Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências
Campus de Botucatu

Associação do hormônio tireoidiano ao estrógeno em células de rato ROS 17/2.8 (modelo experimental de células osteoblásticas).

ALINE OMETTO

Orientadora: Profª. Drª. Célia Regina Nogueira
Co-orientadora: Profª. Drª. Patrícia Pinto Saraiva
Supervisor: Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

Trabalho de Iniciação Científica apresentado ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BOTUCATU / SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ometto, Aline.
Associação do hormônio tireoidiano ao estrógeno em células de rato RS 17/2.8 (modelo experimental de células osteoblásticas) / Aline Ometto. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008
Orientadora: Célia Regina Nogueira
Co-orientadora: Patrícia Pinto Sraiva

1. Endocrinologia 2. Hormônios Tireoidianos - Estudos experimentais 3. Triodotironina

Palavras-chave: Cultura celular; Curva de crescimento; Estrógeno; Hormônio tireoidiano; Osteoblastos

Resumo

Os mecanismos pelos quais o hiper e hipotireoidismo afetam o osso durante a menopausa são pouco conhecidos. O objetivo deste estudo foi verificar a ação do hormônio triiodotironina (T3), em diferentes concentrações associado ao estrógeno (E2) em concentração infra-fisiológica (condição de menopausa), sobre a proliferação de células de rato ROS 17/2.8, através de uma curva de crescimento para obtenção do tempo de dobramento (TD). As células ROS 17/2.8 são consideradas modelo de células osteoblásticas e foram cultivadas em meio HAM F-12, e submetidas ao tratamento hormonal com as combinações das concentrações fisiológica, infrafisiológica e suprafisiológica de T3 e infra-fisiológica de E2. Utilizamos como grupo controle aquele tratado com as concentrações fisiológicas dos dois hormônios. Para cada concentração hormonal foram realizadas 5 repetições, e as células contadas manualmente nos dias 1, 3, 5 e 7, após o início da adição hormonal. A análise estatística utilizada foi a técnica da análise de variância não paramétrica, complementada com teste de comparações múltiplas. Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que o crescimento das células ROS 17/2.8 é afetado pelos tratamentos hormonais, em especial quando a concentração infrafisiológica de E2 está associada à concentração suprafisiológica de T3, aumentando o tempo de dobramento celular. Este efeito poderia tornar o metabolismo do osso mais lento, prejudicando a neoformação óssea em pacientes menopausadas e hipertireoidéas.

Introdução

O conhecimento dos efeitos de diversos hormônios que atuam no metabolismo ósseo é extremamente importante para entender os mecanismos que governam situações patológicas provenientes de hiper e hipotiroidismo, e menopausa (Michael *et al*., 2005; Peeyananjarassri *et al*., 2005; Routti *et al*., 2008).

Hormônios sistêmicos e fatores locais agem nas linhagens de células osteoblásticas e/ou osteoclásticas, atuando na proliferação de células indiferenciadas e no recrutamento, diferenciação e/ou ativação celular (Canalis, 2003). Entre os hormônios envolvidos neste complexo processo estão: hormônio tireóideo (HT), 1,25-dihidroxivitamina D_3 e 24-25-dihidroxivitamina D_3, estrogênio (E2) e hormônio de crescimento (Bland, 2000, Wilson & Kornman, 2001).

No hipertireoidismo (condição de excesso de HT), a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos se eleva, havendo predomínio da osteoclástica (Mosekilde et al., 1977). É também caracterizado pelo aumento no turnover ósseo (Simsek et al., 2003).

O hipotireoidismo está caracterizado pela redução do metabolismo ósseo, sendo que, nestes casos, a massa óssea pode estar aumentada ou permanecer inalterada (Gouveia, 2004). Indivíduos hipotireóideos mostram diminuição da atividade osteoblástica e osteoclástica, detectados através de análises histomorfométricas (Eriksen et al., 1986).

O E2 pode agir estimulando ou inibindo a proliferação de osteoblastos e influenciar os osteoclastos, sendo que em baixas concentrações, estimula a osteoclastogênese (Vanderschueren *et al.* 2004). Uma diminuição nos níveis de estrógeno na menopausa leva a uma rápida perda de massa óssea e aumento no risco à fratura (Krum & Brown, 2008).

Alguns poucos trabalhos mostram a relação entre a atividade do HT e do E2 agindo conjuntamente sobre o tecido ósseo. Kim et al., 1999, mostraram que o hormônio tireoideano em concentração supra-fisiológica pode estimular a reabsorção óssea pela produção de IL-1 e IL-6 em células de linhagem osteoblástica, e que estes efeitos seriam independentes do estatus do estrógeno.

Sozer et al., em 2006, realizaram um estudo com ratas ovariectomizadas e hipertireoideas. A administração de estrógeno a estas ratas altera o metabolismo ósseo, aumentando os níveis de citocinas, mas diminuindo os níveis de paratormônio (PTH), mantendo os níveis de cálcio e fósforo do osso.

A literatura mostra-se muito carente em relação à ação conjunta de HT e E2 na concentração infra-fisiológica (simulando a menopausa) sobre o tecido ósseo, devido à complexidade que os rodeia. Desta forma, torna-se importante verificar essa ação sobre a proliferação de células ósseas.

Objetivos

Verificar a ação conjunta do estrógeno na concentração infra-fisiológica e do hormônio tireóideo, em diferentes concentrações, sobre a proliferação de células de rato ROS 17/2.8.

Materiais e métodos

Materiais

Meio de cultura HAM F-12, *Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline*, tripsina e EDTA, foram adquiridos da GIBCO BRL. Soro fetal bovino adquirido da

Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA. 17β-estradiol (E2) e 1-3,5,3 triiodotironina (T3) (Sigma Chemicals).

Cultura de células

As células ROS 17/2.8, (células osteoblásticas de ratos) foram gentilmente cedidas pela Dra. Cecília H.A. Gouveia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e mantidas em meio HAM F-12 contendo antibiótico antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina) (GIBCO BRL), com 10% de soro fetal bovino, em uma atmosfera umidificada de 5% (v/v) de CO_2, a 37°C. Para o tratamento hormonal, as células foram mantidas em meio sem soro durante 48 horas. Esta linhagem celular apresenta receptores tanto para T3 como para E2.

Grupos de tratamentos

17β-estradiol (E2) foi adicionado ao meio nas concentrações de 10^{-8} M (fisiológico) (Shevde *et al*., 2000) e 10^{-9} M(infra-fisiológico) e T3 nas concentrações de 10^{-8} M (supra-fisiológico), 10^{-9} M (fisiológico) (Siddiqi *et al*., 1998) e 10^{-10} M (infra-fisiológico). Foram formados os seguintes grupos:

- E2 fisiológico + T3 fisiológico (controle)
- E2 fisiológico + T3 supra-fisiológico
- E2 fisiológico + T3 infra-fisiológico
- E2 infrafisiológico + T3 supra-fisiológico
- E2 infrafisiológico + T3 infra-fisiológico

Proliferação celular

As células foram plaqueadas em uma densidade de $1x10^4$ células por poço, em 100 µl de meio de cultura, utilizando 5 poços para cada grupo de tratamento, para cada momento do tratamento hormonal (1, 3, 5 e 7 dias). As placas foram mantidas em estufa (37°C, 5% CO_2). A contagem do número de células foi realizada manualmente, utilizando-se a câmara de Neubauer. Através dos dados obtidos, foram construídas curvas de crescimento, e obtidos os respectivos tempos de dobramento celular (TD), expressos em horas.

Estimulação hormonal

As células ROS 17/2.8 foram distribuídas em placas de 100 mm (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA). Após atingirem um estado de semi-confluência, foram submetidas ao tratamento hormonal. As células foram lavadas com PBS de *Dulbecco's* e os hormônios esteróide e triiodotironina adicionados ao meio HAM F-12, sem soro fetal bovino, conforme os grupos de tratamentos. Todos os tratamentos foram repetidos cinco vezes para cada grupo estabelecido (n=5).

Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores (E2 e T3), complementada com o respectivo teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando o nível de 5% de significância (ZAR, 1999).

Resultados

A figura 1 ilustra os resultados do tempo de dobramento, em horas (h) das células ROS 17/2.8. Quando tratadas com as concentrações fisiológicas dos hormônios E2 e T3 (grupo controle), o tempo de dobramento foi de 29,8 horas. Já quando foi simulada uma situação de hipertiroidismo (E2 fisiológico e T3 supra-fisiológico), o tempo de dobramento obtido foi de 7,1 horas. Portanto, temos uma maior proliferação celular, estatisticamente significante, na presença de T3 supra-fisiológico, mantida a concentração fisiológica de E2.

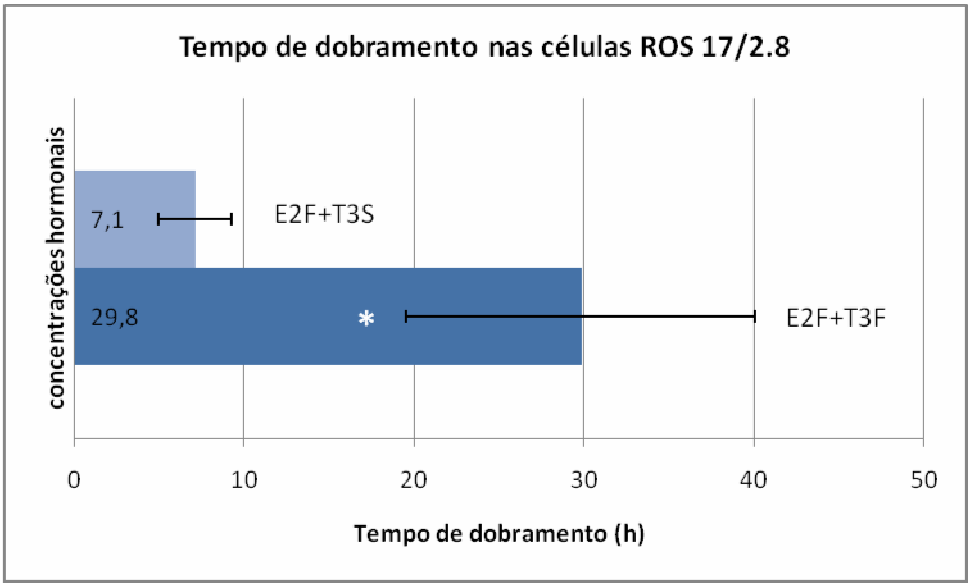

Figura 1: Média e semi-amplitude do tempo de dobramento, expresso em horas (h), sob o tratamento com concentrações hormonais fisiológicas (E2F+T3F) e em situação experimental de hipertiroidismo (E2F+T3S). F = fisiológico, S = suprafisiológico. Houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p<0,05$). A análise estatística

realizada foi através de análise de variância, complementada pelo teste de comparações múltiplas.

Em uma situação experimental de hipotiroidismo (E2F + T3I), o TD foi de 34,8h, não apresentando alteração significativa do tempo de dobramento destas células (Figura 2), quando comparada ao grupo controle, que apresentou o tempo de 29,8h.

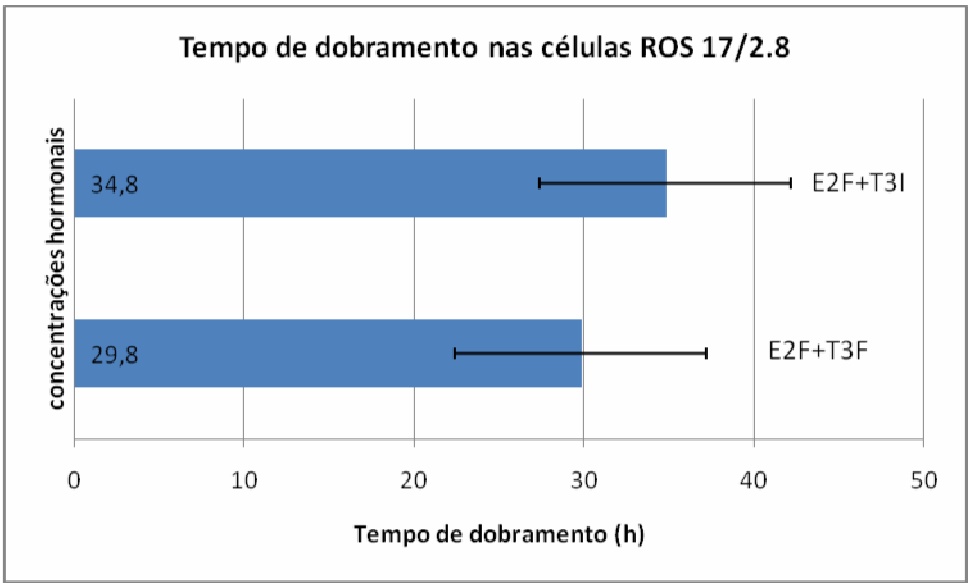

Figura 2: Média e semi-amplitude do tempo de dobramento, expresso em horas (h), de osteoblastos em concentração hormonal fisiológica (E2F+T3F) e em situação experimental de hipotireoidismo (E2F+T3I). F= fisiológico, I = infrafisiológico. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p>0,05$). A análise estatística realizada foi através de análise de variância, complementada pelo teste de comparações múltiplas.

Simulando um quadro de menopausa (E2 infra-fisiológico) não foi observado alteração no TD das células osteoblásticas, quando a associação com T3, em concentração infra-fisiológica (35h). Observou-se um aumento significativo do TD na presença de T_3 supra-fisiológico (41,8h), comparado ao grupo controle (29,8h) (Fig. 3).

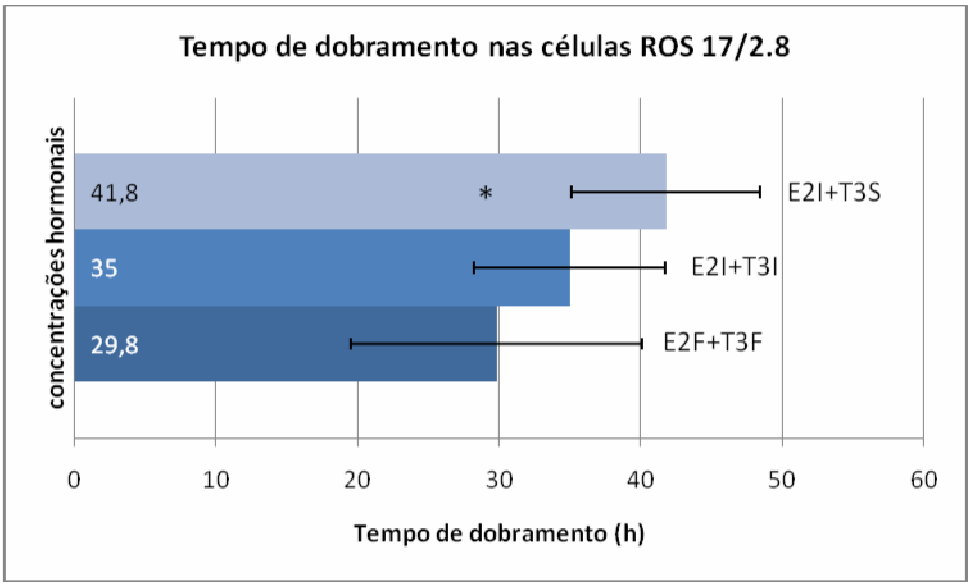

Figura 3: Média e semi-amplitude do tempo de dobramento, expresso em horas (h), de osteoblastos em concentração hormonal fisiológica (E2F+T3F), e em situação experimental de menopausa (E2I) associada às concentrações infra e suprafisiológica de T3. F= fisiológico, S= suprafisiológico e I= infrafisiológico. Houve diferença estatisticamente significante entre as concentrações de E2I + T3S, comparada às concentrações fisiológicas dos hormônios ($p<0,05$). A análise estatística realizada foi através de análise de variância, complementada pelo teste de comparações múltiplas.

Discussão

Este estudo demonstra que em um estado que simula o hipertireoidismo o tempo de dobramento das células ROS 17/2.8 foi menor quando comparada a uma situação fisiológica na qual a concentração de T3 supra-fisiológica era associada com a de E2 fisiológica, como ocorre no hipertiroidismo. Por outro lado, não houve diferença significativa quando as concentrações fisiológicas de E2 e T3 foram comparadas com uma simulação de hipotiroidismo. Ao se manter o E_2 na concentração infra-fisiológica semelhante ao que ocorre na menopausa, o tempo de dobramento para essas células foi maior em comparação ao estado fisiológico quando a concentração de T3 supra-fisiológica foi combinada e sem alteração com a adição de T_3 infra-fisiológica.

O menor tempo de dobramento encontrado neste trabalho na situação de E2F+T3S em relação a E2F+T3F parece sinalizar para um efeito positivo do hormônio T3 sobre a estimulação dos osteoblastos. Esses achados corroboram o de outros autores que encontraram resultados semelhantes tanto com a utilização de células de ratos osteoblasto-*like* (Ernst & Froesch, 1987), como também com células humanas (Kassem et al., 1993). Por outro lado, apesar de poucos estudos conduzidos com essa finalidade, há controvérsias na literatura com relação ao efeito do T3 sobre a proliferação osteoblástica. Alguns autores não encontraram alterações significativas provocadas pelo T3 sobre a proliferação de células osteoblásticas de ratos em concentrações que variaram de 10^{-8} a 10^{-11} M (Sato et al., 1987; LeBron et al., 1989; Williams et al., 1994). Diferentemente, Kasono et al., (1988) também estudando células de ratos osteoblasto-*like* verificaram ação inibitória sobre a proliferação dessas células.

Com relação à ausência de diferença significativa entre E2F+T3F e E2F+T3I, sobre o tempo de dobramento de células ROS 17/2.8, encontrada neste estudo pode-se inferir que a condição de hipotiroidismo (E2F+T3I) não estimula nem inibe o metabolismo de osteoblastos. Apesar disso, outros autores encontraram resultados diferentes. Nesse sentido, Eriksen et al., (1986) verificaram diminuição no metabolismo ósseo em mulheres com hipotiroidismo quando comparadas com suas congêneres saudáveis. Esses autores constataram, por exemplo, que o período de formação óssea era de 620 dias para o grupo de mulheres com hipotiroidismo comparado com 151 dias do grupo controle. Além disso, o tempo de mineralização foi retardado nas pacientes, quando comparado com o grupo saudável sendo de 48 e 25 dias, respectivamente. Da mesma forma, Vestergaard & Mosekilde (2002), compararam a ocorrência de fraturas ósseas em 16.249 pacientes com hipo e hipertiroidismo e indivíduos saudáveis de semelhante idade.

Os resultados encontrados apontam para maior risco desse tipo de fraturas nos pacientes quando comparado com indivíduos normais. Tal fato decorre da diminuição do metabolismo ósseo desses pacientes.

Numa situação simulatória de menopausa não observamos alteração do TD quando o T3 infra-fisiológico foi adicionado (comparado ao grupo controle), mostrando que o T3I não altera o TD induzido pelo E2I. Mas quando fazemos a associação entre E2I e T3 supra-fisiológico, o TD aumenta significativamente, quando comparado ao controle. Este TD aumentado sugere uma alteração do metabolismo ósseo, com provável diminuição da massa óssea. Estes efeitos são observados em pacientes menopausadas e com hipertireoidismo, mostrando ser um risco adicional ao desenvolvimento da osteoporose (Belaya et al., 2007).

Apesar de este trabalho ter observado somente a proliferação celular, ele vem contribuir para demonstrar o comportamento de células de rato osteoblasto-like, quando tratadas com a associação de dois hormônios. Resultados da ação do T3 e E2 combinados, sob o comportamento de células ósseas são escassos na literatura. Entretanto, a implementação de novos estudos envolvendo, por exemplo, a mensuração da expressão de marcadores que indiquem os processos de formação e reabsorção óssea é fundamental para elucidar com maior propriedade os mecanismos que atuam no metabolismo ósseo, envolvendo a ação conjunta de T3 e E2.

Conclusões

Baseando-se nos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

a) em uma situação que simula o hipertireodismo, mantida a concentração fisiológica de E2, o tempo de dobramento diminui significativamente, quando o comparamos com o TD do grupo controle (concentrações fisiológicas dos hormônios).

b) em situação de hipotireodismo (associado ao estrógeno fisiológico) não há alteração no tempo de dobramento, o que mostra que, em baixas concentrações, o T3 não afeta o crescimento celular destas células.

c) quando o E2 está infra-fisiológico, sua associação com a concentração de T3 infra-fisiológica não provoca aumento no TD, enquanto sua associação com a concentração supra-fisiológica provoca aumento no TD, em relação às concentrações fisiológicas dos dois hormônios.

Referências:

Bland, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clin. Sci**., v.98, p.217-40, 2000.

Belaya ZE, Melnichenko GA, Rozhinskaya LY, Fadeev VV, Alekseeva TM, Dorofeeva OK, Sasonova NI, Kolesnikova GS. Subclinical hyperthyroidism of variable etiology and its influence on bone in postmenopausal women. **Hormones**,v.6, p.62-70, 2007.

Canalis E. Osteogenic Growth Factors. In: Favus MJ, ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 5th ed. Washington, DC: **American Society for Bone and Mineral Research,** p.28-31, 2003.

Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. **Bone,** v.7:101-8, 1986.

Ernst M, Froesch ER. Triiodothyronine stimulates proliferation of osteoblast-like cells in serum-free culture. **FEBS Lett,** v.220, p.163-6, 1987.

Gouveia, CHA. O efeito molecular e estrutural do hormônio tireoideano no esqueleto. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.48, p.183-195, 2004.

Kasono K, Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Stimulation of alkaline phosphatase activity by thyroid hormone in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1): a possible mechanism of hyperalkaline phosphatasia in hyperthyroidism. **Bone Miner**, v. 4, p.355-63, 1988..

Kassem M, Mosekilde L, Eriksen EF. Effects of triiodothyronine on DNA synthesis and differentiation markers of normal human osteoblast-like cells *in vitro*. **Biochem Mol Biol Int**; v. 30, p.779-88, 1993.

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

Krum SA, Brown M. Unraveling estrogen action in osteoporosis. **Cell Cycle**. 7 (10), 2008.

LeBron BA, Pekary AE, Mirell C, Hahn TJ, Hershman JM. Thyroid hormone 5'-deiodinase activity, nuclear binding, and effects on mitogenesis in UMR-106 osteoblastic osteosarcoma cells. **J Bone Miner Res,** v.4, p.173-8, 1989.

Michael H, Harkonen PL, Vaananen, HK, Hentunen, TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibi t osteoclastogenesis and bone resorption **J Bone Miner Res,**v.20 (12), p.2224-32, 2005.

Mosekilde L, Melsen F, Bagger JP, Myhre-Jensen O, Schwartz Sorensen N. Bone changes in hyperthyroidism: interrelationships between bone morphometry, thyroid function and calcium-phosphorus metabolism. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 85, p. 515-25, 1977.

Peeyananjarassri K, Baber R. Effects of low-dose hormone therapy on menopausal symptoms, bone mineral density, endometrium, and the cardiovascular system: a review of randomized clinical trials.**Climacteric,** v.8 (1), p.13-23, 2005.

Routti, H., Nyman, M., Munro, JB., Backman, C., Koistinen, J, Gabrielsen, G., Bone-Related Effects of Contaminants in Seals May Be Associated with Vitamin D and Thyroid Hormones. **Environ Toxicol Chem**.v.2, 2008

Sato K, Han DC, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K. Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. **Endocrinology,** v.120, p.1873-81, 1987.

Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 97(14), p. 7829-34, 2000.

Siddiqi A, Burrin JM, Wood DF, Monson JP. Tri-iodothyronine regulates the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. **J Endocrinol.,** v. 157(3), p. 453-61, 1998.

Simsek G, Karter Y, Aydin S, Uzun H. Osteoporotic cytokines and bone metabolism on rats with induced hyperthyroidism; changes as a result of reversal to euthyroidism. **Chin J Physiol**, v.46 (4), p.181-6, 2003.

Sozer V, Uzun H, Guner I, Aydin S, Yucel R, Karter Y, Simsek C, Kaya S, Yigit G, Simsek G. Bone metabolism in ovariectomized rats with induced hyperthyroidism: the effect of estrogen replacement. **Chin J Physiol**., v. 49 (6), p.335-41, 2006.

Vanderschueren, D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. **Endocrine Reviews,** v.25, p.389-425, 2004.

Vestergaard P, Mosekilde L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients. **Thyroid**, v.12, p.411-9, 2002.

Williams GR, Bland R, Sheppard MC. Characterization of thyroid hormone (T3) receptors in three osteosarcoma cell lines of distinct osteoblast phenotype: interactions among T3, vitamin D3, and retinoid signaling. **Endocrinology**, v.135, p.2375-85, 1994.

Wilson, TG., Kornman, KS. Fundamentos de Periodontia. In:___. **A bioquímica e a fisiologia do periodonto**. 1ª ed. São Paulo: Quintessence, p.61-107, 2001.

Zar, JH. **Biostatistical Analysis**, 4th Ed., Prentice-Holl, New Jersey, p.663, 1999.