PTH pudesse manifestar efeitos anabólicos ósseos.

Os resultados obtidos com o tratamento com PTH, nos grupos 3 e 4, foram contrastantes com os observados na literatura, em sua maior parte. Apesar de apresentarem níveis séricos de IGF-I comprovadamente diminuídos, os ratos dwarf submetidos ao tratamento com PTH não apresentaram diferença significativa quanto ao peso corpóreo, quando comparados aos ratos dwarf tratados com placebo (grupos 1 e 2 utilizados como controle). O tratamento com PTH também não aumentou os níveis séricos de IGF-I na linhagem Lewis ou dwarf. No entanto, o tratamento com PTH provocou aumento do volume trabecular vertebral e do volume trabecular tibial de ratos Lewis e dwarf, quando comparados aos respectivos grupos placebo, fato associado ao aumento na espessura trabecular e diminuição da separação trabecular.

Os ratos dwarf tratados com PTH exibiram aumento de 7 e 13 vezes respectivamente, na superfície de mineralização e taxa de formação óssea quando comparados aos ratos dwarf tratados com placebo. Os ratos Lewis apresentaram valores 3 e 4 vezes maiores para estes mesmos parâmetros quando comparados aos ratos Lewis tratados com placebo. A taxa de aposição mineral do osso trabecular, um índice de atividade osteoblástica, e o crescimento tibial longitudinal estavam aumentados nos animais tratados com PTH, tanto dos grupos dwarf como Lewis.

As análises por pQCT das metáfises femorais revelaram valores significativamente superiores para os parâmetros estruturais nos dois grupos

tratados com PTH, quando comparados aos animais tratados com placebo. Observou-se ainda interação grupo-tratamento quanto à densidade trabecular, sendo que os ratos dwarf tratados com PTH mostraram aumento mais acentuado do que o observado nos ratos Lewis submetidos ao mesmo tratamento. Os valores para o osso cortical, avaliados nas diáfises femorais não apresentaram diferenças significativas, com exceção da densidade mineral cortical, que se mostrou aumentada, possivelmente porque o tecido ósseo cortical necessitaria de um tratamento mais prolongado para que efeitos anabólicos pudessem ser observados com a mesma intensidade.

Elis *et al.* em recente publicação (setembro, 2010), utilizaram animais transgênicos com modificações para o IGF-I endócrino ou autócrino/parácrino, concluindo que níveis séricos elevados de IGF-I sinergizam a ação do PTH sobre o esqueleto apenas quando o IGF-I do tecido ósseo permanece intacto

Certamente, muitas pesquisas ainda serão realizadas até serem elucidados os múltiplos fatores de crescimento, hormônios, receptores e moléculas sinalizadoras que atuam sobre os efeitos do GH, do IGF-I e do PTH sobre o metabolismo ósseo. No entanto, a resposta positiva ao tratamento com PTH nos animais da linhagem dwarf, permite confirmar a sua indicação terapêutica como um potente agente anabólico ósseo, ainda que em condições de deficiência de GH/IGF-I sistêmico.

## **6. CONCLUSÕES**

## **6 CONCLUSÕES**

- 1- A deficiência do eixo GH/IGF-I teve efeitos negativos sobre o crescimento e formação de tecido ósseo trabecular e cortical nos animais da linhagem dwarf.
- 2- O tratamento com PTH provocou efeitos anabólicos ósseos, a despeito dos baixos índices de IGF-I circulantes.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barnes, G.L., Kakar, S., Vora, S., Morgan, E.F., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A. J Bone Joint Surg Am. 90 Suppl. 1: 120-127, 2008.
2. Baxter, R.C., Martin, J.L., Beniach, V.A. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. J Biol Chem 264: 11843-11848, 1989.
3. Bikle, D., Majumdar, S., Laib, A., Powell-Braxton, L., Rosen, C., Beamer, W., Nauman, E., Leary, C., & Halloran, B. The skeletal structure of insulin-like growth factor I-deficient mice. J Bone Miner Res 16: 2320-2329, 2001.
4. Bikle, D.D., Sakata, T., Leary, C., Elalieh, H., Ginzinger, D., Rosen, C.J., Beamer, W., Majumdar, S., Halloran, B.P. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. J Bone Miner Res 17:1570-1578, 2002.
5. Bereket, A., Lang, C.H., Wilson, T.A. Alterations in the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor Axis in Insulin Dependent Diabetes Mellitus. Horm Metab Res 31 (2/03): 172-181, 1999.
6. Bou-Gharios, G., Crombrughe, B. Type I collagen structure, synthesis, and regulation. In: Bilezikian JR, L.G.; Martin, T.J., editor. Principles of bone biology. 3rd ed: Elsevier; 2008. p. 285-318

7. Canalis, E., Centrella, M., Burch, W., McCarthy, T.L. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest* 83:60-65, 1989.
8. Carvalho, A. B., Reis, L.M., Jorgetti, V. Biópsia e Histomorfometria Óssea. In: *Osteoporose – Diagnóstico e Tratamento*. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 259-274.
9. Charlton, H.M., Clark, R.G., Robinson, I.C.A.F., Goff, A.E.P., Cox, B.S., Bugnon, C., et al. Growth hormone-deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *Journal of Endocrinology*. 119(1):51, 1988.
10. Clemens, T.L. & Chernausek, S.D. Genetic strategies for elucidating insulin-like growth factor action in bone. *Growth Hormone & IGF Research* 14:195-199, 2004.
11. Compston, J. Skeletal actions of intermittent parathyroid hormone: Effects on bone remodeling and structure. *Bone*. 2007; 40: 1447-52.
12. *Clinician Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis* - National Osteoporosis Foundation - Washington, DC, 2008.

13. Davies, J.H., Evans, B.A.J., Jenney, M.E.M., Gregory, J.W. In vitro effects of combination chemotherapy on osteoblasts: implications for osteopenia in childhood malignancy. *Bone*. 2002; 31(2):319-26.
14. Daughaday, W.H. Growth Hormone – Insulin-Like Growth Factor Axis / Review Article. *Pediatric Nephrology*. 2000; 14 (7): 537-540.
15. Elis, S., Courtland, H.W., Wu, Y., Fritton, J.C., Sun, H., Rosen, J.C., Yakar, S. Elevated Serum IGF-I Levels Synergize PTH Action on the Skeleton Only When the Tissue IGF-1 Axis is Intact. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010; 25(9): 2051- 58.
16. Fraher, L.J., Avram, R.; Watson, P.H.; Hendy,G.N.; Henderson, J.E., Chong, K.L., Goltzman, D., Morley, P., Willick,G.E., Whitfield,J.F. Hodsman, A.B. Comparison of the Biochemical Responses to Human Parathyroid Hormone-(1-31)NH<sub>2</sub> and hPTH-(1-34) in Healthy Humans *J.Clin.Endocrinol.Metab*. 84:2739-2743, 1999.
17. Giustina, A.; Mazziotti, G.; Canalis, E. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocr.Rev*. 29: 535-559, 2008.
18. Grinspoon, S., Miller, K., Coyle, C., Krempin, J., Armstrong, C., Pitts, S. et al. Severity of osteopenia in estrogen-deficient women with anorexia

- nervosa and hypothalamic amenorrhea. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 1999; 84(6):2049-55.
19. Gunness, M., and Hock, J.M. Anabolic effect of parathyroid hormone is not modified by supplementation with insulin like growth factor I (IGF-I) or growth hormone in aged female rats fed an energy-restricted or ad libitum diet. *Bone*16:199-207, 1995.
  20. He, J., Rosen, C.J., Adams, D.J., & Kream, B.E. Postnatal growth and bone mass in mice with IGF-I haploinsufficiency. *Bone* 38:826-835, 2006.
  21. Hedrich, H.J. Mutant genes and polymorphic loci of the laboratory rat. In: *Genetic monitoring of inbred strains of rats* (Hedrich, HJ, ed) Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, pp 209-409, 1990.
  22. Hock, JM, and J Fonseca. Anabolic effect of human synthetic PTH depends on growth hormone. *Endocrinology* 127:1804-1810, 1990.
  23. Hock, J.M., Wood, R.J. Growth hormone does not enhance the anabolic effect of human parathyroid hormone (1-34) on bone in aging multiparous and virgin rats. *Mech Ageing Dev* 85: 183-197, 1995.

24. Hutchinson, M.R., Bassett, M.H., & White, P.C. Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone, affect growth plate chondrocyte proliferation. *Endocrinology* 148:3122-3130, 2007.
25. Iwamoto, J.; Takeda, T.; Sato, Y.; Yeh, J.K. Effect of vitamin K2 and growth hormone on the long bones in hypophysectomized young rats: a bone histomorphometry study. *J Bone Miner Metab* (2007) 25:46–53, 2007.
26. Jilka, R., Weinstein, R., Robertson, P., Bellido, T., Parfitt, A.M., Manolagas, S. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *The Journal of Clinical Investigation* 104: 439-446.
27. Jilka, R. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* 40:1434-1446, 2007.
28. Jilka, R., O'Brien, C., Ali, A., Robertson, P., Weinstein, R., Manolagas, S. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts. *Bone* 44 (2009): 275-286.
29. Linkhart, T.A., and Mohan, S. Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II from neonatal mouse calvariae in organ cultures. *Endocrinology* 125:1484-1491, 1989.
30. Liu, J.L., Yakar, S., LeRoith, D. Conditional knockout of mouse insulin-like growth factor-1 gene using the Cre/loxP system. *Experimental Biology and Medicine*. 2000;223(4):344-51.

31. Melmed, S. Insulin-like growth factor I--a prototypic peripheral-paracrine hormone? *Endocrinology* 140: 3879-3880, 1999.
32. Miyakoshi, N., Kasukawa, Y., Linkhart, T.A., Baylink, D.J., Mohan, J. Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice. *Endocrinology* 142:4349-4356, 2001.
33. Mohan, S., & Baylink, D.J. Impaired skeletal growth in mice with haploinsufficiency of IGF-1: genetic evidence that differences in IGF-1 expression could contribute to peak bone mineral density differences. *J Endocr* 185:415-420, 2005.
34. Molina, P. *Endocrine Physiology*, Second edition. The Mc Graw-Hill Companies, 2006.
35. Morley, P., Whitfield, J.F., Willick, G.E. Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis. *Curr Pharm Des.* May;7(8):671-87, 2001.
36. Nakajima, A., Shimoji, N., Shiomi, K., Shimizu, S., Moriya, H., Einhorn, T.A., Yamazaki, M. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). : *J Bone Miner Res.* Nov; 17(11):2038-47, 2002.

37. Ohlsson, C., Bengtsson, B., Isaksson, O. G. P., Andreassen, T. T., & Sootweg, M. C. Growth hormone and bone. *Endocrine Reviews*, 19(1), 55-79, 1998.
38. Parfit, A.M., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R. Bone Histomorphometry: Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. *J Bone Miner Res.* 2(6):595-610, 1987.
39. Pfeilschifter, J., Laukhuf, F., Müller-Beckmann, B., Blum, W.F., Pfister, T. and Ziegler, R. Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J. Clin. Invest.* 96(2):767, 1995.
40. Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, P., Dalton, D., Gillett, N. and Stewart, T.A. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* 7:2609-2617, 1993.
41. Rajaram, S., Baylink, D.J., Mohan, S. Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions. *Endocrine reviews*. 1997; 18(6):801-31.
42. Rechler, M. Insulin-like growth factor binding proteins. *Vit Horm* 47: 1-114, 1993.

43. Report of the American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(5):669, 2001.
44. Rosen, C.J. Circulating IGF-1 and bone remodeling: new insights into old questions. *IBMS Bonekey* 5: 7-15, 2008.
45. Schmidt, I.U., Dobnig, H. and Turner, R.T. Intermittent parathyroid hormone treatment increases osteoblast number, steady state messenger ribonucleic acid levels for osteocalcin, and bone formation in tibial metaphysis of hypophysectomized rats. *Endocrinology* 136:5127-5134, 1995.
46. Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R.E., Froesch, E.R. Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature*. 1982; 296(18):252-53.
47. Swarthout, J.T., D'Alonzo, R.C., Selavmurugan, N., Partridge, N.C. Parathyroid hormone-dependent pathways regulating genes in the cell. *Gene* 282: 1-17, 2002.
48. Thorngreen, K.J., Hansson, L.I. Conditions influencing the dose-response effects of growth hormone on longitudinal bone growth in the hypophysectomized rat. *Acta Endocrinol.* 1975;80(2):284-96.

49. Thorngreen, K.G., Hansson, L.I. Effect of administration frequency of growth hormone on longitudinal bone growth in the hypophysectomized rat. *Acta Endocrinol.* 1977; 80(2):284-96.
50. Thorngreen, K.G., Hansson, L.I., Fryklund, L., Sievertson, H. Human somatedin A and longitudinal bone growth in the hypophysectomized rat. *Molecular And Cellular Endocrinology.* 1977; 6(Journal Article):217-21.
51. Thorngreen, K.G., Hansson, L.I., Fryklund, L., Sievertson, H. Human somatedin A and longitudinal bone growth in the hypophysectomized rat. *Molecular And Cellular Endocrinology.* 1977;6(Journal Article):217-21.
52. Wang, Y., Nishida, B., Boudignon, M., Burghardt, A., Elalieh, H.Z., Hamilton, I. et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res* 22:1329-1337, 2007.
53. Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., LeRoith, D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 96: 7324-39, 1999.
54. Yakar, S., Canalis, E., Sun, H., Mejia, W., Kawashima, Y., Nasser, P., et al. Serum IGF-1 determines skeletal strength by regulating subperiosteal expansion and trait interactions. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2009; 24(8):1481-92.

55. Yamaguchi, M., Ogata, N., Shinoda, Y., Akune, T., Kamakura, S., Teruchi, Y., Kadowaki, H., Hoshi, K., Chung, U., Nakamura, K., Kawaguchi, H. Insulin Receptor Substrate-1 Is Required for Bone Anabolic Function of Parathyroid Hormone in Mice. *Endocrinology* 146(6):2620–2628, 2005.
56. Yeh, J.K., Chen, M.M., Aloia, J.F. Skeletal alterations in hypophysectomized rats: I. A histomorphometric study on tibial cancellous bone. *Anat Rec* 241:505–512, 1995.
57. Watson, P., Lazowski, D., Han, V., Fraher, L., Steer, B., Hodsmann, A. Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone* 16:357-365, 2003.
58. Zhou, H., Shen, V., Dempster, D.W., Lindsay, R. Continuous parathyroid hormone and estrogen administration increases vertebral cancellous bone volume and cortical width in the estrogen-deficient rat. *J Bone Miner Res.* Jul; 16(7):1300-7, 2001.