

Resposta da paratireóide de ratas às variações do cálcio e fósforo plasmáticos no hipertireoidismo e hipogonadismo

[Response of parathyroid to the plasmatic of calcium and phosphorus variations in hyperthyroidism and hypogonadism in the rat]

R. Serakides, N.M. Ocarino, T.G.S. Cardoso, J.R.C. Moraes, V.A. Nunes, A.E. Silva

Escola de Veterinária da UFMG
Caixa Postal 567
30123-970 - Belo Horizonte, MG

RESUMO

Foram estudadas 84 paratireóides de ratas Wistar com cinco meses de idade, castradas ou não, e mantidas em hipertireoidismo por períodos de 30, 60 e 90 dias. Dois grupos eutireóides, um castrado e o outro não, foram mantidos nas mesmas condições e serviram de controle. Ao final de cada período, foram colhidos o plasma, para determinação da concentração de T4 livre, o cálcio e o fósforo e as paratireóides, para análise morfológica e determinação da porcentagem de núcleo, citoplasma e estroma. Aos 90 dias houve reversão da hipocalcemia observada aos 60 dias nos animais eutireóides castrados e não castrados, graças à hipertrofia da paratireóide. O mesmo não ocorreu com os grupos hipertireóides que apresentaram hipocalcemia e hiperfosfatemia progressivas e não compensadas até os 90 dias. Na castração há pronta reversão da hipocalcemia em resposta ao aumento da atividade funcional da paratireóide. No estado hipertireóide com gônadas funcionais, apesar da hipertrofia da paratireóide, não há retorno à isocalcemia e isofosfatemia. Na associação hipertireoidismo-castração, a paratireóide não responde satisfatoriamente à hipocalcemia e hiperfosfatemia intensas e progressivas.

Palavras-chave: rata, paratireóide, hipertireoidismo, castração

ABSTRACT

Eighty four parathyroids of castrated and intact adult female Wistar rats kept under hyperthyroidism state for 30, 60 or 90 days were studied. Two euthyroid groups, one castrated and another intact were used as controls. At the end of each period, blood was collected and the concentrations of free T4, calcium and phosphorus were determined. The parathyroids were analysed microscopically and % of nuclei, cytoplasm and stroma were determined. Hypocalcemia that was observed in castrated and intact euthyroid rats at 60 days was reverted after 90 days due to parathyroid hypertrophy. In hyperthyroid groups, hypocalcemia and hyperphosphatemia were progressive and did not revert at 90 days. In conclusion, castration revert hypocalcemia due to the increase of parathyroid activity. In spite of parathyroid hypertrophy, hyperthyroid state with functional gonads did not return to isocalcemia and isophosphatemia state. In addition, under the association of hyperthyroidism-castration, parathyroid did not respond to progressive hypocalcemia and hyperphosphatemia.

Keywords: rat, parathyroid, hyperthyroidism, castration

INTRODUÇÃO

No hipogonadismo, os metabolismos ósseo e mineral se alteram. Em ratas castradas, os níveis de fósforo plasmático se elevam, a taxa de aposição óssea se reduz já aos 30 dias após a castração e a velocidade da reabsorção óssea aumenta logo depois. Embora haja hiperfosfatemia e conseqüente hipocalcemia (Serakides et al., 2000; Serakides et al., 2004), estariam as paratireóides envolvidas no catabolismo ósseo no hipogonadismo? Há autores que rejeitam essa hipótese e outros afirmam haver aumento da responsividade do osso ao paratormônio (PTH). A despeito dos vários estudos *in vivo* e *in vitro*, a literatura é controversa e a origem da perda óssea no hipogonadismo continua indeterminada.

No hipertireoidismo há estímulo tanto da aposição quanto da reabsorção óssea, mas a diminuição da massa óssea advém da supremacia do processo catabólico frente ao anabólico (Serakides et al., 2004). O aumento da reabsorção óssea, no entanto, não é de fácil explicação. Seria por ação direta dos hormônios tireoidianos sobre o osso, ou seria uma resposta mediada pelo PTH e puramente compensatória às variações plasmáticas do cálcio e do fósforo, ou também estaria às margens da atividade paratireóidea?

Intrigantes são as alterações ósseas e homeostáticas do cálcio e do fósforo na combinação hipertireoidismo-castração. Nos estádios iniciais, a tiroxina compensa a perda óssea da castração, principalmente pela inibição da reabsorção óssea. Entretanto, a inibição da reabsorção óssea não se mantém e a osteopenia da castração não pode ser revertida (Serakides et al., 2004). A despeito disso, os níveis plasmáticos de fósforo mantêm-se elevados e os de cálcio reduzidos, demonstrando que o osso e os rins não estão atuando em conjunto e sob o comando do PTH para manter a homeostasia mineral (Serakides et al., 2000). Teriam os tecidos de animais hipertireóides castrados ausência de resposta ao PTH?

Ao contrário de outras glândulas que estão sob o controle dos valores periféricos de seus próprios hormônios, a paratireóide sofre influência do perfil plasmático do cálcio e fósforo. Assim, sua

morfologia retrata o perfil plasmático de PTH. Dessa forma, a hiperplasia é um reflexo da maior atividade de síntese e a hipertrofia do aumento da atividade de secreção de PTH.

O objetivo deste trabalho é estudar a resposta da paratireóide de ratas à hipocalcemia do hipertireoidismo e hipogonadismo, relacionando-a ao metabolismo mineral.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 84 ratas Wistar adultas, com cinco meses de idade. Elas foram alojadas em caixas plásticas, na densidade de cinco animais/caixa, recebendo ração comercial (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio e 0,6% de fósforo, além de micronutrientes) e água destilada *ad libitum*. Os animais foram mantidos em regime de 12 horas de luz e 12 horas sem luz.

Após 30 dias de adaptação, as ratas foram separadas em quatro grupos de 21 animais cada, sendo dois grupos castrados e dois não castrados. Uma semana após a castração, dois grupos, um castrado e outro não, foram submetidos ao hipertireoidismo, mediante administração diária, via sonda oro-gástrica, de L-tiroxina¹, na dose de 50µg/animal, diluída em 5ml de água destilada. Os dois grupos restantes foram mantidos em estado eutireóideo, mediante administração de 5ml de água destilada, utilizando-se a mesma via e os mesmos horários daqueles tratados com tiroxina. Aos 30, 60 e 90 dias após o início do tratamento, sete ratas de cada grupo foram sacrificadas e delas retirado sangue para dosagem de cálcio, fósforo e T4 livre. As paratireóides colhidas foram fixadas em formol a 10% neutro, tamponado, e processadas pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina. Uma secção do centro da glândula foi selecionada e submetida à análise morfométrica. Na área total abrangida pela secção histológica, num total de sete campos e com auxílio de uma ocular integradora com graticula de 25 pontos, foram determinadas as porcentagens de núcleo, citoplasma e de estroma com objetiva de 40x.

A concentração plasmática de T4 livre foi determinada em sistema totalmente automático

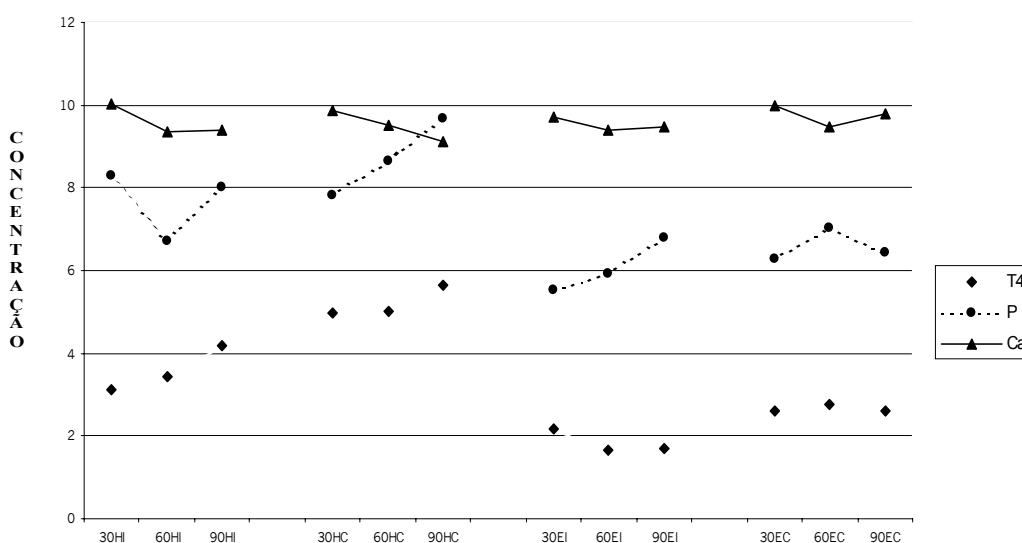
¹ Armesham International, Buckinghamshire, England.

pela técnica da quimioluminescência² e as de cálcio e fósforo pela espectrofotometria de reflectância³, seguindo o protocolo do fabricante.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4x3 (quatro grupos e três períodos). Para cada variável estudada foram determinados a média e o desvio-padrão. As médias foram comparadas pelo teste SNK (Sampaio, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração plasmática de T4 livre significativamente mais elevada nos grupos tratados com tiroxina, independente do estado funcional das gônadas, comprovou o estado hipertireóideo das ratas (Fig. 1). O útero visivelmente reduzido de volume à necropsia e a redução significativa dos valores de estradiol e progesterona confirmaram o sucesso da castração na indução da afuncionalidade das gônadas, tal como previamente publicado (Serakides et al., 2000).



Legenda: HI= hipertireóideo não castrado, HC= hipertireóideo castrado, EI=eutireóideo não castrado, EC=eutireóideo castrado. T4 = ng/dl; P = mg/dl; Ca = ng/dl.

Figura 1. Concentrações plasmáticas de T4 livre, cálcio e fósforo em ratas hipertireóideas e eutireóideas castradas ou não castradas.

No grupo eutireóideo não castrado (controle) aos 30 e 60 dias, as paratireóides apresentavam células principais escuras e de transição dispostas em cordões (Fig. 2A e B). Somente aos 90 dias as paratireóides apresentaram hipertrofia das células com predomínio de células principais

claras (Fig. 2C), em resposta à hipocalcemia e hiperfosfatemia dos 60 dias (Fig. 1). A análise morfológica confirmou esse quadro, demonstrando aumento gradual da porcentagem de citoplasma e diminuição da porcentagem de núcleo até os 90 dias (Tab. 1 e 2).

Resposta da paratireóide de ratas...

Tabela 1. Média e desvio-padrão da porcentagem de citoplasma na paratireóide de ratas por grupo e período de observação

Grupo	Citoplasma (%)		
	30 dias	60 dias	90 dias
Eutireóideo não castrado	32,30±9,51Aa	37,34±5,25Aa	38,86±7,96Abc
Eutireóideo castrado	28,98±4,67Ba	34,40±5,25Ba	44,73±4,72Aac
Hipertireóideo não castrado	29,26±7,41Ca	36,24±5,11Ba	49,40±5,52Aa
Hipertireóideo castrado	32,92±9,12Aa	36,32±6,00Aa	37,58±4,93Ab

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Tabela 2. Média e desvio-padrão da porcentagem de núcleo na paratireóide de ratas por grupo e período de observação

Grupo	Núcleo (%)		
	30 dias	60 dias	90 dias
Eutireóideo não castrado	54,75±8,47Aab	51,40±4,97ABa	44,69±8,46Ba
Eutireóideo castrado	57,56±4,24Aa	52,12±5,11Aa	35,94±8,57Bb
Hipertireóideo não castrado	51,87±12,83Aab	49,64±8,51Aa	32,27±6,24Bb
Hipertireóideo castrado	46,80±11,06Ab	53,50±8,32Aa	46,62±4,57Aa

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Esse quadro de hipertrofia da paratireóide no grupo-controle provavelmente foi determinado pelo excesso de nutrientes na dieta, já que a ração comercial ofertada *ad libitum* apresentava níveis de minerais, vitaminas e proteínas acima dos recomendados pelo Nutrient... (1995). Assim, postula-se que a hipocalcemia tenha decorrido da hiperfosfatemia progressiva, como observado na Fig. 1. No entanto, como esperado, por ser a paratireóide uma glândula que secreta PTH, hormônio que atua nos ossos e rins controlando minuto a minuto a homeostasia mineral, houve pronta compensação da hipocalcemia aos 90 dias, em resposta à hipertrofia das paratireóides.

As paratireóides das ratas eutireóideas castradas diferiram do grupo-controle por apresentarem, desde os 30 dias, aumento gradual do número de glândulas com hipertrofia e/ou aparente aumento da celularidade. Aos 90 dias, todas as

paratireóides apresentavam hipertrofia intensa com presença de células claras e de células claras transparentes que apresentavam citoplasma volumoso, claro e vacuolizado, com núcleo de cromatina densa situado na periferia da célula (Fig. 2D, E e F). As células claras transparentes, indicativas de intensa atividade e exaustão glandular, formavam pequenos grupos dispostos em ácinos. Pela análise morfométrica observou-se aumento gradual da porcentagem de citoplasma e da razão citoplasma/núcleo. Além disso, houve diferença significativa entre essas últimas variáveis quando comparadas ao grupo-controle (Tab. 1, 2 e 3). Nas ratas eutireóideas castradas, apesar dos valores de fósforo se elevarem, esse aumento não foi significativo, ao contrário dos valores de cálcio que foram significativamente mais baixos aos 60 dias (Fig. 1) (Serakides et al., 2000). Assim, pode-se inferir que a hipocalcemia nesse grupo não resultou da hiperfosfatemia.

Tabela 3. Média e desvio-padrão da razão citoplasma/núcleo na paratireóide de ratas por grupo e período de observação

Grupo	Razão citoplasma/núcleo		
	30 dias	60 dias	90 dias
Eutireóideo não castrado	0,63±0,30Ba	0,74±0,15ABa	0,94±0,41Ab
Eutireóideo castrado	0,51±0,11Ba	0,67±0,10Ba	1,31±0,36Aa
Hipertireóideo não castrado	0,61±0,23Ba	0,76±0,22Ba	1,59±0,38Aa
Hipertireóideo castrado	0,79±0,45Aa	0,71±0,21Aa	0,82±0,16Ab

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($P \geq 0,05$).

Na deficiência dos esteróides sexuais, a osteopenia também parece ser decorrente da redução da absorção intestinal do cálcio. Há uma ação direta do estrógeno sobre a mucosa intestinal (Chen e Kalu, 1998; Ten Bolscher et al., 1999; Colin et al., 1999) e uma ação indireta, mediada pela vitamina D. Na deficiência de estrógeno, há diminuição dos receptores da vitamina D no intestino (Liel et al., 1999) e menor conversão renal do 25 hidroxicalciferol (25OHD_3) em 1,25 dihidroxicalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), a forma ativa da vitamina D. Assim, na castração espera-se menor formação da proteína ligante do cálcio, o que diminui sua absorção intestinal (Schwartz et al., 2000). O resultado disso é a hipocalcemia, pelo menos em algum momento da deficiência dos hormônios sexuais. Por ser o cálcio o principal regulador da atividade da paratireóide (Habener et al., 1984), na hipocalcemia há aumento da secreção de PTH e conseqüente aumento da reabsorção óssea para restabelecimento da isocalcemia (Habener et al., 1984; Rasmussen, 1997; Leder et al., 2001). De fato é isso que parece ocorrer, pois depois de instalada a hipocalcemia da castração há pronta compensação dos valores plasmáticos de cálcio aos 90 dias graças à hipertrofia das paratireóides (Fig. 1). No entanto, contesta-se a ação do PTH como mediador da perda óssea na castração (Riggs et al., 1973).

As paratireóides dos animais hipertireóides não castrados apresentaram características histomofométricas semelhantes às do grupo eutireóide castrado durante todo o período experimental (Fig. 2G, H e I). A hipertrofia aos 90 dias, caracterizada por maior porcentagem de citoplasma, menor porcentagem de núcleo e maior razão citoplasma/núcleo (Tab. 1, 2 e 3) em resposta à hipocalcemia e à hiperfosfatemia foi significativamente maior quando comparado ao grupo-controle. Nesse grupo, é provável que a hipocalcemia também tenha ocorrido subsequente à hiperfosfatemia. No entanto, como já previamente publicado, a hiperfosfatemia foi mais intensa do que a do grupo-controle (Serakides et al., 2000) e provavelmente não resultou somente dos excessos da dieta, mas principalmente da maior reabsorção tubular renal de fósforo causada pelos hormônios tireoidianos (Alcade et al., 1999). Ao contrário do grupo-controle, apesar da hipertrofia das paratireóides, a compensação da hipocalcemia dos 60 dias não

foi satisfatória, o que resultou na manutenção da hipocalcemia e hiperfosfatemia (Fig. 1). Haveria nos animais hipertireóides não castrados ausência de resposta do osso e dos rins ao PTH? Ao contrário do que foi evidenciado, outros pesquisadores têm postulado que pacientes com tireotoxicose apresentam redução da atividade da paratireóide (Furlanetto et al., 1991), mas não há estudos da morfologia da paratireóide em associação com os valores plasmáticos de cálcio e fósforo e ao longo de vários períodos experimentais.

Na associação hipertireoidismo-castração, a morfologia e a morfometria das paratireóides foram semelhantes às do grupo-controle até os 90 dias (Fig. 2J, K e L e Tab. 1, 2 e 3). Apesar de existir, no grupo hipertireóide castrado, hiperfosfatemia e hipocalcemia persistentes e progressivas (Fig. 1) e mais intensas em comparação aos demais grupos (Serakides et al., 2000), a hipertrofia da paratireóide não ocorreu na intensidade esperada. Esse fato intriga e levanta questões sobre o porquê da paratireóide de ratas hipertireóides castradas não responder satisfatoriamente à hipocalcemia e hiperfosfatemia. Diferente do grupo-controle no qual houve retorno à isocalcemia, no grupo hipertireóide castrado não houve, em nenhum momento, tentativa de retorno à isocalcemia e isofosfatemia (Fig. 1).

Sabe-se que as concentrações de cálcio extracelular são continuamente medidas por dois receptores situados na paratireóide que controlam a expressão gênica e conseqüente secreção do PTH. Já foi sugerido que a parvalbumina influencia a expressão do gene do PTH por modificar os sinais de cálcio intracelular. O mesmo receptor de cálcio das paratireóides é também encontrado nos rins e nas células C da tireóide, tecidos envolvidos na homeostasia de cálcio. Elevação do cálcio extracelular induz nas células C e nas células claras da paratireóide aumento do cálcio intra-celular. Entretanto, as conseqüências desse aumento do cálcio do citosol são opostas. Nas células claras, inibe a secreção de PTH e nas células C, aumenta a secreção de calcitonina (Pauls et al., 2000). Haveria alguma modificação desses receptores de cálcio no hipertireoidismo? Essa é uma questão que merece ser investigada.

Resposta da paratireóide de ratas...

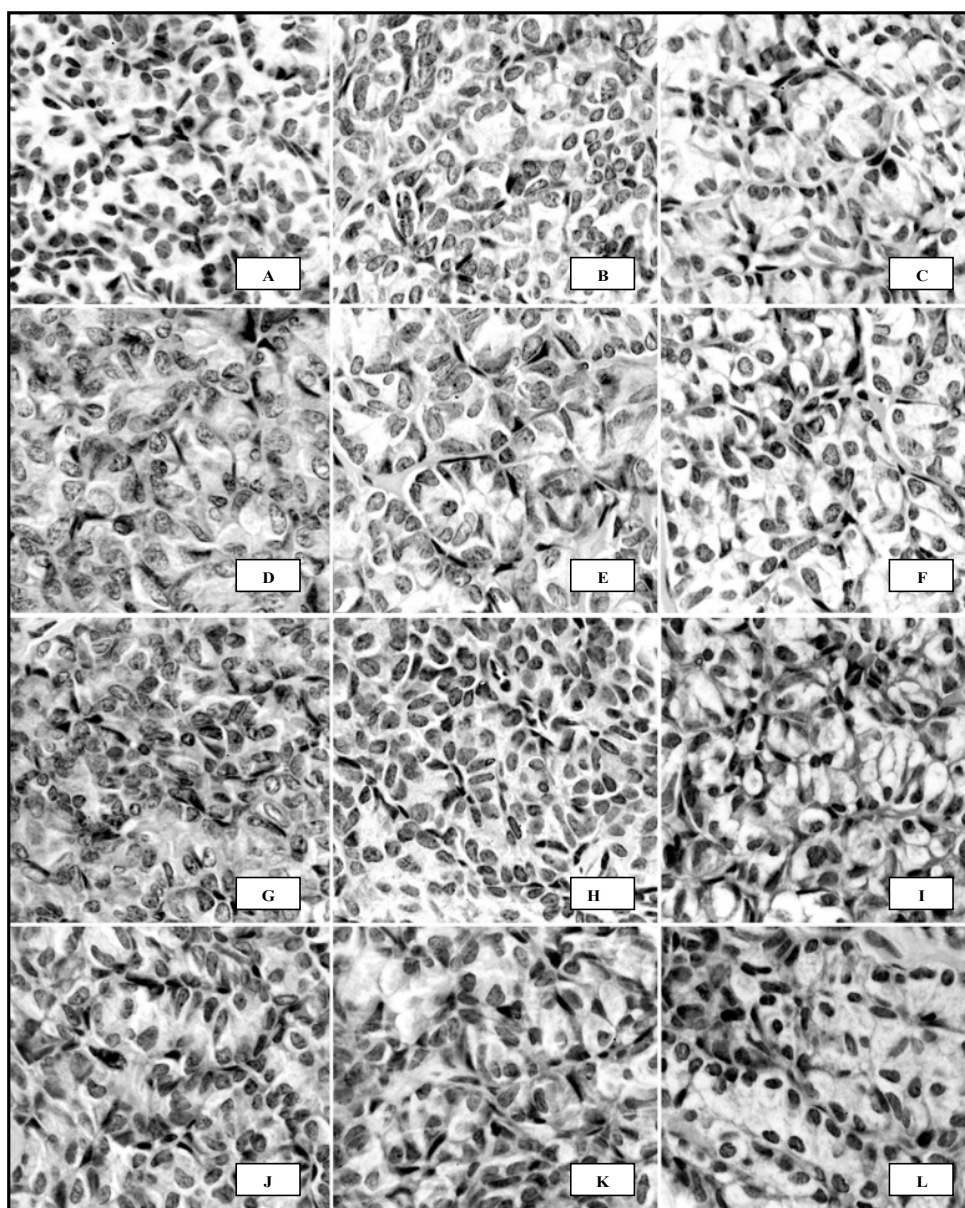


Figura 2. Fotomicrografias de paratireóide de ratas, 150 \times , HE. A e B-Grupo eutireóideo não castrado (controle) aos 30 e 60 dias respectivamente, com presença de células principais escuras e de transição dispostas em cordões. C-Grupo eutireóideo não castrado (controle) com paratireóides aos 90 dias apresentando hipertrofia das células com predomínio de células principais claras. D e E-Grupo eutireóideo castrado com paratireóides aos 30 e 60 dias respectivamente, exibindo hipertrofia celular. F-Grupo eutireóideo castrado com paratireóides aos 90 dias apresentando hipertrofia celular intensa com presença de células claras e de células claras transparentes com citoplasma volumoso, claro e vacuolizado e núcleo de cromatina densa situado na periferia da célula. G, H e I-Grupo hipertireóideo não castrado com paratireóides apresentando morfologia semelhante à do grupo controle, aos 30, 60 e 90 dias respectivamente. J, K e L-Grupo hipertireóideo castrado com paratireóides semelhantes às do grupo-controle aos 30, 60 e 90 dias, respectivamente.

CONCLUSÕES

Na castração há pronta reversão da hipocalcemia em resposta ao aumento da atividade funcional da paratireóide. No estado hipertireóideo com gônadas funcionais, apesar da hipertrofia da paratireóide, não há retorno à isocalcemia e isofosfatemia. Na associação hipertireoidismo-castração, a paratireóide responde à hipocalcemia e hiperfosfatemia intensas e progressivas, mas essa resposta não é suficiente para retornar a calcemia e fosfatemia ao normal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCADE, A.I.; SARASA, M.; RALDÚA, D. et al. Role of thyroid hormone in regulation of renal phosphate transport in young and aged rats. *Endocrinology*, v.140, p.1544-1551, 1999.
- CHEN, C.; KALU, D.N. Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.286, p.328-333, 1998.
- COLIN, E.M.; VAN DEN BEMD, G.H.; VAN AKEN, M. et al. Evidence for involvement of 17 beta-estradiol in intestinal calcium absorption independent of 1,25-dihydroxyvitamin D3 level in the rat. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, p.57-64, 1999.
- FURLANETTO, R.P.; CASTRO, M.L.; MESQUITA, C.H. et al. Função paratiroídica no hipertireoidismo: implicações no metabolismo ósseo e efeito do tratamento. *Rev. Paul. Med.*, v.109, p.55-60, 1991.
- HABENER, J.F.; ROSENBLATT, M.; POTTS Jr., J.T. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action and metabolism. *Physiol Rev.*, v.64, p.985-1053, 1984.
- LEDER, B.Z.; SMITH, M.R.; FALLON, M.A. et al. Effects of gonadal steroid suppression on skeletal sensitivity to parathyroid hormone in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, p.511-516, 2001.
- LIEL, Y.; SHANY, S.; SMIRNOFF, P. et al. Estrogen increases 1,25-Dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology*, v.140, p.280-284, 1999.
- NUTRIENT requirements of laboratory animals. 4.ed. Washington: National Academic, 1995.
- PAULS, T.L.; PORTIS, F.; MACRI, E. et al. Parvalbumin is expressed in normal and pathological human parathyroid glands. *J. Histochem. Cytochem.*, v.48, p.105-111, 2000.
- RASMUSSEN H. Parathyroid hormone, calcitonin, and the calciferols. In: NORMAN, A.W.; LITWACK, G. *Hormones*. 2.ed. San Diego: Academic, 1997. P.660-723.
- RIGGS, B.L.; ARNAUD, C.D.; JOWSEY, J. et al. Parathyroid function in primary osteoporosis. *J. Clin. Invest.*, v.52, p.181-184, 1973.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998. 211p.
- SCHWARTZ, B.; SMIRNOFF, P.; SHANY SLIEL, Y. Estrogen controls expression and bioresponse of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in the rat colon. *Mol. Cell. Biochem.*, v.203, p.87-93, 2000.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F. et al. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.579-585, 2000.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; OCARINO, N.M. et al. Efeito da Associação Hipertireoidismo-Castração no Osso de Ratas Adultas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* (no prelo).
- TEN BOLSCHER, M.; NETELENBOS, J.C.; BARTO, R. et al. Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact and ovariectomized adult rat. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, p.1197-1202, 1999.