

# *Efeito da Associação Hipotireoidismo-Castração no Osso e nas Paratireóides de Ratas Adultas*

**artigo original**

## **RESUMO**

O efeito do hipotireoidismo sobre o metabolismo ósseo e as paratireóides na deficiência ou suficiência dos esteróides ovarianos foi estudado em 32 ratas Wistar, com 2 meses de idade, distribuídas em 4 grupos de 8: eutireóideo não castrado (ENC), eutireóideo castrado (EC), hipotireóideo não castrado (HNC) e hipotireóideo castrado (HC). Após 120 dias de tratamento, as ratas foram sacrificadas e o plasma colhido para dosagem de T4 livre. Foi evidenciada hipertrofia das paratireóides somente no grupo HNC. As ratas do grupo HNC apresentaram osteopenia de maior extensão e intensidade, decorrente do menor crescimento, da inibição da aposição e do aumento da reabsorção ósseas. Nas ratas EC, a osteopenia foi causada por menor aposição e aumento da reabsorção ósseas. Embora a osteopenia na associação hipotireoidismo-castração tenha sido quase sempre mais intensa em relação à das ratas EC, sua intensidade, quando comparada à osteopenia dos animais HNC, foi variável e dependente do sítio ósseo estudado. Apesar de causar necrose dos ossos de maior metabolismo, a associação hipotireoidismo-castração não potencializou a osteopenia decorrente da ação isolada do hipotireoidismo até os 120 dias de tratamento. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/4:525-534)**

**Descritores:** Hipotireoidismo; Castração; Osso; Paratireóide; Rata

## **ABSTRACT**

### **Effect of the Hypothyroidism-Castration Association on the Bone and Parathyroids from Adult Female Rats.**

The effect of hypothyroidism on bone metabolism and the parathyroids in states of deficiency or sufficiency of sex steroids was studied in 32 two-months-old female Wistar rats distributed in 4 groups of 8 animals each: intact euthyroid (IE), castrated euthyroid (CE), intact hypothyroid (IH) and castrated hypothyroid (CH). After 120 days of treatment, animals were sacrificed and plasma taken to assess free T4. Hyperplasia or hypertrophy of all parathyroids were evident only in IH and CE groups. Of all groups, IH rats presented the most extensive osteopenia, reaching lumbar vertebrae, dental alveolae (jaw and mandible) and long bones. In this group osteopenia resulted from the reduced bone growth, inhibition of bone apposition and return of bone resorption. Although osteopenia in the CH group was almost always more intense in relation to osteopenia presented by CE rats, its intensity was variable when compared to IH rats and dependent on the region studied. Even though it also caused necrosis of higher metabolism bones, the association hypothyroidism-castration did not potentialize the resultant osteopenia of the isolated action of hypothyroidism or castration until 120 days of treatment. **(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/4:525-534)**

**Keywords:** Hypothyroidism; Castration; Bone; Parathyroid; Rat

*Ana Flávia de C. Ribeiro  
Rogéria Serakides  
Natália de Melo Ocarino  
Vera Alvarenga Nunes*

*Setor de Patologia do  
Departamento de Clínica e  
Cirurgia Veterinárias,  
Universidade Federal de Minas  
Gerais, Belo Horizonte, MG.*

*Recebido em 05/11/03  
Revisado em 10/03/04 e 02/06/04  
Aceito em 11/06/04*

**O** HIPOTIREOIDISMO está entre as desordens endócrinas mais comuns em indivíduos de todas as idades (1). A doença vem sendo estudada há varias décadas por causar retardo do crescimento (2-4) e reduzir a diferenciação, maturação e metabolismo das células ósseas, acarretando osteopenia (5,6). Também é conhecido o papel da deficiência dos esteróides sexuais na gênese da osteoporose, principalmente a da menopausa (7,8). Postula-se que os fatores de risco para essa doença sejam inúmeros e dentre eles estejam as disfunções tireoideanas (9,10).

A inter-relação entre hormônios tireoideanos e sexuais femininos sobre o metabolismo ósseo já foi estudada no hipertireoidismo (11,12), ficando comprovado que, em ratas castradas, doses elevadas de tiroxina levam à osteopenia mais intensa (11) ou de maior extensão (12). Isso aponta o hipertireoidismo como fator de risco para a indução ou o agravamento da osteopenia da castração. Mas, apesar do hipotireoidismo e da afuncionalidade das gônadas serem uma associação freqüente na mulher (13,14), a hipofunção tireoideana não é considerada como fator de risco para a osteoporose. Se o hipotireoidismo reduz a aposição óssea e causa osteoporose em indivíduos com gônadas funcionais (5,9), seria esperado que a associação hipotireoidismo-castração acelerasse a redução da massa óssea pelo sinergismo entre eles. A associação hipotireoidismo-castração em outros tecidos agrava ou minimiza os efeitos da deficiência isolada de cada hormônio (12,15-17). Entretanto, a resposta do osso à deficiência conjunta desses hormônios não foi ainda estudada. Tudo isso remete a perspectivas de estudo para a elucidação da importância do eixo tireoide-gônadas no aumento dos riscos para a osteoporose.

Na osteoporose humana, além da redução do processo anabólico do osso, parece haver aumento do catabolismo ósseo. Grande importância é dada hoje à reabsorção óssea como fator causal da osteoporose, e a maior parte das medidas terapêuticas e profiláticas visam o equilíbrio do cálcio (18). O paratormônio (PTH) é um dos principais hormônios reguladores da homeostasia do cálcio (19). No entanto, sua participação como mediador da perda óssea decorrente das disfunções tireoideanas e da castração é controversa. A maioria dos estudiosos concorda que a osteopenia da castração não é mediada pelo PTH (20,21), mas, nas disfunções tireoideanas, os relatos são de que o osso altera sua responsividade ao PTH (22,23). No hipotireoidismo, por exemplo, o tecido ósseo seria resistente à ação do PTH (24), exatamente por haver diminuição da reabsorção óssea. Mas é importante salientar que a deficiência dos hormônios tireoideanos

por si só seria capaz de reduzir o metabolismo ósseo, inibindo a aposição e a reabsorção ósseas (5). Assim, é conveniente investigar, também, a morfologia das paratireóides no hipotireoidismo. O objetivo deste trabalho é estudar o efeito do hipotireoidismo sobre a morfologia das paratireóides e de todo o esqueleto na deficiência ou suficiência dos esteróides sexuais femininos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 32 ratas Wistar com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas (quatro ratas/caixa), recebendo a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água ad libitum. As ratas foram submetidas a um regime de 12 horas de luz e 12 horas sem luz. Após um período de adaptação de 10 dias, 16 ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral. Foram formados quatro grupos com oito animais de acordo com o seguinte esquema: (1) eutireóide não castrado, (2) eutireóide castrado, (3) hipotireóide não castrado e (4) hipotireóide castrado. Uma semana após a castração, o hipotireoidismo foi induzido mediante administração diária de propiltiouracil (PTU) (Sigma, Usa) durante 120 dias, por sonda oro-gástrica, na dose de 1mg/animal, diluído em 5ml de água destilada. As ratas dos grupos eutireóides castrado e não castrado receberam 5ml de água destilada, como placebo, também administrada por sonda oro-gástrica. Todos os grupos receberam seus respectivos tratamentos no mesmo horário.

Os animais foram anestesiados com éter e sacrificados por punção cardíaca 120 dias após o início da administração do PTU. O sangue foi colhido para obtenção do plasma para posterior dosagem de tiroxina (T4) livre pela técnica da quimioluminescência em sistema totalmente automático com CV intra-ensaio de 4% e CV inter-ensaio de 7% (*Access Immunoassay System*, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Chaska, MN, USA), a fim de confirmar a indução do estado hipotireóide. À necropsia, o útero foi avaliado para confirmar o sucesso da castração e os esqueletos foram separados em dois antímeros. O lado direito de cada carcaça foi radiografado na posição látero-lateral para mensuração da largura da cortical do fêmur (C), largura do canal medular (M) e largura total do fêmur (T) na porção média da diáfise, com auxílio de uma lupa e régua milimetrada. O índice cortical do fêmur foi posteriormente obtido pela equação:  $IC = (T-M)/T$ .

Após fixação do antímero direito da carcaça em formalina a 10% neutra e tamponada, o úmero, rádio, fêmur e tíbia foram dissecados e tiveram seus comprimentos

mentos medidos (epífise a epífise) com auxílio de uma régua milimétrica. Os ossos de cinco animais por grupo, escolhidos aleatoriamente, foram desmineralizados em solução de ácido fórmico a 10%, tamponado com citrato de sódio para pH 4.5, sob vácuo moderado. Vértex cervicais, torácicas e lombares, crânio, mandíbula, maxila e ossos longos (fêmur, tibia, úmero e rádio) foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções de cada osso foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (HE), safranina *O-fast green* e azul de toluidina para avaliação histológica.

As paratireóides dos oito animais de cada grupo foram colhidas e fixadas em formalina a 10% neutra e tamponada. Pela coloração da hematoxilina-eosina, verificou-se a porcentagem dos componentes estruturais da glândula (núcleo, citoplasma e interstício). Para tanto, toda a área abrangida pelo corte histológico da glândula foi projetado sobre uma graticula contendo 2000 pontos, distribuídos em 40 fileiras e 50 colunas, coberto completamente pela projeção. Pela objetiva de imersão, foram obtidos a razão citoplasma/núcleo, parênquima/interstício e as frequências relativas (%) de núcleo, citoplasma e interstício (estroma e vasos sanguíneos) pela fórmula:  $\% = N/2000 \times 100$ , onde N é o total de interseções de cada estrutura com os pontos da graticula.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com quatro tratamentos e oito repetições por tratamento, sendo cada animal uma repetição. A verificação da significância da diferença entre as médias foi realizada pelo teste Student Newman Keuls (SNK).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Confirmação da hipofunção da tireóide e das gônadas

Os resultados da dosagem de tiroxina livre encontram-se na tabela 1. As concentrações plasmáticas de T4 livre nos grupos hipotireóides foram significativamente menores quando comparadas às das ratas eutireóides, confirmando a indução do hipotireoidismo. Interessante é que a castração elevou significativamente os valores plasmáticos de T4 livre no estado eutireóide.

Já no hipotireoidismo, embora o valor da T4 livre tenha sido aparentemente maior nas ratas castradas comparado ao das ratas hipotireóides não castradas, essa diferença não foi significativa.

No homem, o aumento da T4 livre determinado pelo hipogonadismo pode decorrer da diminuição da concentração plasmática da proteína ligante da tiroxina (TBG), com conseqüente aumento dos valores plasmáticos da fração livre da T4 (25). Embora ratos tenham a TBG, a pré-albumina é a principal proteína de ligação da tiroxina (TBPA) (26), o que não permite afirmar com exatidão que a elevação de T4 livre em ratas castradas ocorre por redução da concentração das proteínas plasmáticas de ligação da tiroxina.

O útero visivelmente atrofiado nas ratas castradas, independente do estado funcional da tireóide, confirmou a eficácia da castração na indução da afunção das gônadas.

### Histomorfometria das paratireóides

As paratireóides dos animais do grupo controle (eutireóide não castrado), hipotireóide castrado e eutireóide castrado apresentavam morfologia heterogênea. Algumas apresentavam padrões de normalidade, enquanto outras apresentavam quadro de hiperplasia e/ou de hipertrofia celular.

Apesar da dieta e das condições ambientais terem sido as mesmas para todos os animais, a heterogeneidade da morfologia das paratireóides observada nesses grupos pode ser explicada pela própria fisiologia da glândula, que se modifica continuamente para controlar minuto a minuto o cálcio plasmático (27).

Mas no grupo hipotireóide não castrado, a morfologia das paratireóides das ratas hipotireóides com gônadas funcionais foi semelhante em todos os animais. As glândulas apresentavam hipertrofia intensa das células, compatível com aumento da atividade de secreção de PTH. A análise morfométrica reafirmou a intensa atividade observada em todas as paratireóides desse grupo (tabela 2). A razão citoplasma/núcleo, que indica o grau de hipertrofia celular e a razão parênquima/interstício, que exprime o grau de hiperplasia da glândula, foram significativamente maiores em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Considerando cada componente estrutural da glândula, observou-se

**Tabela 1.** Resultados da concentração plasmática de T4 livre de ratas eutireóides e hipotireóides, castradas ou não castradas.

T4 livre (ng/dl)	Eutireóide não castrado (n= 8)	Eutireóide castrado (n= 8)	Hipotireóide não castrado (n= 8)	Hipotireóide castrado (n= 8)
	1,81 ± 0,45 <sup>a</sup>	2,92 ± 0,92 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,11 ± 0,03 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

que houve aumento significativo na frequência média relativa do citoplasma e diminuição do interstício.

O aumento da atividade das paratireóides no hipotireoidismo provavelmente ocorreu a fim de propiciar a manutenção da isocalcemia. Sabe-se que nas deficiências de T3 e T4, a absorção intestinal de cálcio diminui (28), já que os hormônios tireoideanos aumentam o transporte intestinal do cálcio mediado pela vitamina D (29,30). Além disso, o hipotireoidismo altera o metabolismo do hormônio do crescimento (GH), reduzindo sua concentração plasmática (31-33). Na deficiência do GH, há também redução do transporte passivo e ativo do cálcio intestinal (34), pois ele estimula a conversão da vitamina D inativa para sua forma ativa (35), regula os seus receptores (36) e eleva os níveis da proteína ligadora do cálcio no intestino (37). Assim, é provável que a hipertrofia das paratireóides no hipotireoidismo seja uma resposta à perda da homeostasia do cálcio.

Mas a morfologia variável das paratireóides no grupo hipotireóideo castrado intrigou. Se o quadro morfológico predominante no hipotireoidismo é de hipertrofia, se na castração há algumas tireóides com hiperplasia, e se a hipofunção das gônadas (38) e da tireóide causa hipocalcemia (23), seria esperado que, na associação hipotireoidismo-castração, a hipocalcemia se agravasse, estimulando as paratireóides, à semelhança do que foi observado nas ratas hipotireóideas não castradas. Baseando-se somente na morfologia da paratireóide, essa questão fica sem resposta. Talvez a morfologia óssea possa esclarecer sobre o porquê da paratireóide não aumentar sua atividade na associação hipotireoidismo-castração.

## Morfometria óssea

A média do comprimento dos ossos longos em cada grupo encontra-se na tabela 3. O hipotireoidismo reduziu o comprimento do úmero, do rádio e do fêmur independente do estado funcional das gônadas. No entanto, a castração não alterou o comprimento desses ossos nos estados hipo e eutireóideo (tabela 3).

Na tíbia, o resultado foi interessante e diferiu daquele encontrado nos demais ossos longos. Embora o hipotireoidismo também tenha reduzido seu comprimento em ratas com gônadas funcionais, nas ratas hipotireóideas castradas não foi observado o mesmo efeito, e a tíbia apresentou crescimento longitudinal semelhante ao do controle. Ao contrário dos demais ossos longos, a castração também aumentou o comprimento da tíbia no estado eutireóideo (tabela 3).

Sabe-se que os hormônios tireoideanos são importantes para a diferenciação dos condrócitos e que, na sua deficiência, ocorre retardo do crescimento (2,3). No entanto, o efeito dos hormônios tireoideanos e sexuais sobre as cartilagens de crescimento é antagônico, h a v e ndo, na deficiência dos esteróides sexuais, maior proliferação e atividade de síntese dos condrócitos, acelerando o crescimento longitudinal dos ossos (39). A castração também eleva T4 livre plasmática, que atua na placa, estimulando a diferenciação dos condrócitos (2). Assim, na associação hipotireoidismo-castração, seria esperado que o crescimento longitudinal de todos os ossos longos fosse semelhante ao do controle. Mas por que somente na tíbia a castração estimulou o crescimento longitudinal no estado eutireóideo e impediu o retardo do crescimento provocado pelo hipotireoidismo?

**Tabela 2.** Resultado das variáveis estudadas na histomorfometria das paratireóides de ratas adultas hipotireóideas e eutireóideas, castradas ou não castradas.

Variável	Eutireóideo não castrado (n= 8)	Eutireóideo castrado (n= 7)	Hipotireóideo não castrado (n= 8)	Hipotireóideo castrado (n= 8)
Núcleo (%)	39 ± 0,03 <sup>a</sup>	42 ± 0,03 <sup>a</sup>	39 ± 0,03 <sup>a</sup>	45 ± 0,03 <sup>a</sup>
Citoplasma (%)	31 ± 0,02 <sup>a</sup>	30 ± 0,02 <sup>a</sup>	43 ± 0,02 <sup>b</sup>	31 ± 0,02 <sup>a</sup>
Interstício (%)	30 ± 0,02 <sup>a</sup>	28 ± 0,02 <sup>a</sup>	18 ± 0,02 <sup>b</sup>	24 ± 0,02 <sup>a,b</sup>
C/N	0,84 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,08 <sup>a</sup>
P/I	2,47 ± 0,50 <sup>a</sup>	3,02 ± 0,53 <sup>a</sup>	5,09 ± 0,50 <sup>b</sup>	3,51 ± 0,50 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si (p 0,05). C/N= razão citoplasma/núcleo; P/I= razão parênquima/interstício.

**Tabela 3.** Resultado do comprimento dos ossos longos de ratas adultas hipotireóideas e eutireóideas, castradas ou não castradas.

Variável	Eutireóideo não castrado (n= 8)	Eutireóideo castrado (n= 8)	Hipotireóideo não castrado (n= 8)	Hipotireóideo castrado (n= 8)
Úmero (cm)	2,74 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,50 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,46 ± 0,07 <sup>b</sup>
Rádio (cm)	2,62 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,09 <sup>b</sup>	2,41 ± 0,15 <sup>b</sup>
Fêmur (cm)	3,66 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,14 <sup>a</sup>	3,32 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,38 ± 0,11 <sup>b</sup>
Tíbia (cm)	4,00 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,13 ± 0,14 <sup>b</sup>	3,75 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,88 ± 0,15 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si (p 0,05).

No rato, o crescimento longitudinal dos ossos ocorre por toda a vida (40), mas outros autores discordam dessa assertiva (41,42). Em todos os grupos estudados, o efeito do hipotireoidismo sobre o crescimento longitudinal dos ossos era visível, embora variável em intensidade dependendo do osso e do perfil sérico dos esteroídes sexuais. É provável que uma das explicações para a diferença na resposta do crescimento longitudinal da tibia seja decorrente do fato de que, no rato a placa epifisária da tibia permanece ativa por tempo mais prolongado quando comparada aos demais ossos longos. Com relação aos resultados da medida da largura da cortical, largura do canal medular e da largura total do fêmur na porção média da diáfise, bem como do índice cortical do fêmur, não houve diferença significativa entre grupos (tabela 4). Ao contrário do exame radiológico, a análise histológica dos ossos, mais precisa, permitiu evidenciar várias alterações e diferenças entre os tratamentos.

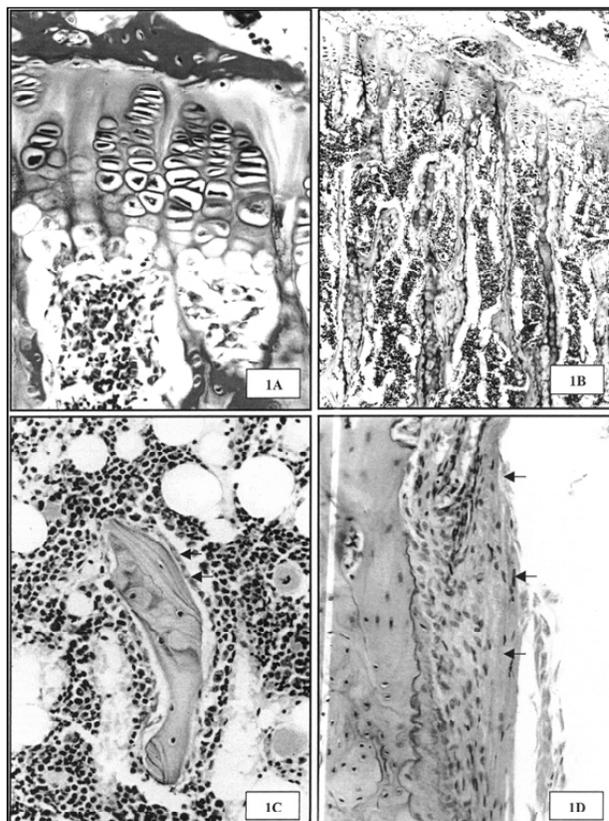
### Morfologia óssea

#### Grupo eutireóideo não castrado

Os ossos das ratas eutireóideas não castradas (controle) apresentavam padrão de normalidade. A placa epifisária dos ossos longos e das vértebras apresentava-se bem diferenciada, mas com a zona de repouso ou proliferação pouco visível. A tibia apresentava placa epifisária melhor diferenciada e, em toda a sua extensão, havia invasão vascular com erosão da matriz cartilaginosa (figura 1A) e formação da esponjosa primária. A placa óssea terminal proximal apresentava-se espessa, e as trabéculas epifisárias e metafisárias estavam espessas e confluentes (figura 1B). Os osteoblastos recobriam toda a superfície das trabéculas e apresentavam-se ora ativos, cuboidais, com núcleo volumoso e oval (figura 1C), ora inativos, achatados com núcleo fusiforme e intensamente basofílico. A maioria dos osteócitos apresentava-se pequena, alojada em lacunas estreitas com ausência ou diminuição da basofilia e da metacromasia na borda lacunar e na matriz adjacente. O periósteo apresentava-se espesso, bem vascularizado e com grande quantidade de fibroblastos ativos (figura 1D).

#### Grupo eutireóideo castrado

As ratas eutireóideas castradas apresentavam osteopenia envolvendo, principalmente, o tecido ósseo trabecular. A placa epifisária dos ossos longos e das vértebras apresentava-se pouco diferenciada e com redução da zona de proliferação. As colunas de condrócitos eram



**Figura 1.** Ossos longos de ratas eutireóideas não castradas (controle). A) Tibia proximal com placa epifisária bem diferenciada. Safranina O-fast green, 429x. B) Tibia proximal com trabéculas metafisárias espessas e confluentes. HE, 107x. C) Fêmur distal com trabécula metafisária recoberta por osteoblastos ativos (setas), cuboidais, com núcleo volumoso e oval. HE, 407x. D) Tibia proximal com periósteo espesso, bem vascularizado e com grande quantidade de fibroblastos ativos (Setas). HE, 321x.

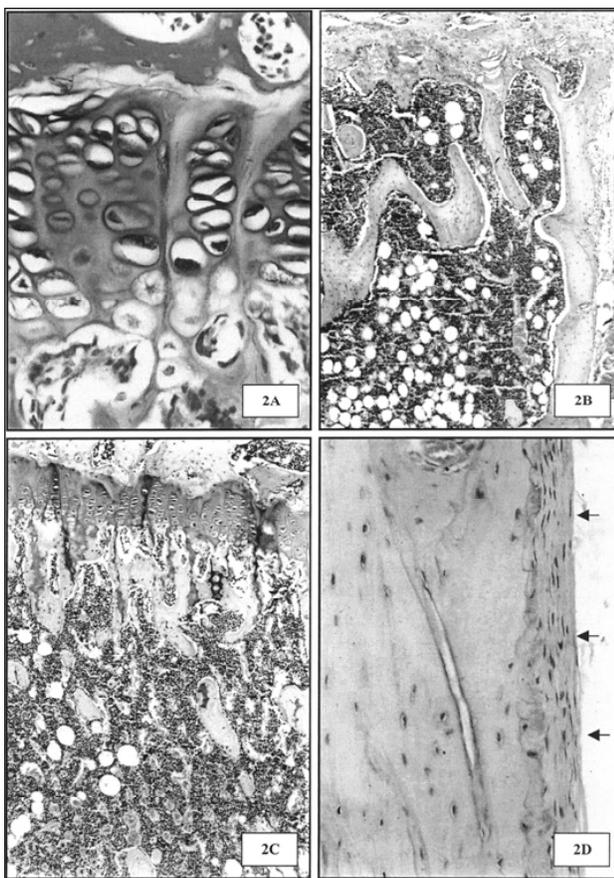
**Tabela 4.** Resultado das variáveis medidas no fêmur de ratas adultas hipotireóideas e eutireóideas, castradas ou não castradas.

Variável	Eutireóideo não castrado (n= 8)	Eutireóideo castrado (n= 8)	Hipotireóideo não castrado (n= 8)	Hipotireóideo castrado (n= 8)
Largura da cortical (mm)	0,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>a</sup>
Largura do canal medular (mm)	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>
Largura total (mm)	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>a</sup>
Índice cortical	0,45 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,08 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem estatisticamente entre si (p 0,05).

irregulares, havia extensas áreas acelulares (figura 2A) e a invasão vascular não ocorria em toda a extensão da placa epifisária.

As trabéculas epifisárias e metafisárias do fêmur, tíbia, úmero e das vértebras e as trabéculas da mandíbula e maxila apresentavam-se adelgaçadas, acinturadas e, às vezes, fragmentadas (figuras 2B e 2C). Os osteoblastos recobriam toda a superfície das trabéculas, mas eram fusiformes e inativos, quadro característico da osteoporose (43). Embora a osteopenia tenha sido observada em todo o segmento vertebral, a redução da quantidade de osso foi mais evidente nas primeiras vértebras lombares. Além disso, dos ossos longos, a tíbia sofreu menos os efeitos da deficiência dos esteróides sexuais, provavelmente por ter sido o único osso longo que teve seu crescimento estimulado pela castração (tabela 3).



**Figura 2.** Ossos de ratas eutireóideas castradas. A) Tíbia proximal com placa epifisária pouco diferenciada e com colunas de condrócitos irregulares. Safranina O-fast green, 429x. B) Vértebra torácica com trabéculas metafisárias adelgaçadas e fragmentadas. HE, 81x. C) Tíbia proximal com trabéculas metafisárias adelgaçadas e fragmentadas. HE, 107x. D) Tíbia proximal com perióstio delgado composto por fibroblastos inativos (setas). HE, 321x.

Os osteócitos profundos apresentavam núcleo volumoso e estavam alojados em lacunas largas com bordas basofílicas e metacromáticas.

Há muita controvérsia no que concerne aos sítios preferenciais da osteopenia da castração. Alguns autores relatam maior redução da quantidade de osso na tíbia do que nas vértebras lombares (44), e acometendo somente o tecido ósseo trabecular (45). No entanto, embora a osteopenia tenha sido mais intensa no tecido ósseo trabecular, sabidamente de maior metabolismo, já haviam indícios dos efeitos da deficiência dos esteróides sexuais sobre a cortical dos ossos longos e das vértebras. Os canais vasculares da cortical estavam alargados e o perióstio apresentava-se delgado com fibroblastos inativos (figura 2D), mas sem redução aparente da espessura da cortical.

As alterações ósseas observadas nesse grupo são compatíveis com o quadro morfológico de osteoporose semelhante aos resultados de outros pesquisadores (12,43). A deficiência dos esteróides sexuais parece ser responsável pela diminuição da aposição óssea, já que o estrógeno e a progesterona estimulam a diferenciação dos osteoblastos e a síntese da matriz óssea (39). Assim, associada à redução da aposição óssea, a reabsorção óssea, pela osteólise osteocítica, em resposta à hiperatividade das paratireóides, evidenciada em algumas glândulas desse grupo, provavelmente também contribuiu para a osteopenia da castração.

#### Grupo hipotireóideo não castrado

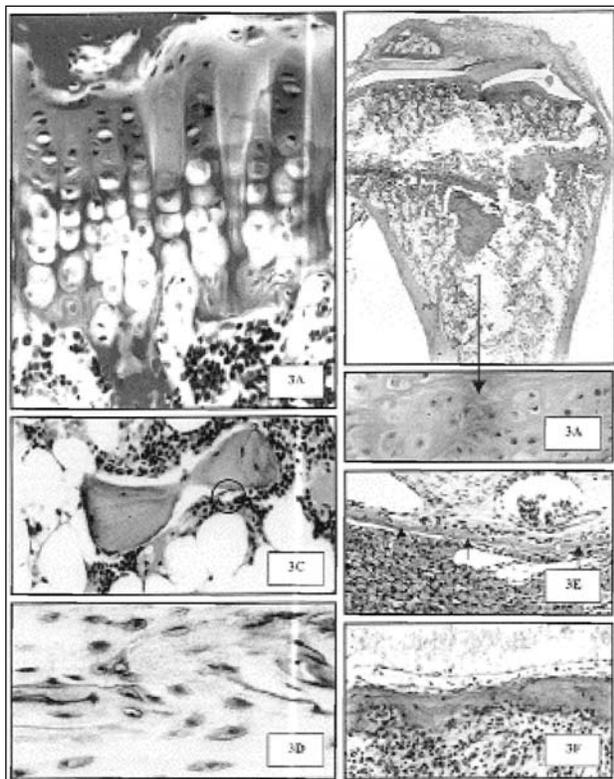
A osteopenia do hipotireoidismo foi aparentemente mais intensa e extensa em comparação à osteopenia da castração, acometendo tanto o tecido ósseo trabecular quanto o cortical. A placa epifisária dos ossos longos e vértebras estava pouco diferenciada, e a zona hipertrófica apresentava células de tamanho reduzido e com picnose nuclear, sinais de degeneração (figura 3A). Em alguns animais, ninhos de cartilagem avascular contendo condrócitos degenerados estavam retidos na metáfise, quadro característico de condrodistrofia (figura 3B). Não havia erosão vascular da matriz cartilaginosa e, em todos os ossos longos e vértebras, a placa epifisária estava selada pela placa óssea terminal distal, com interrupção do crescimento ósseo (figura 3A).

As trabéculas epifisárias, mas principalmente as metafisárias, apresentavam-se em número reduzido, delgadas, acinturadas e fragmentadas. Os osteoblastos de revestimento apresentavam-se achatados, em número reduzido e não recobriam toda a superfície das trabéculas (figura 3C). Os osteócitos profundos estavam ativos, com núcleo oval volumoso, alojados em lacunas largas de bordas basofílicas e metacromáticas

(figura 3D). Embora todo o esqueleto apresentasse osteopenia, sua intensidade foi maior na região proximal da tíbia, nas vértebras lombares, na maxila, mandíbula e nos ossos nasais.

A cortical apresentou redução aparente da sua espessura, principalmente nas vértebras lombares, na metáfise proximal do úmero e da tíbia e na metáfise distal do rádio e do fêmur. O periósteo era fibroso, pouco celularizado, semelhante ao das ratas eutireóideas castradas.

Na maxila e mandíbula, havia alargamento dos espaços intertrabeculares e diminuição das cristas interdentária e inter-radicular. As trabéculas apresentavam-se delgadas, recobertas por osteoblastos inativos e compostas por osteócitos alojados em lacunas largas de



**Figura 3.** Ossos das ratas hipotireóideas não castradas. A) Tíbia proximal com placa epifisária pouco diferenciada e zona hipertrófica com células de tamanho reduzido e com picnose nuclear. Safranina O-fast green, 429x. B) Tíbia proximal com fendas entre a placa epifisária e as trabéculas metafisárias e ninhos de cartilagem avascular. HE, 13,7x. Detalhe mostra condrócitos degenerados retidos na metáfise. HE, 332x. C) Fêmur distal com trabécula acinturada e revestida por osteoblastos achatados e em número reduzido (círculo). HE, 407x. D) Cortical da tíbia proximal com osteócitos profundos ativos, com núcleo volumoso, alojados em lacunas largas. Azul de toluidina, 489x. E) Osso nasal delgado (setas) em comparação ao do grupo controle (F). HE, 257x.

bordas basofílicas e metacromáticas. O osso nasal apresentava-se delgado e descontínuo, com vários pontos de acinturamento e fragmentação (figura 3E) em comparação ao do grupo controle (figura 3F). Havia, também, redução intensa da celularidade da medula óssea. Aliás, nesses mesmos animais foi evidenciada anemia normocítica e normocrômica (17).

No hipotireoidismo, apesar da ativação da reabsorção óssea, a osteopenia parece ter como principal causa a redução da aposição óssea, tal como já descrito por outros pesquisadores (9). Na hipofunção tireoideana, há redução do metabolismo geral e das células ósseas que apresentam receptores para T3 (23). Entretanto, é difícil estabelecer como a aposição óssea se reduz no hipotireoidismo. Acredita-se que os hormônios tireoideanos estimulam a aposição óssea diretamente por se ligarem aos seus receptores nos osteoblastos ou indiretamente, mediado pelo GH e pelos IGFs (31-33). Além disso, a hipocelularidade da medula óssea também pode contribuir na gênese da osteoporose do hipotireoidismo, já que ela é importante fonte de células osteoprogenitoras e de fatores de crescimento e citocinas envolvidos na aposição e reabsorção ósseas (46). Mas a osteopenia também parece ter sido resultante da interrupção do crescimento, que contribui tanto para a formação das trabéculas quanto para o crescimento em espessura do osso cortical (12).

O aumento da atividade reabsorviva dos osteócitos profundos parece ter sido estimulado pelo PTH. A assertiva de que no hipotireoidismo o osso não é responsivo ao PTH (24) parece incorreta, já que foi demonstrado que a hipertrofia das paratireóides é acompanhada de aumento da reabsorção óssea nesses animais. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de elucidar a participação do PTH na gênese da osteopenia decorrente da hipofunção tireoideana.

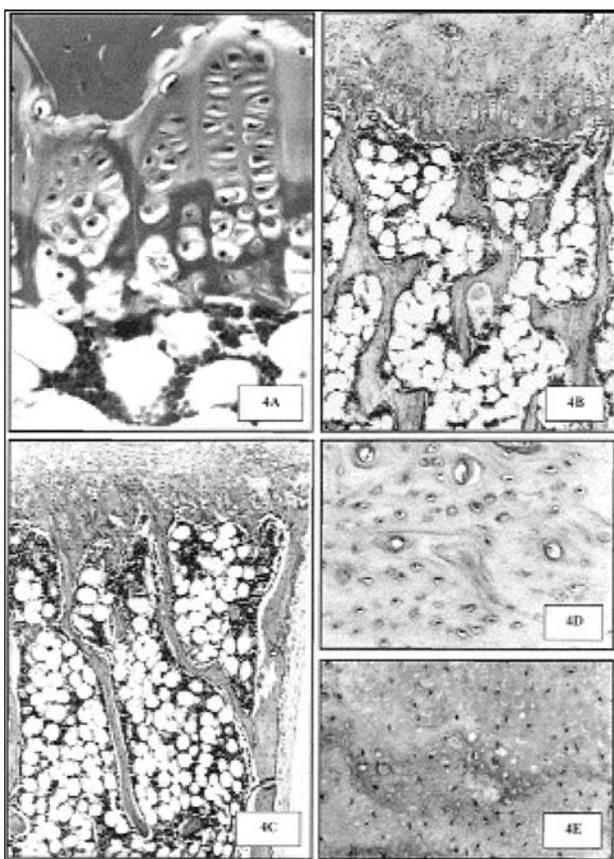
#### Grupo hipotireóideo castrado

A placa epifisária dos ossos longos e vértebras, à semelhança das ratas hipotireóideas com gônadas funcionais, estava pouco diferenciada, e a zona hipertrófica apresentava células de tamanho reduzido e com picnose nuclear (figura 4A). Em alguns animais, também foi observado quadro característico de condrodistrofia. Não havia erosão vascular da matriz cartilaginosa, e a placa óssea terminal distal selava alguns pontos ou toda a extensão da placa de crescimento (figura 4B).

As trabéculas epifisárias e metafisárias das vértebras, rádio, úmero e fêmur apresentavam-se delgadas, acinturadas e fragmentadas (figura 4C). Na tíbia, as trabéculas também apresentavam-se delgadas (figura

4B), mas estavam em número aparentemente maior do que o observado nos animais hipotireóides não castrados, e a quantidade de osso se assemelhava à da tíbia de ratas eutireóides castradas (figura 2C). Os osteoblastos apresentavam-se achatados com núcleos fusiformes e cromatina densa. Os osteócitos profundos apresentavam-se inativos, picnóticos e alojados em lacunas largas com bordas pouco basofílicas (figura 4D). A cortical apresentava-se delgada e revestida por periosteio pouco celularizado e fibroso, semelhante à das ratas eutireóides castradas e hipotireóides não castradas.

A osteopenia dos ossos longos, com exceção da tíbia, era semelhante à do hipotireoidismo em ratas



**Figura 4.** Ossos de ratas hipotireóides castradas. A) Tíbia proximal com placa epifisária pouco diferenciada e zona hipertrófica com células de tamanho reduzido e com picnose nuclear. Safranina O-fast green, 429x. B) Tíbia proximal com trabéculas metafisárias delgadas, acinturadas e fragmentadas. HE, 107x. C) Vértebra torácica com trabéculas delgadas, acinturadas e fragmentadas e intenso infiltrado adiposo. HE, 81x. D) Cortical do úmero distal com osteócitos profundos inativos, picnóticos e alojados em lacunas largas. HE, 429x. E) Maxila com matriz óssea tumefeita, com osteócitos picnóticos e lacunas vazias de osteócitos, características da osteonecrose. HE, 302x.

com gônadas funcionais e mais intensa em comparação à das ratas eutireóides castradas, porque, além da inibição da aposição óssea, também houve inibição do crescimento longitudinal. Um dos fatores que podem ser apontados para justificar a diferença na intensidade da osteopenia da tíbia em comparação aos demais ossos longos foi o maior crescimento longitudinal desse osso na associação hipotireoidismo-castração, quando comparado ao grupo hipotireóide não castrado (tabela 3). Essa observação é importante, pois a tíbia é um dos ossos mais utilizados como modelo para os estudos do metabolismo ósseo nas disfunções endócrinas (18,47-49). Mas, no presente estudo, ficou claramente demonstrado que a resposta da tíbia às disfunções das gônadas e da tireóide é específica e não segue o mesmo padrão dos demais ossos. Assim, estudar somente as alterações da tíbia é insuficiente para prover conclusões sobre a resposta do esqueleto às alterações hormonais.

Nas vértebras lombares, maxila e mandíbula, a aposição e a reabsorção por osteólise osteocítica também estavam inibidas, mas, em algumas áreas, a matriz óssea apresentava-se tumefeita, com perda da basofilia, com osteócitos picnóticos e lacunas vazias de osteócitos, características da osteonecrose (figura 4E). Interessante é que, embora houvesse também necrose óssea nesses sítios de maior metabolismo, a osteopenia das ratas hipotireóides castradas apresentou intensidade semelhante quando comparada à das ratas hipotireóides não castradas. É provável que esse quadro se agravasse nos meses subsequentes, intensificando a osteopenia e acometendo mais unidades esqueléticas.

A necrose do tecido ósseo também causa liberação de cálcio no sangue e poderia estar contribuindo para a manutenção da isocalcemia. Talvez por essa razão não tenha ocorrido hiperfunção das paratireóides nesses animais. Intrigante é que a necrose óssea não foi observada na deficiência isolada dos esteróides sexuais ou dos hormônios tireoideanos. Sabe-se que o estrógeno é importante para a viabilidade dos osteócitos e que, na sua deficiência, ocorre aumento da taxa de apoptose dessas células (50). Não é possível apontar a gênese pela qual a deficiência conjunta dos esteróides sexuais e dos hormônios tireoideanos causa necrose óssea. Uma consideração recai sobre a utilização do PTU para indução do hipotireoidismo. Entretanto, vale ressaltar que a osteonecrose não foi observada nas ratas não castradas tratadas com PTU, o que torna a possibilidade de efeito tóxico do PTU sobre o osso destituída de argumentação lógica.

## CONCLUSÕES

O hipotireoidismo em ratas, induzido por 120 dias com propiltiouracil, causa osteopenia intensa e extensa pela inibição da aposição, interrupção do crescimento longitudinal e pelo aumento da reabsorção óssea. A castração causa osteopenia por diminuição da aposição e por aumento da reabsorção óssea. Tanto na castração quanto no hipotireoidismo, o osso responde à hiperatividade das paratireóides com incremento da atividade reabsorviva dos osteócitos profundos. A associação hipotireoidismo-castração causa osteopenia de grau variável e dependente do sítio ósseo por redução da aposição e inibição do crescimento ósseo longitudinal. A associação hipotireoidismo-castração causa necrose dos ossos de maior metabolismo, mas não potencializa a osteopenia decorrente da ação isolada do hipotireoidismo até os 120 dias de tratamento. O estudo somente das alterações histológicas da tibia é insuficiente para prover conclusões sobre a resposta do esqueleto às deficiências dos hormônios ovarianos e tireoideanos.

## REFERÊNCIAS

1. Ishikawa Y, Genge BR, Wuthier RE. Thyroid hormone inhibits growth and stimulates terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes. **J Bone Min Res** 1998;13:1398-411.
2. Williams GR, Robson H, Shalet SM. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. **J Endocrinol** 1998;157:391-403.
3. Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. **Endocrinology** 2000;141:3887-96.
4. Stevens DA, Hasserjian RP, Robson H, Siebler T, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. **J Bone Min Res** 2000;15:2431-2.
5. Mosekilde L, Melsen F. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism. **Acta Path Microbiol Scand** 1978;86:56-62.
6. Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. **Bone** 1986;7:101-8.
7. Ross PD. Prediction of fracture risk II: other risk factors. **Am J Med Sci** 1996;312:260-9.
8. Gaumet-Meunier N, Coxam V, Robins S, Pastoureau P, Pointillart A, Davicco MJ, et al. Gonadal steroids and bone metabolism in young castrated male rats. **Calcif Tissue Int** 2000;66:470-5.
9. Allain TJ, Thomas MR, McGregor AM, Salisbury JR. A histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. **Bone** 1995;16:505-9.
10. Nguyen TT, Heath H 3rd, Bryant SC, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Fractures after thyroidectomy in men: a population-based cohort study. **J Bone Min Res** 1997;12:1092-9.
11. Gouveia CHA, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. **J Bone Min Res** 1997;12:2098-107.
12. Serakides R. Relação tireóide, gônadas e metabolismo ósseo em ratas adultas hipertireóideas e eutireóideas. Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG, 2001. 90p. (Tese de Doutorado em Ciência Animal).
13. Bottiglioni F, de Aloysio D, Nicoletti G, Mauloni M, Mantuano R, Capelli M. A study of thyroid function in the pre and post menopause. **Maturitas** 1983;5:105-14.
14. Larsen PR, Ingbar SH. The thyroid gland. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM. eds. **Williams' textbook of endocrinology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.357-487.
15. Serakides R, Nunes VA, Nascimento EF, Ribeiro AFC, Zibaoui HM, Silva CM. Hipogonadismo e função tireoideana em ratas hipertireóideas e eutireóideas. **Arq Bras Med Vet Zoot** 2000;52:571-8.
16. Ferreira E, Serakides R, Gomes MG, Silva CM, Ocarino NM, Ribeiro AFC. Morfologia e histoquímica da pele de ratas hipotireóideas castradas e não castradas. **Arq Bras Med Vet Zoot** 2003;55:51-60.
17. Gomes MG, Serakides R, Nunes VA, Silva CM, Carneiro RA, Ocarino NM. Perfil hematológico de rata adultas hipotireóideas castradas e não castradas. **Arq Bras Endocrinol Metab** (no prelo).
18. Shirai H, Sato T, Oka M, Hara T, Mori S. Effect of calcium supplementation on bone dynamics of the maxilla, mandible and proximal tibia in experimental osteoporosis. **J Oral Rehabil** 2002;29:287-94.
19. Avioli VL, Krane SM. **Metabolic bone disease**. San Diego: Academic Press, 1998.
20. Lindgren U, DeLuca HF. Role of parathyroid hormone and 1,25 dihydroxyvitamin D3 in the development of osteopenia in oophorectomized rats. **Calcif Tissue Int** 1982;sv:510-4.
21. Sims NA, Morris HA, Moore RJ, Durbridge TC. Parathyroidectomy does not prevent bone loss in the oophorectomized rat. **J Bone Min Res** 1994;9:1859-63.
22. Mosekilde L, Melsen F. A tetracycline-based histomorphometric evaluation of bone resorption and bone turnover in hyperthyroidism and hyperparathyroidism. **Acta Med Scand** 1978;204:97-102.
23. Bijlsma JW, Duursma SA, Roelofs JM, der Kinderen PJ. Thyroid function and bone turnover. **Acta Endocrinol**

- 1983;104:42-9.
24. Fraser WD, Logue FC, MacRitchie K, Wilson RM, Gray HW, Beastall GH, et al. Intact parathyroid hormone concentration and cyclic AMP metabolism in thyroid disease. **Acta Endocrinol** 1991;124:652-7.
25. Ain KB, Mori Y, Refetoff S. Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. **J Clin Endocrinol Metab** 1987;65:689-96.
26. Savu L, Vranckx R, Maya M, Nunez EA. Demonstration and ontogenesis in the rat of a serum protein analogous to human thyroxine binding globulin. **C R Acad Sci III** 1987;305:627-32.
27. Rasmussen H. Parathyroid hormone, calcitonin, and the calciferols. In: Norman AW, Litwack G, eds. **Hormones**. 2nd ed. San Diego:Academic Press, 1997. p.660-723.
28. Jentsch E, Hehrman R, Montz R, Hagermann J. The role of thyroid hormones in the mechanism of intestinal calcium absorption. **Acta Endocrinol** 1973;173 (suppl.):145.
29. Cross HS, Peterlik M. Calcium and inorganic phosphate transport in embryonic chick intestine: triiodothyronine enhances the genomic action of 1,25-dihydroxycholecalciferol. **J Nutrition** 1988;118:1529-34.
30. Cross HS, Peterlik M. Differentiation-dependent expression of calcitriol actions on absorptive processes in cultured chick intestine: modulation by triiodothyronine. **Acta Endocrinologica (Copenh)** 1991;124:679-84.
31. Wilkins JN, Mayer SE, Vanderlaan WP. The effects of hypothyroidism and 24,25-dinitrophenol on growth hormone synthesis. **Endocrinology** 1974;95:1259-67.
32. Burstein PJ, Draznin B, Johnson CJ, Schalch DS. The effect of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone dependent somatomedin, insulin-like growth factor, and its carrier protein in rats. **Endocrinology** 1979;104:1107-11.
33. Huang BK, Golden LA, Tarjan G, Madison LD, Stern PH. Insulin-like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. **J Bone Min Res** 2000;15:188-97.
34. Yeh JK, Aloia JF. Effect of hypophysectomy and 1,25-dihydroxyvitamin D on duodenal calcium absorption. **Endocrinology** 1984;114:1711-7.
35. Wongsurawat N, Armbrecht HJ, Zenser TV, Forte LR, Davis BB. Effects of hypophysectomy and growth hormone treatment on renal hydroxylation of 1,25-hydroxycholecalciferol in rats. **J Endocrinol** 1984;101:333-8.
36. Chen C, Noland KA, Kalu DN. Modulation of intestinal vitamin D receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. **Mech Ageing Dev** 1997;99:109-22.
37. Fleet JC, Bruns ME, Hock JM, Wood RJ. Growth hormone and parathyroid hormone stimulate intestinal calcium absorption in aged female rats. **Endocrinology** 1994;134:1755-60.
38. Serakides R, Nunes VA, Nascimento EF, Silva CM, Ribeiro AFC. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. **Arq Bras Med Vet Zoot** 2000;52:579-85.
39. Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clin Science** 2000;98:217-40.
40. Sontag W. Quantitative measurements of periosteal and cortical-endosteal bone formation and resorption in the midshaft of female rat femur. **Bone** 1986;7:55-62.
41. Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. **Bone Min** 1992;18:227-36.
42. Stark C, Kahrman B, Walzel E. Epi- and metaphyseal morphology in the long bones of BDIX/Han rats. **Lab Anim** 1996;30:35-41.
43. Krook L. **Metabolic diseases of bone and bones**. New York: New York State College of Veterinary Medicine, 1972. (Special Pathology Lectures, 632).
44. Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Bone** 1998;7:119-23.
45. Kimmel DB, Wronski TJ. Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int** 1990;46:101-10.
46. Bilezikian JP, Raiz LG, Rodan GA. **Principles of bone biology**. San Diego: Academic Press, 1996.
47. Schmidt IU, Wakely GK, Turner RT. Effects of estrogen and progesterone on tibia histomorphometry in growing rats. **Calcif Tissue Int** 2000;67:47-52.
48. Libouban H, Moreau MF, Legrand E, Audran M, Basle MF, Chappard D. Comparison of histomorphometric descriptors of bone architecture with dual-energy X-ray absorptiometry for assessing bone loss in the orchidectomized rat. **Osteoporos** 2002;13:422-8.
49. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. **J Clin Invest** 2002;110:771-81.
50. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. **J Bone Min Res** 1998;13:1243-50.

**Endereço para correspondência:**

Rogéria Serakides  
Setor de Patologia  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da UFMG  
Av. Pres. Antônio Carlos 6627  
Caixa Postal 567  
31270-901 Belo Horizonte, MG  
Fax: (31) 3499-2230  
e-mail: serakide@dedalus.lcc.ufmg.br